

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la
República (PROPAC)

“Desarrollo y caracterización de una película a base de aislado proteico de semilla de yaca obtenida por la técnica de electrohilado incorporando complejos β -ciclodextrina:aceite esencial de naranja”.

TESIS

Que como parte de los
requisitos para obtener el grado
de

Maestro en Ciencia y
Tecnología de Alimentos

PRESENTA

LF. Jorge Armando Soto Ramos.

DIRIGIDA POR

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

CODIRIGIDA POR

Dr. David Quintanar Guerrero.

Santiago de Querétaro, Querétaro, MARZO 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Desarrollo y caracterización de una película a base de
aislado proteico de semilla de yaca obtenida por la
técnica de electrohilado incorporando complejos
 β -ciclodextrina:aceite esencial de naranja

por

Jorge Armando Soto Ramos

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: FQMAC-300257



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

“Desarrollo y caracterización de una película comestible antimicrobiana a base de aislado proteico de semilla de yaca obtenida por la técnica de electrohilado incorporando complejos β -ciclodextrina- aceite esencial de naranja”.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

LF. Jorge Armando Soto Ramos

Dirigido por:

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

Dirigido por:

Dr. David Quintanar Guerrero

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

Presidente

Dr. David Quintanar Guerrero

Secretario

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Vocal

Dra. Ma. Guadalupe Flavia

Loarca

Suplente

Dra. María de la Luz Zambrano

Zaragoza

Suplente

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue elaborar una película con base en nanofibras (NF) a partir de aislado proteico de las semillas de yaca (JPI) mediante la técnica de electrohilado para obtener películas comestibles con actividad antimicrobiana. El proceso de obtención de las NF se optimizó con los siguientes parámetros: Concentración sólidos totales/ relación JPI:pululano : 10% (80:20), 10% (60:40), 12% (80:20), velocidad de flujo: 0.3 mL/h, voltaje: 21 kV, distancia: 14 cm. La presencia de pululano en las mezclas dio como resultado un aumento de viscosidad y menor conductividad de las soluciones, relacionado con un mejor enredo de la cadena y disminución en el carácter polielectrolito de la proteína, factores necesarios para la formación de fibras. Las películas electrohiladas se caracterizaron mediante SEM, FTIR y DSC. Los resultados mostraron que dependiendo de la concentración de aislado de proteína se pueden obtener distintas morfologías como lo son las microcápsulas y las nanofibras que al aumentar el contenido de pululano se pueden generar películas más flexibles. Las nanofibras se obtuvieron con JPI:PUL 12% 80:20 y 20 p/p% de Tween 80 con diámetros de 140-160 nm, mientras que para el caso de las micropartículas de las soluciones al 10% 80:20 y 60:40 las dimensiones obtenidas fueron 1.98 y 1.77 μm .

Se utilizó aceite esencial de naranja amarga (*Citrus aurantium*) obtenido por hidrodestilación y se caracterizó por cromatografía de gases/espectrometría de masas siendo el limoneno (95,05%), α -pineno (2,78%) los principales componentes. Para incorporar el aceite esencial a las fibras, se prepararon complejos de inclusión de beta ciclodextrina (β -CD) a distintas proporciones 1:1, 1:2 y 2:1 AE/ β -CD respectivamente. Se caracterizaron por SEM y FTIR.

Palabras clave: Proteínas de yaca, nanofibras, electrohilado aceite esencial de naranja amarga, complejos de inclusión.

ABSTRACT

The aim of this work was to produce nanofibers (NF) from jackfruit protein isolate (JPI) using the electrospinning technique to obtain edible films with antimicrobial activity. The NF are optimized considering the variables of the polymeric dispersion, such as the percentage of protein isolate and pullulan in a solution of sodium hydroxide pH= 12.0. The polymer content in solution was kept at 10-12% w/v. The polymers were mixed in different proportions (70:30 and 80:20 w/w) of JPI and pullulan, respectively. The presence of pullulan in the mixtures resulted in an increase in viscosity and lower conductivity of the solutions, related to a better entanglement of the chain and a decrease in the character of the polyelectrolyte protein, respectively, both factors are necessary for the formation of fibers. Subsequently, they were characterized by SEM, FTIR and DSC. The results showed that depending on the concentration of isolated protein films, different morphologies can be obtained, such as microcapsules and nanofibers that by increasing the pullulan content, can be more flexible.

Nanofibers were formed with JPI:PUL 12% 80:20 and 20 wt. % of Tween 80 with diameters of 140-160 nm, while in the case of the microparticles at 10% 80:20 and 60:40 solutions, the dimensions obtained were 1.98 and 1.77 μm .

Bitter orange essential oil (*Citrus aurantium*) was obtain by hydrodestilation and characterized by gas chromatography/mass spectrometry CG-GS, being limonene (95.05%), α -pinene (2.78%) the main components. To add the essential oil to the fibers, inclusion complexes based on beta cyclodextrin (β -CD) were prepared in different proportions 1:1, 1:2 and 2:1 AE/ β -CD respectively, forming the inclusion complexes with controlled release characterized by SEM and FTIR.

Keywords: *jackfruit isolate proteins, nanofibers, electrospinning, bitter orange essential oil, inclusion complexes.*

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DEL ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que incluí los detalles metodológicos necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se desarrolló y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and lines, positioned above a horizontal line.

Nombre y firma del estudiante

DEDICATORIAS

A mis padres, **Armando Soto Pérez** y **María del Pilar Ramos Medina**, por ser mi modelo a seguir, por la educación que me inculcaron a base de su trabajo y esfuerzo, y sacrificio, a la excelente vida que me han dado, por eso y más los amo, no hay palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí.

A mi hermana **Adriana Soto Ramos**, por enseñarme muchas cosas de la vida que no hubiera notado sin ti, por los momentos que hemos vivido juntos. Te amo siempre estaré para ti.

A mi abuela **Yolanda Medina González**, por apoyarme en esta etapa tan importante de mi vida, por siempre estar ahí cuando lo necesite, por tu hospitalidad, por abrirme las puertas de tu casa y hacer mucho sacrificio para que pudiera concluir satisfactoriamente mis estudios. Gracias abuelita te amo.

A mis abuelitos, **Antonio Soto**, **María Pérez Guillen** y **Felipe Ramos**, que siempre me cuidaran desde el cielo y porque me enseñaron a ser un hombre trabajador, honesto, humilde y comprometido.

A mi primo **Rodrigo** por su apoyo por siempre estar ahí, su honestidad. Te quiero y siempre estaré para ti.

A mi amigo **Lalo**, gracias por tu amistad, por todas las vivencias que hemos tenido, las aventuras que hemos pasado, por sus consejos muy valiosos, por ayudarme y orientarme. Siempre estaré para ti.

AGRADECIMIENTOS

A **DIOS**, por permitirme vivir esta increíble etapa de mi vida, y a que sin él todo esto no hubiera sido posible.

A la **Universidad Autónoma de Querétaro** por brindarme la oportunidad de desempeñarme como estudiante de Posgrado y mejorar mi trayectoria en este camino de la investigación.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por brindarme todos los recursos y el apoyo para mejorar mi proyecto de investigación.

A la **Dra. Sandra Olimpia Mendoza Diaz** por brindarme su apoyo incondicional, confianza, por creer en mí como estudiante y su calidad humana que considero es un ejemplo a seguir.

Al **Dr. David Quintanar Guerrero**, por su apoyo incondicional, la confianza que me ha brindado y por el conocimiento que me ha transmitido, por lo que lo considero un ejemplo a seguir y le estaré eternamente agradecido.

A mis sinodales: **Dra. Luz Zambrano Zaragoza, Dra. Montserrat Hernández Iturriaga** y la **Dra. Flavia Loarca Piña** por sus aportaciones que ayudaron a enriquecer este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio **Raquel, Carmen, Adolfo, Bere** gracias por su apoyo y consejos que me han ayudado enormemente a crecer y desarrollarme como profesionista. Muchas gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Contenido

“Desarrollo y caracterización de una película comestible antimicrobiana a base de aislado proteico de semilla de yaca obtenida por la técnica de electrohilado incorporando complejos β -ciclodextrina-aceite esencial de naranja”.....	
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DEL ESTUDIANTE:.....	iii
Nombre y firma del estudiante	iii
DEDICATORIAS.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDO	vi
INDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 ANTECEDENTES.....	2
2.1 Generalidades de yaca	2
2.2 Semillas de yaca	3
2.3 Propiedades funcionales del aislado proteico de yaca.....	7
2.4 Electrohilado	11
2.5 Parámetros considerados durante el proceso de electrohilado.....	12
2.6 Electrohilado de proteínas.....	15
2.7 Películas comestibles.....	19
2.7.1 Generalidades	19
2.7.2 Clasificación	21
2.7.3 Películas proteicas	21
2.7.4 Películas antimicrobianas	24
2.7.5 Aceites esenciales cítricos	29
4 OBJETIVOS.....	36
4.1 Objetivo general	36
4.2 Objetivos específicos.....	36
5 MATERIAL Y MÉTODOS	37
5.1 Obtención del aislado proteico de semillas de yaca.....	37

5.2	Preparación de la solución a electrohilar.....	37
5.3	Determinación de las concentraciones a electrohilar	37
5.4	Viscosidad y conductividad de las soluciones poliméricas.....	37
5.5	Tensión superficial de las soluciones poliméricas	38
5.5.1	Determinación del color	39
5.6	Preparación y caracterización de los complejos de inclusión	40
5.6.1	Preparación de los complejos de inclusión por la técnica de precipitación.....	40
5.6.2	Determinación de la morfología y diámetro por SEM de los complejos de inclusión. ...	40
5.6.3	Espectroscopia FTIR de los complejos de inclusión	40
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
6.1	Optimización del proceso de electrohilado	42
6.1.1	Solución polimérica.....	42
6.1.4	Análisis de color	49
6.3	Caracterización estructural	50
6.3.1	Espectroscopia FTIR	50
6.4	Incorporación del aceite esencial a las soluciones poliméricas empleadas para la obtención de las nanofibras.....	58
6.4.2	Capacidad antioxidante.....	60
6.4.3	Microscopia Electrónica de Barrido de los complejos de inclusión.....	62
6.4.5	Formación de las películas electrohiladas con el complejo de inclusión	67
8	BIBLIOGRAFÍA.....	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Composición nutricional de la pula de yaca	3
Tabla 2	Contenido de proteína en la harina de yaca (HSY) , aislado proteico de semilla de yaca (APSI) y aislado proteico tratado con ultrasonido (APYU)	5
Tabla 3	Composición de aminoácidos y calidad nutritiva del aislado proteico de semilla de yaca tratada con ultrasonido (APJU)	6
Tabla 4	Condiciones para el desarrollo de nanofibras de aislados proteicos.	17
Tabla 5	Películas comestibles y aceite esencial empleado	28
Tabla 6	Componentes del aceite esencial empleado (Sarrou et al 2013).	32
Tabla 7	Actividad antimicrobiana de la hoja Citrus aurantium de la cascara inmadura, madura y antibióticos por el método de difusión en disco (Diametro en cm). (Azhdarzadeh et al 2016).	33
Tabla 8	Condiciones del electrohilado	44
Tabla 9	Propiedades fisicoquímicas de las soluciones a electrohilar	46
Tabla 10	Parámetros de color	49
Tabla 11	Componentes del aceite de naranja amarga (Citrus aurantium).	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Efecto del pH en la solubilidad de proteína de la harina de la semilla de yaca (Modificada de Ulloa, 2017).....	4
Figura 2 Efecto del pH en la solubilidad del aislado proteico de la semilla de yaca (Modificado de Ulloa, 2017).....	5
Figura 3 Perfiles de SDS-PAGE de las fracciones proteínicas de la harina desengrasada de semilla de jaca en condiciones no reductoras (a) y reductoras (b). Línea M, marcadores proteínicos estándar con pesos moleculares entre 6,5–200 kDa; Línea 1, fracción albúmina; Línea 2, fracción globulina; Línea 3, fracción prolamina; Línea 4, fracción glutelina (Ulloa et al., 2017).....	6
Figura 4 Efecto del pH en la actividad emulsificante y estabilidad de la emulsión del aislado proteico de semilla de yaca (modificado de Ulloa, 2017).....	8
Figura 5 Efecto del pH en la concentración mínima de gelación del aislado proteico de semilla de yaca (modificado Ulloa, 2017).....	9
Figura 6 Efecto del pH en la capacidad espumante y estabilidad de la espuma del aislado proteínico de semilla de jaca (Modificado de Ulloa, 2017).....	10
Figura 7 Componentes básicos del electrospinning.....	12
Figura 8 Variables críticas en el electrohilado.....	13
Figura 9 Mecanismo propuesto de electrohilado. La ruta A describe la (ruta ideal para proteínas parte superior), una ruta que se aplica en un disolvente ideal: la proteína desnaturalizada, se disuelve y se puede hacer girar. Cuando el solvente no es ideal, los agregados de proteína desnaturalizados y el hilado no es posible (parte inferior de la ruta A). La ruta B muestra la aplicación de un acarreador para hacer girar una proteína que por sí misma es imposible de lograr. Modificado de (Nieuwland et al., 2013).....	16
Figura 10 Representación de las películas comestibles y el recubrimiento. Modificado de (Otoni et al., 2017).....	19
Figura 11. Diferencia entre electrospinning/ film casting de zeína/gelatina (Modificado de Deng, 2017). 23	
Figura 12 Aspecto visual de películas a base de amaranto. Películas fundidas (A) API, (B) API+CNC (5%), (C) API+CNC (10%), (D) API+CNC (20%). Películas centrifugadas obtenidas que contienen 5%(E-G), 10%(H-J) o 15% API (K-M) y 25% (E,H,K), 50% (H-J) o 100 capas (K-M) (López-Rubio et al. 2020),.....	24
Figura 13 Fabricación de nanofibras electrohiladas cargadas con aceites esenciales para el envasado activo de alimentos. (a) Extracción de aceites esenciales (b) Complejamiento e incorporación de solución de electrohilado (c) Electrohilado de la solución compuesta. Modificada de (Ataei et al. 2020).	25
Figura 14. Ilustración esquemática de SiO ₂ -eugenol encapsulado en liposomas. Modificado de (Liu et al. 2016).....	27
Figura 15 Terpenos presentes en aceites esenciales.....	30
Figura 16 Concentraciones de aislados proteicos de yaca (10, 12 y 15%).....	42
Figura 17 Influencia del tensoactivo y del polímero en el proceso del electrohilado izq a der solución de aislado proteico al 10%,, solución polimérica de aislado proteico y pululano al 10%, solución polimérica al 10% aislado, pululano 10% Tween 80 al 10 y 20%.....	43
Figura 18 SEM películas electrohiladas de aislado proteico de yaca obtenidas a partir de diferentes concentraciones (10-12%) a) 15 000X, b) 10 000X c) 5000X.	48
Figura 19 Espectroscopia FTIR del aislado proteico de yaca.....	51
Figura 20 Deconvoluciones del aislado proteico de yaca.....	52
Figura 21 Deconvoluciones de la mezcla física aislado proteico/pululano (1:1).....	53
Figura 22 Espectro FTIR el pululano (Chen et al 2015).	54
Figura 23 Deconvoluciones de las películas electrohiladas. a) 10% (80:20), b) 10% (60:40), c) 12% (80:20).	

.....	55
Figura 24 Estructuras secundarias en las películas.	56
Figura 25 Termogramas obtenidos de aislado proteico de yaca (verde), pululano (azul), mezcla física (café), película 10% 80:20 (menta), película 10% 60:40 (rosa) y película 12% (azul).	57
Figura 26 Cromatograma del Limoneno (izquierda) y alfa y beta pineno (derecha).....	60
Figura 27 Capacidad antioxidante por DPPH en diferentes medios. DMSO (azul) y Etanol (naranja)	61
Figura 28 2a derivada del espectro entre los complejos de inclusión	67
Figura 29 MEB de las películas electrohiladas con el complejo de inclusión a) 10% aislado proteico:beta ciclodextrina b) 10% (80:20) 2% complejo 1:1 c) 10% (60:40) 2% complejo 1:1 d) 12% (60:40) 2% complejo 1:1.....	68
Figura 30 Comparación en el diámetro de la nanofibras (azul), nanofibras con complejos de inclusión (anaranjado) y fibras con ciclodextrinas.	69

1 INTRODUCCIÓN

La yaca es una fruta climatérica que se considera el fruto más grande del mundo llegando a pesar 25 Kg en promedio, produciéndose principalmente en países asiáticos como: India, Indonesia y Tailandia. En México el cultivo de yaca cuenta con una superficie aproximada de 1,249 hectáreas y una producción anual de 16,816 toneladas siendo Nayarit el principal estado productor seguido de Veracruz y Jalisco.

Se han dado muchos usos a este fruto en diversas áreas industriales en las que resalta la alimentaria, cosmética y farmacéutica. En alimentos se han elaborado productos de confitería, helados, tes, jaleas y recientemente carne vegana. Sin embargo, al ser el fruto muy grande este genera muchos subproductos como lo son: cascara, hojas y semillas. El contenido de semilla por yaca promedio es alrededor de 15-18 % constituida principalmente por almidón y proteínas. Estas últimas representan del 17.8- 37 % con respecto a la semilla y han despertado mucho interés por sus propiedades fisicoquímicas y su potencial uso como aditivo a ingrediente nutraceútico.

Dentro de sus propiedades nutraceúticas resaltan su baja capacidad de absorción de agua y grasas, lo que ayuda a prevenir la obesidad, por su alto contenido de arginina y serina puede ser utilizada en alimentos para adultos mayores y se ha observado que pueden tener una actividad neurocognitiva, para tratar el estrés mental y la ansiedad.

En cuanto a sus propiedades tecnofuncionales se ha observado que sus capacidades emulsificantes y espumantes son superiores a las de otras proteínas como las de jitomate, guayaba y frijol, lo cual pueden ser utilizadas en la industria cárnica y de panificación.

Por otro lado, hay muy poco reportado en cuanto a la elaboración de películas electrohiladas a base de proteína vegetales, por lo que en este proyecto se elaboró una película a base de aislado proteico de semilla de yaca mediante la técnica de electrohilado incorporando complejos de inclusión de β - ciclodextrina y aceite esencial de naranja como activo con propiedades antimicrobianas. Los complejos de inclusión, así como las películas se caracterizaron fisicoquímicamente y finalmente se evaluó la eficacia antimicrobiana de la película contra *Salmonella* entérica y así proponer una alternativa para la conservación de alimentos.

2 ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de la yaca

Existen dos variedades de yacas: una es pequeña, fibrosa, blanda con carpelos dulces y textura cruda mientras que la otra variedad es crujiente pero no muy dulce, sus semillas son grandes y comestibles, aunque son difíciles de digerir. Una sola semilla está encerrada en un arilo blanco que rodea al endospermo, que cubre el cotiledón blanco carnoso. Los cotiledones de yaca son bastante ricos en almidón y proteínas (Chávez-Santiago et al.,2020).

Tradicionalmente se le atribuyen propiedades medicinales como antiasmáticas, antidiarreicas, antihelmínticas, antihipertensivas y antioxidantes. Se ha descrito en la literatura que la yaca demuestra actividades antioxidantes, anti-inflamatorias, antibacteriales, anti-cancerígenas e hipoglucemiante (Fang, Hsu & Yen, 2008; Jagtap & Bapat, 2010; Omar et al., 2011; Zhang et al., 2018; Zhu et al, 2018; Burci et al., 2019, Liu, et al., 2020).

Sin embargo, a pesar de que es un fruto con muchas propiedades benéficas al organismo, algunos problemas que presenta es su vida corta de anaquel, las condiciones ambientales a mantener durante su cosecha y el transporte, ya que al ser un fruto muy grande este puede sufrir daños mecánicos además de que el latex puede contribuir a su deterioro. Para aumentar su vida de anaquel se han buscado diversas tecnologías como, por ejemplo, atmósferas controladas, deshidratación, cadena de frío, uso del 1-metil ciclopropano y recubrimientos poliméricos (goma Xantana, alginatos). Se ha logrado alargar su vida de anaquel en 14 días (Ajayi et al, 2018).

La composición nutrimental de la pulpa difiere según la variedad de la yaca; puesto que se ha reportado que depende del genotipo, tamaño del árbol, forma de la hoja y de la maduración. La tabla 1 resume la composición nutrimental promedio (Ranasinghe et al.,2019).

Tabla 1 Composición nutricional de la pula de yaca

Composición	Yaca verde	Yaca madura
Agua (g)	76.5 – 85.2	72.0 – 94.0
Proteína (g)	2.0 – 2.6	1.2 – 1.9
Grasas (g)	0.1 – 0.6	0.1 – 0.4
Carbohidratos (g)	9.4 – 11.5	16.0 – 25.4
Fibra (g)	2.6 – 3.6	1.0 – 1.5
Azúcares totales (g)	--	20.6
Minerales totales (g)	0.9	0.97 – 0.9
Calcio (mg)	30.0 – 73.2	20.0 – 37.0
Magnesio (mg)	--	27.0
Fosforo (mg)	20.0 – 57.2	38.0 – 41.0
Potasio (mg)	287 - 323	191 – 407
Sodio (mg)	3.0 – 35.0	2.0 – 41.0
Hierro (mg)	0.4 – 19.0	0.5 – 1.1
Vitamina A (IU)	30	175 – 540
Tiamina (mg)	0.05 – 0.15	0.03 – 0.09
Riboflavina (mg)	0.05 – 0.2	0.05 – 0.4
Vitamina C	12.0 – 14.0	7.0 – 10.0
Otros (mg)	50.0 -210.0	88.0 – 410.0

2.2 Semillas de yaca

Los subproductos principales de la yaca son la cáscara y las semillas. Daud, et al (2018) en extractos orgánicos de cáscara identificaron por HPLC-MS-TOF la presencia de ácido protocatequico, ácido quínico, ácido clorogénico, gentiopicrosido, isovitexina, y luteolina, entre otros metabolitos. Las semillas de yaca tienen altos contenidos de almidón (60 %) y proteína (17.8-37 %). El almidón es rico en amilosa (26.5-38.3 %) y sus propiedades térmicas, cristalográficas y de textura han sido estudiadas (Madruga et al., 2014, Zhang, et al., 2017). Las propiedades espesantes y estabilizantes del almidón de yaca fueron evaluadas en la preparación de una salsa picante (Rengsutthi y Charoenrein, 2011) y la digestibilidad in vitro del almidón fue mejorada mediante un proceso de extrusión (Li, et.al., 2021).

Las semillas de yaca contienen entre 17.8 –y 37.0% de proteína siendo los aminoácidos mayoritarios arginina, cisteína, histidina, leucina, metionina, treonina y triptófano (Swami et al., 2012).

Las proteínas presentes en la harina desengrasada a partir de semilla de yaca están compuestas principalmente de glutelinas (683.6 + 34.2 g/Kg proteína) que son polipéptidos de 15 – 20 KDa solubles en NaOH 0.1 N, albuminas (183.6 + 8.2 g/Kg proteína) solubles en agua; globulinas solubles en NaCl (113.0 + 5.6 g/Kg) y finalmente las prolaminas solubles en etanol (19.8 + 0.8 g/Kg) (Figura 1).

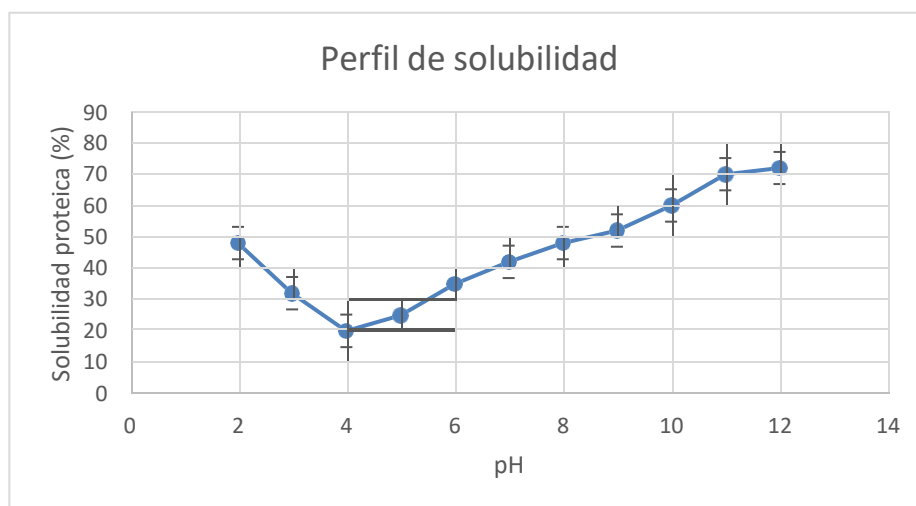


Figura 1 Efecto del pH en la solubilidad de proteína de la harina de la semilla de yaca (Modificada de Ulloa, 2017).

En la Figura 1 se aprecia, la solubilidad máxima de las proteínas presentes en harina de la semilla se da a pH 12 donde alrededor del 80% es soluble debido al alto contenido de glutelinas. Por otro lado, el porcentaje mínimo se da a pH 4.0 por ser su punto isoeléctrico donde solamente el 19.4% se mantiene soluble (Chrips et al., 2008).

Por otro lado, la solubilidad del aislado proteico de la semilla de yaca es muy similar al de la proteína total de la harina (Figura 2). Puesto que a condiciones acidas de pH= 4.0 se acerca a su punto isoeléctrico, donde la mayoría del aislado proteico tiende a precipitar y alrededor del 5.2% se mantiene soluble. A pH 7.0 el 44% esta soluble y al tener un pH=11 el 94.4% de la proteína solubiliza ya que en estas condiciones las interacciones electroestáticas son mayores con el medio porque la proteína se encuentra desnaturalizada (Ulloa et al., 2017).

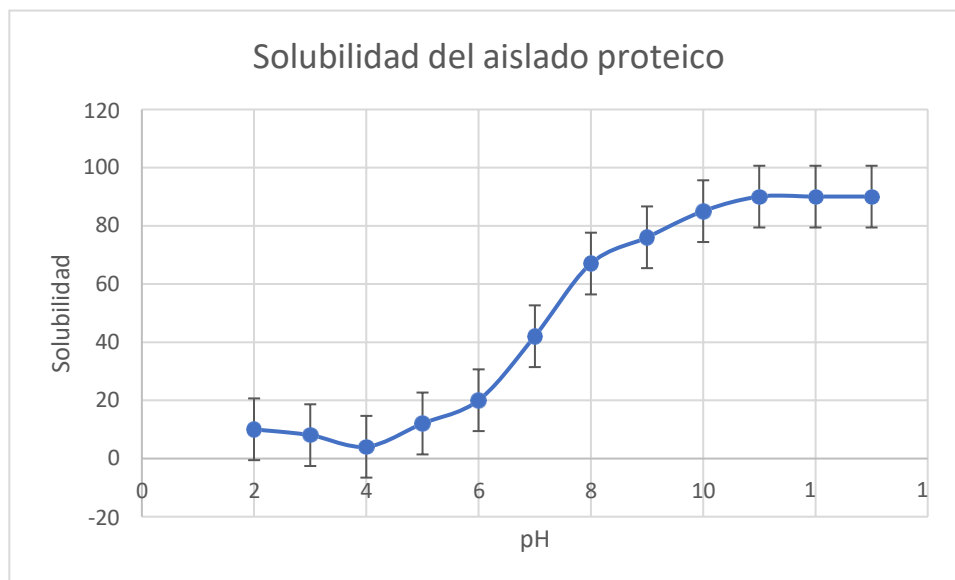


Figura 2 Efecto del pH en la solubilidad del aislado proteico de la semilla de yaca (Modificado de Ulloa, 2017).

Además, se han hecho estudios para someter el aislado proteico a tratamientos físicos con la finalidad de poder mejorar los porcentajes de rendimiento. Resendiz (2019) reportó el contenido de proteína en semilla de yaca al ser sometido a ultrasonido con la finalidad de conocer si dicha composición se modificaba con los tratamientos sometidos.

Tabla 2 Contenido de proteína en la harina de yaca (HSY), aislado proteico de semilla de yaca (APSI) y aislado proteico tratado con ultrasonido (APYU)

Componente	JSF	JSPI	JPIU
Proteína (N× 6.5) (g/kg)	140.4 ± 2.5	844.3 ± 7.0	952.1 ± 0.1

Para determinar el peso molecular de las proteínas que conforman los aislados proteicos de yaca se han llevado a cabo estudios en electroforesis SDS Page en condiciones reductoras y no reductoras donde se analizan las cuatro familias de proteínas presentes en la semilla. Se demostró que no hay cambio significativo al someterlas a dichas condiciones concluyendo que el peso molecular de las glutelinas es alrededor de los 15 – 20 kDa, las globulinas son de distintos pesos moleculares 32, 29, 21, 19, 15 y 20 kDa, donde la mayoría son de 15 y 20 kDa. En el caso de la familia de albuminas al igual hay de distintos pesos moleculares de 32, 29, 23, 19 y 15 kDa y las prolaminas no se detectaron debido a su baja solubilidad y a la posible degradación

durante el tratamiento electroforético.

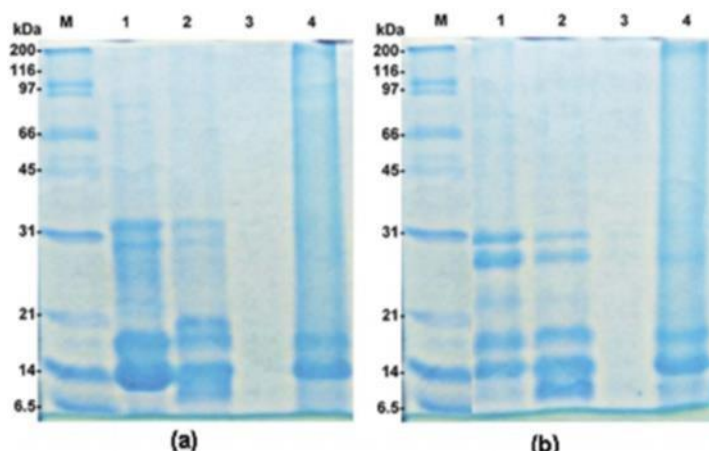


Figura 3 Perfiles de SDS-PAGE de las fracciones proteínicas de la harina desengrasada de semilla de jaca en condiciones no reductoras (a) y reductoras (b). Línea M, marcadores proteínicos estándar con pesos moleculares entre 6,5–200 kDa; Línea 1, fracción albúmina; Línea 2, fracción globulina; Línea 3, fracción prolamina; Línea 4, fracción glutelina (Ulloa et al., 2017).

En cuanto al contenido de aminoácidos presentes en las proteínas Azeez, Lasekan, Jinap, & Sulaiman, (2015) reportaron que la proporción de aminoácidos no esenciales es mayor que el de los esenciales, por lo que han concluido que la semilla no es tan buena fuente de nutrientes esenciales (Azeez et al., 2015). En la tabla 3 se muestra la cantidad de aminoácidos presentes al igual que la cantidad sugerida en adultos según la FAO y la OMS (FAO,1991).

Tabla 3 Composición de aminoácidos y calidad nutritiva del aislado proteico de semilla de yaca tratada con ultrasonido (APJU)

Aminoácido	Aislado proteico de yaca (g/ 16 g N)	Calidad nutritiva	FAO/OMS recomendaciones por adulto
Aminoácidos esenciales			
Lisina	5.72 ± 0.10	104.00 ± 4.45	5.5
Metionina +	7.06 ± 0.07	201.71 ± 7.83	3.5
Cisteína	6.48 ± 0.05		
Treonina	5.79 ± 0.08	144.75 ± 6.39	4.0
Isoleucina	3.21 ± 0.07	80.25 ± 3.85	4.0
Triptofano	No determinado	No determinado	1.0
Valina	3.80 ± 0.07	76.00 ± 3.79	5.0
Leucina	6.89 ± 0.05	98.43 ± 2.79	7.0

Fenilalanina	+	15.96 ± 0.08	266.00 ± 7.24	6.0
Tirosina				
Fenilalanina		7.64 ± 0.07		
Aminoácidos esenciales totales		48.43 ± 0.12		
Aminoácidos no esenciales				
Arginina		12.24 ± 0.06		
Acido aspártico		7.58 ± 0.05		
Serina		9.99 ± 0.09		
Acido glutámico		8.23 ± 0.06		
Prolina		2.13 ± 0.07		
Glicina		5.27 ± 0.09		
Alanina		4.06 ± 0.05		
Histidina		2.07 ± 0.04		
Aminoácidos no esenciales totales		51.57 ± 0.14		
PER predicho		2.36 ± 0.07		

Se puede observar que los aminoácidos más abundantes son los aromáticos seguido de los azufrados, ambos tipos se encuentran en cantidades más elevadas que las recomendadas por la FAO/OMS en una dieta para adultos. Según los estándares que se reportan, la semilla de yaca posee un contenido balanceado en aminoácidos y hasta un 2.36 % más en comparación con otros como el de garbanzo kabuli, (2.29%) garbanzo desi (2.14%) y soya (2.04%).

2.3 Propiedades funcionales del aislado proteico de yaca

Una vez ya extraídos y caracterizados los aislados proteicos obtenidos de la semilla de yaca, Ulloa et al, (2017) estudiaron las propiedades funcionales, dentro de las que destacan: capacidad emulsificante, absorción de agua y aceite, formador de espuma y poder gelificante.

La capacidad de absorber agua de estas proteínas es grande ya que su valor es de 6.46 mL/g con respecto a las proteínas de semilla de nuez (3.22 mL/g) y de sandía de las variedades sugar baby (3.57 mL/g) y Mateera (3.13 mL/g). Esto se debe a los abundantes grupos funcionales aminos en la superficie de las proteínas promueven la formación de puentes de hidrógeno con el agua. Esta propiedad permite su uso como modificador reológico o agente espesante en productos como sopas, panificación, natillas, etc.

Cabe mencionar que su capacidad para poder absorber aceite también es elevada (6.07 mL/g). En comparación a la de semilla de nuez (1.86 mL/g), sandía de las variedades sugar baby (2.32 mL/g) y Mateera (2.49 mL/g), semilla de guayaba (3.2 mL/g) y jitomate (4.04 mL/g) es mucho mayor esta propiedad; dada la composición química de la proteína de yaca donde la mayoría de aminoácidos son aromáticos, se favorecen las interacciones no polares logrando así que la capacidad de absorber aceite o grasa sea eficiente pudiéndose utilizar como agentes encapsuladores de sabores y olores en la industria cárnica y en panificación.

Por otra parte, la actividad emulsificante y capacidad de poder generar emulsiones estables se favorece en un intervalo de pH 4- 10. Lo cual indica que este tipo de proteínas tienen elevada actividad de superficie con respecto a otras como la de jitomate cuyos valores son de 36.4% y 34.9% respectivamente.

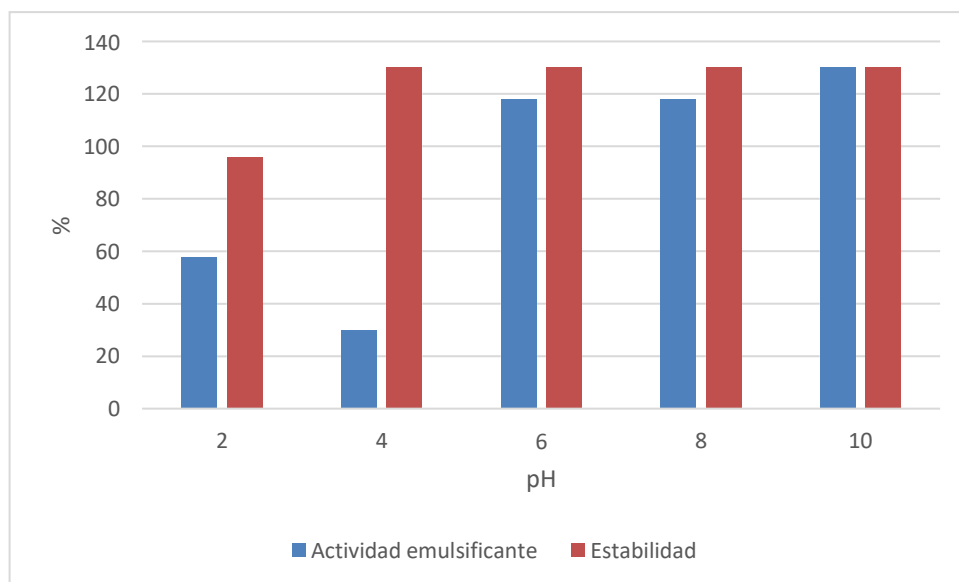


Figura 4 Efecto del pH en la actividad emulsificante y estabilidad de la emulsión del aislado proteico de semilla de yaca (modificado de Ulloa, 2017).

En la Figura 4, se grafica la tendencia de la actividad y la capacidad estabilizante de la proteína de yaca donde se observa que a partir de un pH de 6.0 estas propiedades son elevadas y se mantienen constantes a pH alcalinos mientras que a pH= 2.0 se ven disminuidas, debido a la baja solubilidad de la proteína. Sin embargo, a un pH= 4.0 la actividad emulsificante disminuye drásticamente pues es muy probable que se deba al punto isoeléctrico, mientras que la capacidad

estabilizante aumenta, esto se puede deber a que una forma de estabilizar emulsiones es mediante la formación de partículas finas que tienden a orientarse en la interfase (emulsiones Pickering), que se pueden formar mediante la agregación y la posterior precipitación de la proteína.

A pesar de sus grandes capacidades absorbentes y estabilizantes, la proteína de yaca tiene un bajo poder emulsificante siendo de 32.36 mL/g comparándolo con otras proteínas como la de jitomate (115 mL/g) o sésamo (164-169 mL/g). En cuanto a sus propiedades gelificantes la concentración mínima es 9 % a un pH de 6.0 el cual es muy similar en comparación a la proteína de garbanzo (14 – 18%), concentrado de proteína de frijol del norte (8%), caupí (12%), aislado de proteína de frijol mungo (10%), proteína de semilla de altramuza (14%) y mayor que al de cártamo (2%).

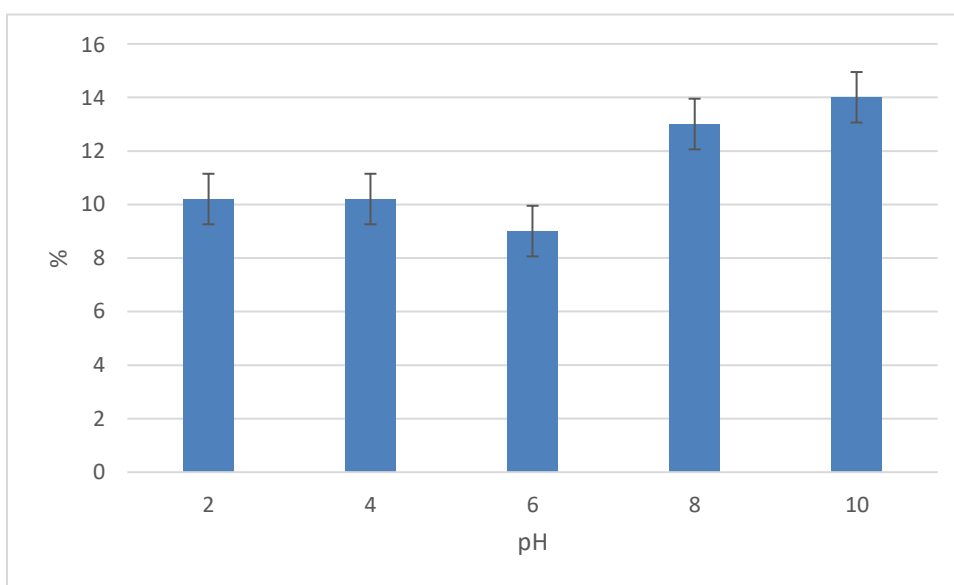


Figura 5 Efecto del pH en la concentración mínima de gelación del aislado proteico de semilla de yaca (modificado Ulloa, 2017).

La figura 5 representa las concentraciones mínimas de gelificación a diferentes pH, donde se puede apreciar que a un pH de 6.0 es la menor. Es decir, para poder formar esa red tridimensional y la desnaturalización parcial es recomendable trabajar a ese pH debido a que se requiere menor cantidad de proteínas para lograr este efecto. Se podría ver una relación entre la solubilidad y el poder gelificante debido que a pH alcalino es donde la proteína se encuentra

más soluble. Por ende, es más complicado poder formar un sistema gelificado mientras que a pH ácidos la proteína tiende a precipitar y a no presentar cargas netas y la concentración gelificante alcanzada es menor.

En cuanto a la capacidad de formar espuma y a la estabilidad de la misma, las proteínas de yaca son dependientes de pH, donde a pH ácidos (4 – 6) los valores reportados son muy bajos (13 y 68%, respectivamente). Sin embargo, a pH alcalinos alrededor de 10 es donde se presentan las mejores propiedades espumantes (254%) y mayor estabilidad (164%) ya que las proteínas son más solubles, presentan mayor número de cargas en su superficie y se mejora su actividad superficial aire/agua.

Las proteínas de yaca presentan mejores propiedades espumantes y son más estables en comparación con las proteínas de guayaba (50 y 40%) y jitomate (64.9 y 66.3%) por lo que pueden ser un potencial agente aditivo en la formulación de helados, panes, pasteles, cremas, cárnicos y dulces.

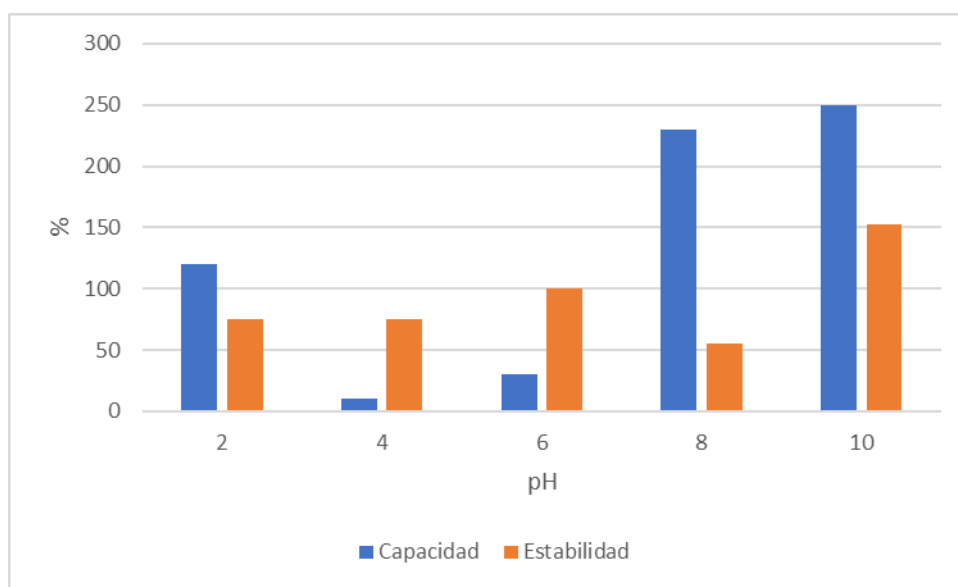


Figura 6 Efecto del pH en la capacidad espumante y estabilidad de la espuma del aislado proteínico de semilla de jaca (Modificado de Ulloa, 2017).

Como se puede apreciar la capacidad espumante y la durabilidad de la misma es dependiente del pH obteniéndose los mejores resultados a pH=10 al igual que a pH ácidos esta capacidad se ve drásticamente reducida y más a pH=4.0 que es su punto isoeléctrico; es importante

mencionar esto porque si esta proteína se utilizara con el fin de fabricar un alimento, es crucial que el pH del mismo no sea menor a 8.0 ya que de lo contrario empezaría a tener problemas por lo que esta sería la principal limitación.

2.4 Electrohilado

La técnica del electrohilado tuvo su origen en el siglo XIX en la fabricación de fibras submicromicas para aplicación textil, posteriormente se empezó a diversificar a otras industrias como la farmacéutica, cosmética, alimentaria, electrónica, materiales, empaques entre otras, debido a las grandes ventajas que se adquieren (Figen, 2020).

Entre estas ventajas resaltan su capacidad para incorporar activos térmicamente inestables en condiciones ambientales, es escalable, económico, sencillo y versátil. El material por el que pueden ser fabricadas las nanofibras es variado llegándose a utilizar polímeros, metales, óxidos metálicos, cerámicas, sustancias orgánicas e inorgánicas y materiales compuestos.

Esto se puede lograr alterando las propiedades de la solución (concentración, viscosidad, tensión superficial, conductividad), metodología (distancia de la bomba, velocidad, forma de la aguja) y condiciones ambientales del proceso (temperatura, humedad relativa). También es posible controlar el diámetro de las nanofibras, que juega un papel vital en las propiedades funcionales de los materiales utilizados en diversas aplicaciones (Okutan et al., 2014).

El equipo de electrohilado requiere de algunos componentes indispensables para la formación de las nanofibras: bomba de infusión, fuente de poder, y colector metálico (Figura 7) Esta técnica puede ser resumida en tres pasos: iniciación del microchorro (jet), elongación y solidificación del material (Raval et al 2019).

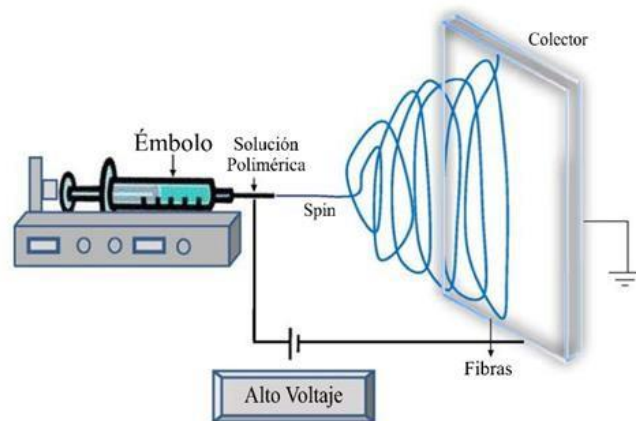


Figura 7 Componentes básicos del electrohilado

2.5 Parámetros considerados durante el proceso de electrohilado.

En particular, el electrohilado emplea altas diferencias de potencial para producir un campo eléctrico fuerte, que es aplicable entre dos polos opuestos conformados por un sistema de inyección y un sistema colector (el cual está a potencial 0), donde se depositan las fibras con diámetros nanométricos. La dispersión polimérica previamente preparada se carga en una jeringa de inyección que se conecta a una aguja. Una bomba de infusión unida al émbolo de la jeringa ejerce una presión y un flujo constante a través de la aguja. Por efecto de la polarización y las cargas originadas por el campo eléctrico. La dispersión es arrojada en forma de chorros hacia una placa conductora conectada a tierra, a una distancia de 5 a 30 cm, del cono de la aguja.

Las cargas en la superficie de la dispersión aumentan al incrementar el campo eléctrico hasta un valor umbral en el cual se desestabiliza su forma, que pasa a ser parcialmente esférica a cónica al que se le denomina el cono de Taylor. Alcanzando un voltaje crítico, la generación del chorro o jet se produce cuando la fuerza de repulsión supera a la tensión superficial. Durante la expulsión del polímero a través de la aguja el disolvente gradualmente se evapora y el producto obtenido se deposita en forma de manta de fibra no-tejida compuesta de NFs con diámetros de unos pocos nanómetros a unas pocas micras. El proceso de electrohilado puede resultar en fibras, gotas (electroatomizado) o no tener lugar. De hecho, se le puede considerar una variación del proceso conocido como “electrospray”. En algunos casos se produce una mezcla de electroatomizado y electrohilado (Rodoplu et al, 2012).

Al trabajar con polímeros es muy importante considerar algunos aspectos como naturaleza del polímero (hidrofílico o hidrofóbico), naturaleza acida o básica (pka), tensión superficial, ya que no todos son susceptibles a ser procesados por electrohilado (Xue et al., 2019)

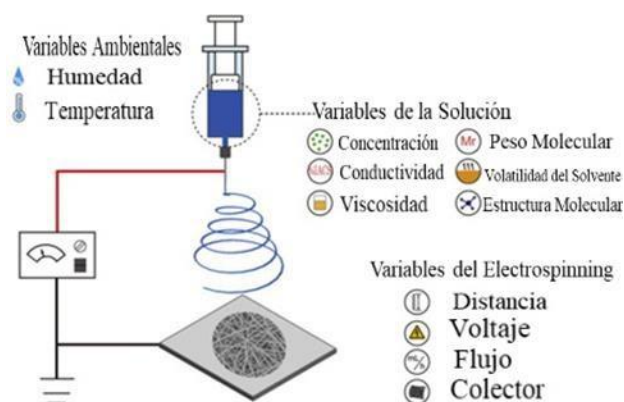


Figura 8 Variables críticas en el electrohilado.

Mientras un polímero pueda ser electrohilado en NFs, los objetivos ideales serían: 1) que el diámetro de las fibras sea consistente y controlable, 2) la superficie no debe de tener defectos o con defectos controlables y 3) NFs continuas sean colectadas. Aunque no siempre se logran dichos objetivos. El disolvente y el peso molecular del polímero son los que definen las propiedades reológicas y eléctricas de la dispersión polimérica. Sin embargo, todavía no existe un desarrollo matemático que interrelacionen todos los parámetros implicados en el proceso (Figura 8).

Un factor inherente importante de la dispersión polimérica es su constante dieléctrica ya que cuanto mayor es la constante dieléctrica de la solución, con más facilidad se obtendrán fibras uniformes y de menor diámetro medio. La constante dieléctrica de una solución se puede variar reemplazando el disolvente o una fracción por uno con mayor o menor constante dieléctrica. Un disolvente con una constante dieléctrica alta puede mejorar la conductividad al facilitar la disolución de las cadenas poliméricas cargadas lo que reduciría la necesidad de emplear altos voltajes eléctricos. A mayor polaridad del disolvente se obtienen de menor diámetro.

Cabe mencionar que se debe de tomar en cuenta la viscosidad de la dispersión ya que al aumentarla ayuda a obtener un microchorro estable y por lo tanto fibras libres de gotas. La viscosidad de la dispersión se puede aumentar incrementando el peso molecular del polímero, la concentración de la solución polimérica, o incluso también con el agregado de polielectrolitos en pequeñas cantidades que permiten incrementar la viscosidad sin modificar la concentración. Cuando la viscosidad de la solución es muy baja, el fenómeno de “electroatomizado” puede ocurrir y se forman partículas en lugar de fibras (Higashi et al., 2020).

La conductividad de la dispersión polimérica es fundamental en la producción de fibras por electrohilado debido que, al aumentar más cargas pueden ser transportadas por el chorro y mayor estiramiento e inestabilidad tendrá el flujo, además de reducir la necesidad de emplear altos voltajes eléctricos. Esto se logra agregando partículas conductoras o iones a la solución o seleccionando un disolvente con mayor polaridad.

Ya una vez establecido, adecuado y estandarizado estos parámetros para obtener las nanofibras se deben de considerar los factores del proceso y ambientales ya que de no ser considerados las propiedades de las nanofibras cambiarán a pesar de ya haberlas establecido previamente (Park et al., 2008).

Se ha demostrado que al aumentar el voltaje se producen mayores cargas superficiales, lo que favorece el afinamiento del microchorro, resultando en fibras de menor diámetro. Sin embargo, una tensión alta aplicada también produce la evaporación más rápida del disolvente y en consecuencia puede suprimir etapas de estiramiento y disminución del diámetro del microchorro, obteniéndose en algunos casos fibras de mayor tamaño del esperado.

El efecto de un voltaje alto no sólo afecta la apariencia física de las fibras, sino también la cristalinidad de la fibra. El campo electrostático puede causar mayor orden de las moléculas del polímero durante el proceso y de esta manera inducir un estado cristalino en la fibra. Sin embargo, por encima de cierto voltaje, la cristalinidad es reducida (Zhang et al., 2018).

A un voltaje establecido corresponde una velocidad de flujo. Cuando la velocidad de flujo se incrementa, hay un aumento correspondiente del diámetro de la fibra. Bajos flujos de alimentación son más deseables ya que permiten que el disolvente tenga un mayor tiempo para

su evaporación.

2.6 Electrohilado de proteínas

Se han hecho diversos estudios (Aziz, Neo, Lopez-Rubio et al 2010) donde se han obtenido nanofibras a base de biomoléculas como: polisacáridos (almidón, celulosa, quitosano) y proteínas de distintas fuentes como amaranto, gelatina, albumina, chicharo. Sin embargo, la principal limitante en las proteínas es la complejidad de su estructura secundaria y terciaria puesto que se deben de tomar en cuenta diversos factores como: estado de agregación, solubilidad, desnaturalización, puentes disulfuro intra/intermoleculares, además de escoger solventes adecuados que no comprometan su integridad y funcionalidad (Wang et al., 2019).

En el caso de las proteínas globulares estas tienen muy poca interacción entre sí para enredarse durante el electrohilado, dificultando el proceso. Se ha reportado que para poder tratar este problema es necesario utilizar reactivos que tengan la capacidad de poder solubilizar este tipo de proteínas cambiando su conformación y modificando las interacciones intramoleculares; como el hexafluoro-2-propanol (HFP), trifluoroetanol (TFE) y algunos ácidos concentrados como el ácido fórmico, ácido acético 40%. Sin embargo, estos disolventes están prohibidos para su aplicación en la industria alimentaria.

Una forma de poder tratar esta dificultad es mediante la adición de un acarreador en bajas concentraciones (hasta un 2%) que fácilmente se pueda electrohilar y mezclar con las proteínas globulares (Figura 10). Algunos ejemplos son: óxido de polietileno (PEO), polivinil pirrolidona (PVP) o el más utilizado, el alcohol polivinílico (PVA) que es compatible con la proteína de soya, elastina, y colágeno. Aunque hoy en día se ha optado por utilizar acarreadores naturales como la zeína, gelatina o el pululano.

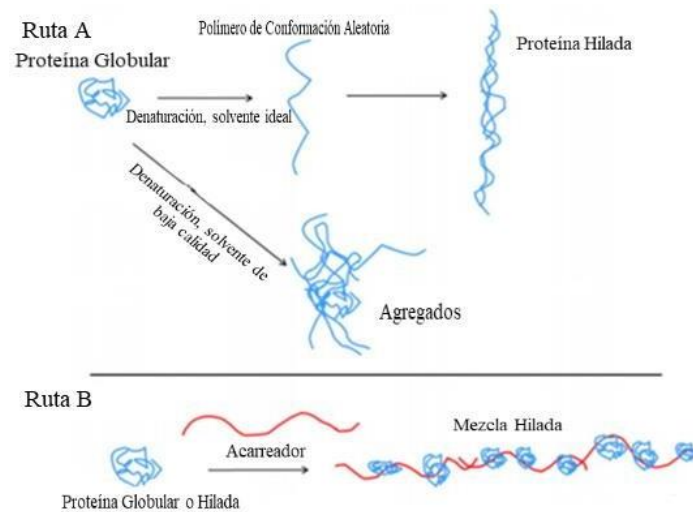


Figura 9 Mecanismo propuesto de electrohilado. La ruta A describe la (ruta ideal para proteínas parte superior), una ruta que se aplica en un disolvente ideal: la proteína desnaturalizada, se disuelve y se puede hacer girar. Cuando el solvente no es ideal, los agregados de proteína desnaturalizados y el hilado no es posible (parte inferior de la ruta A). La ruta B muestra la aplicación de un acarreador para hacer girar una proteína que por sí misma es imposible de lograr. Modificado de (Nieuwland et al., 2013).

Al utilizar este tipo de acarreadores es importante que tanto las proteínas globulares como el acarreador sean solubles en el mismo disolvente ya que es común que el acarreador sea soluble pero las proteínas no o viceversa. Un ejemplo común es la zeína la cual es soluble en alcohol, pero muchas proteínas como la ovoalbúmina o la elastina no lo son, lo cual restringe su uso. En el caso de la gelatina esta se dispersa en agua caliente al igual que las proteínas. Sin embargo, se debe de llevar a cabo el electrohilado a esas temperaturas ya que si se enfría la dispersión aumenta la viscosidad y por ende las nanofibras no se pueden formar (Nieuwland et al., 2013).

Asimismo, se ha optado por utilizar proteínas de origen vegetal debido a que son más fáciles de obtener, son más económicas, se obtienen buenos rendimientos, no requiere sacrificio animal, amigable con el medio ambiente, y le da valor agregado. Proteínas de amaranto, calabaza, gluten, zeína, etc., se han evaluado para conocer su capacidad de formar películas, envases, estabilizantes, agentes encapsuladores, obteniéndose resultados prometedores (Tabla 4).

Tabla 4 Condiciones para el desarrollo de nanofibras de aislados proteicos.

Polímero	Reticulante	Condiciones	Propiedades	Referencias
Amaranto	Pullulano Tween 80	Concentración del polímero: 20% Solvente: ácido fórmico 95% Voltaje: 22 – 15 Kv Velocidad: 0.24 mL/hr Temperatura: 24 °C y 36 % HR Distancia: 10 cm	Viscosidad: 312.7 – 560.5 cP Conductividad eléctrica: 30.9 – 32.1 mS/cm Morfología: fibras Diámetro: 266.6 – 352.2 nm Caracterización: Propiedades ópticas Formación de película Resistencia a la humedad y rotura.	(López-Rubio et al., 2020)
Zeína	Ciclodextrinas Timol	Concentración del polímero: 25, 30% Solvente: etanol Voltaje: 12 – 18 Kv Velocidad: 0.3 – 2.0 mL/hr Temperatura: 21 °C Distancia: 10 – 16 cm Humedad: 58%	Viscosidad: 142.49 – 358.05 cP Conductividad eléctrica: 30.9 – 32.1 mS/cm Morfología: fibras Diámetro: 283.0 – 910.0 nm Caracterización: Reología (reograma) Microscopia (MEB).	(Neo et al., 2013)
Gluten	PVA	Concentración del polímero: 5, 10% Solvente: 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP). Voltaje: 25 Kv Velocidad: 5 mL/hr Temperatura: 21 °C Distancia: 10 – 12 cm	Caracterización Microscopia (MEB) Espectroscopia Infrarroja (FTIR) Termogravimetría (TG) Difracción de rayos X	(Aziz et al., 2019)
Moringa	PVA	Concentración del polímero: 6 a 18% Solvente: ácido fórmico 3%	Morfología: fibras Diámetro: 232.7 ±59.37 nm.	(Kebede et al., 2018)

		Voltaje: 75-25 Kv Velocidad: 2.5- 10 μ L/hr Temperatura: 21 °C Distancia: 7 – 17.5 cm	Caracterización: Microscopia (MEB) Difracción de rayos X Termogravimetría Potencial Z: -5 a 15 mV	
Soya	PVA PEO Óxido de Etileno	Concentración del polímero: 9 a 13% Solvente: hidróxido de sodio pH: 6.8, 9 y 12 Voltaje: 15-20 Kv Velocidad: 0.015 mL/hr Temperatura: 25 °C Distancia: 15 - 20 cm	Viscosidad: 19.0 – 208.05 cP Morfología: fibras Diámetro: 600.00 – 11500.0 nm. Caracterización: Microscopia (MEB) Reología (Reogramas) Calorimetría (DSC) FTIR	(Cho et al., 2010).
Chícharo	N/A	Concentración del polímero: 10% Solvente: Ácido fórmico, agua desionizada, hexafloroisopropanol, trifloroetanol, ácido trifloro acético Voltaje: 15-22 Kv Velocidad: 0.2 – 0.4 mL/hr Temperatura: 25 °C HR: < 50% Distancia: 10-15 cm	Viscosidad: 430.0 – 2,878.05 cP Morfología: fibras Diámetro: 600.00 – 11500.0 nm Caracterización: Microscopia (MEB) Reología (Reogramas) Espectroscopia Infrarroja	(Aguilar-Vázquez et al., 2020)
Gliadina	N/A	Concentración del polímero: 12.5 - 20% Solvente: etanol 70% Voltaje: 15Kv Velocidad: 0.5 mL/hr Temperatura: 25 °C Distancia: 10 cm	Viscosidad: 58.0 – 574.05 cP Morfología: fibras Diámetro: 375.0 – 410 nm. Caracterización: Microscopia: SEM Emisión de fluorescencia FTIR/DSC Difracción de rayos X	(Akman et al., 2019)

2.7 Películas comestibles

2.7.1 Generalidades

En las últimas dos décadas se ha incrementado el diseño y desarrollo de materiales novedosos que sirvan como películas comestibles para frutas, vegetales, carne, pescado y productos frescos cortados (Falguera et al., 2011). Se han utilizado para prevenir los diferentes desordenes asociados al procesamiento y mantener su calidad durante el almacenamiento del producto. Las películas comestibles son capas delgadas de un material aplicadas en la superficie del producto, en adición o remplazo de los tejidos protectores naturales (Chen, 1995; Baldwin et al., 1995; García y Barrett, 2003).

Pueden aplicarse directamente en la superficie del alimento por inmersión, atomización o cepillado (Figura 10). Debido a que será consumida junto con el alimento, los ingredientes usados para la preparación deben estar aceptados en la lista de aditivos GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros) por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) de acuerdo a las regulaciones vigentes. Una película ideal debe extender la vida útil del alimento y reducir el decaimiento de las características sensoriales del mismo (Lin & Zhao, 2007).

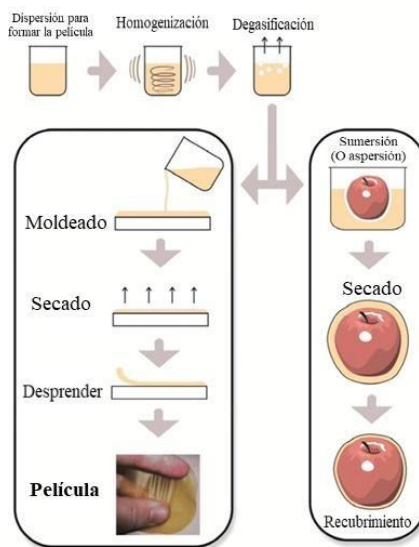


Figura 10 Representación de las películas comestibles y el recubrimiento. Modificado de (Otoni et al., 2017).

Las ventajas del uso de películas comestibles incluyen (Dhall, 2013):

- 1.- Ser libres de tóxicos y seguros para la salud.
- 2.- Deben requerir una tecnología simple para su elaboración.
- 3.- Ser protectores de la acción física, química y mecánica.
- 4.- Presentan propiedades sensoriales: deben ser transparentes y no ser detectados durante su consumo.
- 5.- Mejoran las propiedades mecánicas y preservan la textura.
- 6.- Presentan propiedades de barrera como transferencia de distintas sustancias, adecuada permeabilidad al vapor de agua, solutos y una permeabilidad selectiva a gases y volátiles, desde el alimento hacia el exterior y viceversa.
- 7.-Reducen las actividades enzimáticas relacionadas con el deterioro.
- 8.-Previenen los daños por frío y los desórdenes durante el almacenamiento.
- 9.-Encapsulación de compuestos aromáticos, antioxidantes, pigmentos, iones etc., para detener las reacciones de oscurecimiento, reducir la carga microbiana y mantener las sustancias nutritivas y funcionales como las vitaminas y los compuestos fenólicos.
- 10.-Reducen el uso de materiales sintéticos de empaque.

Durante su fabricación, los materiales deben ser dispersos en un disolvente como agua, alcohol, mezcla agua-alcohol o una mezcla de otros disolventes. Por otra parte, los plastificantes, agentes antimicrobianos, minerales, vitaminas, colores o saborizantes pueden ser añadidos durante este proceso. El ajuste del pH o el calentamiento de la disolución pueden facilitar la dispersión de los polímeros y los demás aditivos (Dhall, 2013; Falguera et al., 2011). Además, la adición de plastificantes como glicerol, polietilenglicol o propilenglicol también se considera fundamental para la formación de películas en algunos casos.

La funcionalidad de las películas está relacionada, en parte, con las propiedades mecánicas (como la resistencia a la tensión, elongación a la rotura), con las propiedades funcionales (como barrera al vapor de agua, oxígeno, dióxido de carbono) y propiedades físicas como la opacidad y color, entre otras (Silva-Weiss et al., 2013; López-García y Jiménez-Martínez, 2015). Cabe destacar que los materiales deben cumplir criterios específicos establecidos por la ASTM e ISO

para que se consideren biodegradables.

Recientemente, la generación de nuevas películas comestibles ha sido diseñado para incrementar la funcionalidad e incorporación de ingredientes naturales o funcionales como prebióticos, minerales y vitaminas, buscando también el mejoramiento de la calidad del producto recubierto. Por lo cual, consisten en la incorporación de los aditivos utilizando técnicas de microencapsulación o nanoencapsulación con la finalidad de obtener una liberación controlada de los compuestos encapsulados, proteger al aditivo de los factores externos y potencializar su funcionalidad para la conservación de alimentos (Falguera et al., 2011).

2.7.2 Clasificación

Las películas comestibles se clasifican en: hidrocoloides o polímeros, lípidos y mezclas de ambos. Los hidrocoloides a su vez se clasifican en polisacáridos y proteínas. Los lípidos incluyen ceras, aceites y resinas, mientras que las mezclas contienen componentes tanto poliméricos como lipídicos (Baldwin 1999). La selección del biopolímero depende en gran medida de la función deseada y del alimento a aplicar.

2.7.3 Películas proteicas

Las películas comestibles a base de proteínas se pueden utilizar para diferentes productos alimenticios debido a su buena adherencia a las superficies hidrófilas, con el fin de restringir la absorción de oxígeno y CO₂, pérdidas de sabor y aroma, además de mantener las características mecánicas y reológicas, el color y la apariencia de los alimentos, reducir la migración de lípidos, mejorar las propiedades de la manipulación mecánica, proporcionar protección física u ofrecer una alternativa a los envases sintéticos. Además, pueden ser portadores de varios aditivos como agentes antimicrobianos y antioxidantes. Se pueden utilizar en la superficie de los alimentos para controlar la tasa de difusión de aditivos desde la superficie hacia el interior.

Sin embargo, una limitante es que tienen una resistencia limitada a los vapores de agua, debido a su composición química ya que los aminoácidos en medio acuoso tienden a ionizarse y eso aumenta la solubilidad de los mismos, disminuyendo la eficiencia de la película en estas condiciones (Pragatheeswari 2019).

Esto se puede mejorar añadiendo agentes reticulantes, el uso de mezclas de biopolímeros, recubrimientos con materiales con altas propiedades de barrera, fabricación de materiales multicapa, reducir el tamaño de su talla (nanopelículas) o por un nanoreforzamiento mediante nanoestructuras (nanocristales).

Fabra, López-Rubio y Lagaron (2016) electrohilaron directamente tres matrices de hidrocoloides diferentes (suero de leche, soya y zeína) cargadas con α -tocoferol en un lado de una película termoplástica de gluten de trigo como capa de recubrimiento, respectivamente. Se descubrió que la capa de recubrimiento activa mejora la eficacia de la barrera de vapor de agua de la película de gluten de trigo y proporciona una liberación sostenida del alfa-tocoferol encapsulado, lo que sugiere el potencial de las estructuras híbridas de hidrocoloides que contienen compuestos activos en el diseño de nuevos materiales multifuncionales para envasado de alimentos.

Neo et al. (2013) prepararon fibras de zeína electrohiladas cargadas con ácido gálico, y encontraron que tenían propiedades antibacterianas y antioxidantes lo cual hace que las nanofibras sean deseables como materiales activos de empaquetado en la industria alimentaria. Wang, Marcone, Barbut y Lim (2013) incorporaron extracto de frambuesa roja rico en antocianinas en las fibras de proteína de soya electrohiladas con la menor cantidad de PEO, obteniendo una mejor actividad antibacteriana contra *Staphylococcus epidermidis*, lo que indica que tienen una aplicación potencial en el desarrollo de empaques activos.

Por otra parte, Dang *et al.* 2017 demostró como aumenta la eficiencia de una película al ser elaborada por la técnica de electrohilado con respecto a la técnica convencional (fusión del solvente) al elaborar películas de gelatina y gelatina/zeína. El proceso de electrohilado dispersó la zeína en la gelatina para formar nanofibras homogéneas, lo que da como resultado una buena resistencia al agua y etanol. Por el contrario, la película de gelatina / zeína moldeada mostró pobre resistencia de disolución debido a la dispersión heterogénea de gelatina y zeína (Figura 12). Se concluyó que las películas nanofibrosas de gelatina/zeínas ensambladas tenían un potencial prometedor como formadores de película comestible.

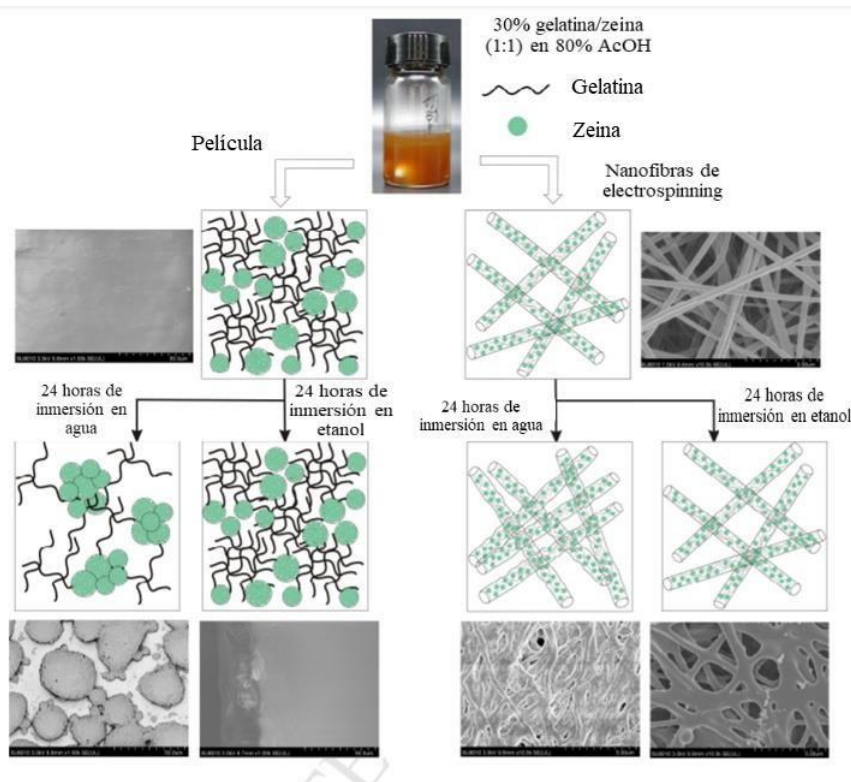


Figura 11. Diferencia entre electrohilado/ film casting de zeína/gelatina (Modificado de Deng, 2017).

Al igual se han reportado películas comestibles elaboradas a base de aislados proteicos de amaranto donde se compararon las mismas técnicas previamente mencionadas con la diferencia de que a las películas elaboradas por evaporación del solvente se les adicionaron nanocristales de celulosa (Aceituno- Medina et al 2015). Se caracterizaron la morfología, las propiedades ópticas y la afinidad por la humedad de las películas (ángulo de contacto con el agua, solubilidad, contenido de agua). Ambas estrategias dieron como resultado películas homogéneas con buenas propiedades ópticas y una disminución del carácter hidrofílico (como se deduce de las mediciones del ángulo de contacto y la solubilidad) y propiedades mecánicas mejoradas en comparación con las películas blanco. Sin embargo, tanto el método de procesamiento como el espesor de la película influyeron en las propiedades finales de las películas, siendo las que se procesaron mediante recubrimiento por rotación más transparentes (Figura 12), menos hidrófilas y menos solubles en agua mejorando significativamente la tenacidad del material.

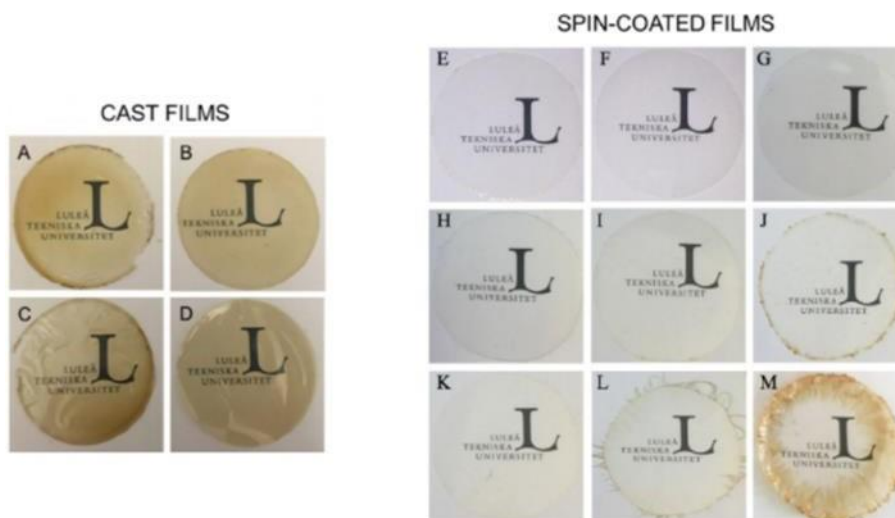


Figura 12 Aspecto visual de películas a base de amaranto. Películas fundidas (A) API, (B) API+CNC (5%), (C) API+CNC (10%), (D) API+CNC (20%). Películas centrifugadas obtenidas que contienen 5%(E-G), 10%(H-J) o 15% API (K-M) y 25% (E,H,K), 50% (H-J) o 100 capas (K-M) (López-Rubio et al. 2020).

2.7.4 Películas antimicrobianas

La contaminación microbiana es una preocupación constante en la industria alimentaria a tratar debido a que el empaque es uno de los componentes clave en la conservación de alimentos para inhibir el deterioro o reducir crecimiento de microorganismos patógenos. Por ello, se ha tratado de implementar agentes antimicrobianos a las películas comestibles o a los empaques llamándose a esta tecnología embalaje activo.

Ácidos orgánicos, aceites esenciales, sales, lípidos, especias, bacteriocinas (nisina), extractos, nanopartículas inorgánicas o metálicas han sido ampliamente estudiados por su eficacia en el control del crecimiento de microorganismos y bacterias en los alimentos.

Actualmente, se han buscado activos de origen natural que no dañen la integridad de la película o algún daño a la salud del consumidor, por lo que el uso de aceites esenciales ha sido una buena opción para tratar este problema.

Dado que la mayoría de los aceites esenciales (AE) son compuestos volátiles, requieren el uso de métodos de fabricación que se realicen a temperatura ambiente para conservar sus propiedades originales siendo el electrohilado una técnica muy viable.

La encapsulación es eficaz para mejorar la estabilidad y solubilidad en solventes polares, así como para enmascarar su fuerte sabor y olor. Debido a su naturaleza no polar, inestabilidad y volatilidad de los aceites esenciales, generalmente no se pueden agregar directamente a la solución del electrohilado, por lo que se requiere de un vehículo portador como ciclodextrinas (CD) o liposomas (Figura 14).

Se han estudiado una gran variedad de aceites esenciales con amplio espectro antimicrobiano entre los que resaltan: canela, lavanda, romero, bergamota, clavo, tomillo, orégano, menta y árbol de té. En este tipo de estudios el aceite esencial más estudiado ha sido el de la canela (CEO), donde se han hecho complejos con ciclodextrinas β -CD-IC encapsuladas en nanofibras de PLA electrohilado observando un mejor efecto antimicrobiano contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, en comparación con la nanopelícula PLA / CEO. Los resultados indicaron que la fibra PLA / CEO / β -CD aumentó de manera eficiente la vida útil de la carne de cerdo, lo que sugiere una posible aplicación en películas comestibles (Mele, 2020).

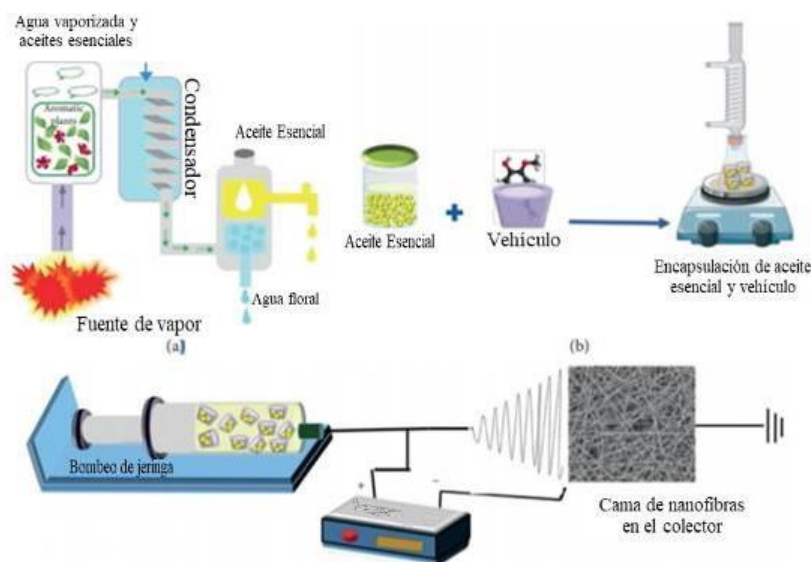


Figura 13 Fabricación de nanofibras electrohiladas cargadas con aceites esenciales para el envasado activo de alimentos. (a) Extracción de aceites esenciales (b) Complejamiento e incorporación de solución de electrohilado (c) Electrohilado de la solución compuesta. Modificada de (Ataei et al. 2020).

Otro vehículo potencial para el encapsulamiento de aceites esenciales durante el electrohilado son los liposomas que consisten en vesículas lipídicas artificiales, formadas por bicapas concéntricas de fosfolípidos que incorporan núcleos acuosos, son capaces de encapsular tanto sustancias hidrófilas en la sección acuosa interna como hidrófobas asuntos dentro de las bicapas lipídicas y moléculas anfifílicas en la interfaz lípido / agua.

Aceites esenciales como el de clavo, el cual es utilizado por su componente mayoritario el eugenol que se sabe que es uno de los mejores activos antimicrobianos naturales, se han encapsulado en liposomas para poder ser electrohilado como una alternativa para disminuir el daño durante el procesamiento y almacenamiento. Sin embargo, el mayor inconveniente que puede afectar la eficacia del liposoma cargado con eugenol como antioxidante es su inestabilidad liposomal, además de su baja eficiencia de encapsulación, la tendencia a la autoagregación, fusión o ruptura de las vesículas. Todos estos factores son serios desafíos a la explotación comercial de los liposomas de eugenol como antioxidante industrial. Por lo tanto, la estabilidad del liposoma de eugenol puede afectar el rendimiento del producto final como envasado activo de alimentos. Una forma de mejorar la estabilidad de los liposomas, es mediante la elaboración de liposomas recubiertos (Du et al 2015).

Cui et al. (2020), reportaron un método para formar un antioxidante basado en nuevos complejos de SiO₂-eugenol encapsulado en liposomas formando un ensamblaje supramolecular con un núcleo de partículas coloidales cubierto por un lípido. Las nanopartículas de SiO₂ en la industria alimentaria sirven como aditivo que puede proporcionar un soporte rígido para la película delgada y así mejorar la estabilidad física del liposoma aunque para la encapsulación del eugenol se requiere la adición de óxido de polietileno (PEO) para poderse electrohilar (Figura 15) (Liu et al., 2016).

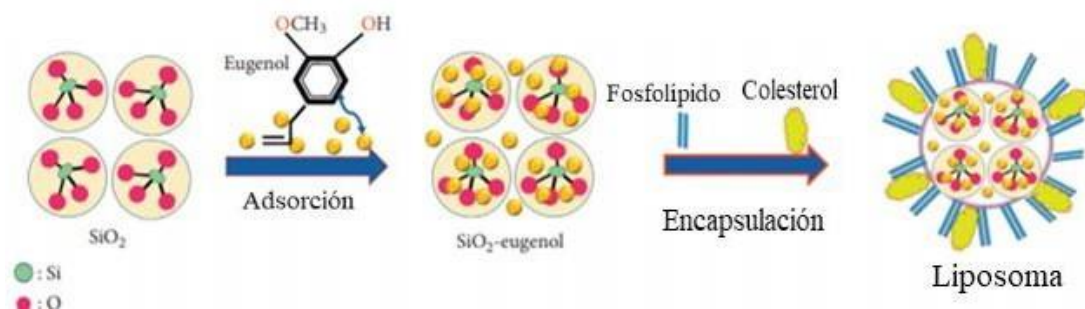


Figura 14. Ilustración esquemática de SiO₂-eugenol encapsulado en liposomas. Modificado de (Liu et al. 2016).

Para evaluar la eficacia de estas películas, estuvieron en contacto con carne de res durante un período de 60 días y exhibió una excelente actividad antioxidante. Otro tipo de aceite esencial sumamente utilizado por sus propiedades antimicrobianas es el aceite esencial de tomillo (TEO) ya que tiene la capacidad de inhibir la proliferación de diversos tipos de bacterias entre las que se encuentran: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar *Enteritidis* (*S. enteritidis*), y *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*).

Lin *et al* 2018 reportaron la elaboración de nanofibras de gelatina que contienen nanopartículas de TEO/ β -ciclodextrina ϵ -polilisisina (TCPN) para controlar la propagación de *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*), este microorganismo es conocido por ser zoonótico. Es decir, se encuentra en los animales por lo que muchas veces puede llegar a contaminar la carne. Pero el gran problema radica en su gran capacidad de poder generar resistencia a varios tipos de antibióticos de amplio espectro como cefalosporinas, quinolonas y gentamicina. El complejo TEO / β -CD-IC por sí mismo no es eficaz contra *C. jejuni* debido a que como la β -CD tiene una naturaleza electroneutra su absorción en la pared celular bacteriana cargada negativamente es limitada. Para abordar este problema, se aplicó gelificación iónica para adsorber biopolímeros catiónicos en la superficie de TEO / β -CD-IC. ϵ -polilisisina (ϵ -PLY), es un metabolito biológico catiónico biodegradable con excelentes propiedades antibacterianas, fue seleccionado para preparar nanopartículas de TEO / β -CD ϵ -polilisisina (TCPN) la presencia de grupos R-NH₂ a lo largo de las cadenas ϵ -PLY mejora la unión de nanopartículas a células bacterianas cargadas negativamente en la pared que conduce a una aceleración en la apoptosis (Galvao et al 2019).

En dicho estudio obtuvieron nanofibras antibacterianas añadiendo TCPN en la matriz de polímero mediante electrohilado, Las membranas preparadas mostraron una excelente acción antimicrobiana contra *C. jejuni*, a través de membranólisis. Los resultados confirmaron que la membrana celular y las proteínas dañadas fueron el resultado de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas. Posteriormente, se evaluaron los sistemas en pechugas de pollo envasadas en las membranas y poseían un menor recuento de bacterias aeróbicas y ácido tiobarbitúrico (TBA). Los valores de nitrógeno y pH también fueron más bajos sin ningún efecto adverso sobre el color, la textura y evaluación sensorial, señalando perspectivas brillantes para las membranas en la conservación de aves de corral.

En la Tabla 5 se muestra un resumen de películas electrohiladas a base de proteínas y biopolímeros con diferentes AE.

Tabla 5 Películas comestibles y aceite esencial empleado

Aceite esencial	Función	Alimento	Película	Autor
Orégano y Tomillo	Antimicrobiano (<i>Pseudomonas spp.</i> y <i>coliformes bacterias</i>)	Carne de res	Proteína de soya	(Emiroğlu et al., 2010)
Clavo	Antibacterial y Antioxidante.	Sardina	Proteína de girasol	(Salgado et al., 2013)
Canela y Mostaza	Antibacterial	Jitomates	Zeína	(Yun et al., 2015)
Menta, Tomillo rojo y Limón	Saborizante	Fresas	Chitosan	(Vu et al., 2011)
Orégano	Antimicrobiano	Pizza	Película de Celulosa	(Botre et al., 2010).

Romero	Antimicrobiano	Pollo	Acetato de celulosa	(de Melo et al., 2012).
---------------	----------------	-------	---------------------	-------------------------

En resumen, las películas y recubrimientos comestibles constituyen una tecnología alternativa, amigable con el medio ambiente y rentable que pueden mejorar la calidad de los alimentos (es decir, la prevención del daño físico, la mejora del color y la apariencia total) y su integridad o inhibición del crecimiento microbiano (Campos et al., 2011).

2.7.5 Aceites esenciales cítricos

2.7.5.1 Generalidades

Los aceites esenciales son compuestos volátiles, naturales y complejos caracterizados por un fuerte olor y que son metabolitos secundarios de plantas. Usualmente son obtenidos por vapor o hidrodestilación y fueron desarrollados por primera vez en la Edad Media por los árabes. Últimamente se le han atribuido propiedades antisépticas, bactericidas, viricidas y fungicidas, y medicinales por lo que se les han dado usos en la conservación de alimentos, como remedios antimicrobianos, analgésicos, sedantes, antiinflamatorios, espasmolíticos y anestésicos locales (Bakkali et al., 2008).

En la naturaleza, los aceites esenciales juegan un papel importante en la protección de las plantas como antibacterianos, antivirales, antifúngicos, insecticidas y también contra herbívoros al reducir su apetito por tales plantas. También pueden atraer algunos insectos para favorecer la dispersión de pólenes y semillas o repeler a otros indeseables.

2.7.5.2 Composición química

Los aceites esenciales son líquidos, volátiles, lípidos y raramente coloreados, solubles en lípidos y soluble en disolventes orgánicos con una densidad generalmente menor que la del agua. Pueden ser sintetizados por todas las plantas, flores, hojas, tallos, ramitas, semillas, frutos, raíces, madera o cortezas. Químicamente son mezclas naturales muy complejas que pueden contener alrededor de 20 a 60 componentes en concentraciones diferentes. Se caracterizan por dos o tres principales metabolitos en concentraciones bastante altas (20-70%) en comparación con otros (Palazzolo et al., 2013).

Generalmente, estos componentes principales determinan las propiedades biológicas de los aceites. Estos componentes incluyen dos grupos de origen biosintético distinto: El grupo principal está compuesto de terpenos y terpenoides y el otro de aromáticos y constituyentes alifáticos, todos caracterizados por bajo peso molecular peso (Figura 16). En la actualidad, se conocen aproximadamente 3000 AE (De Matos et al., 2019).

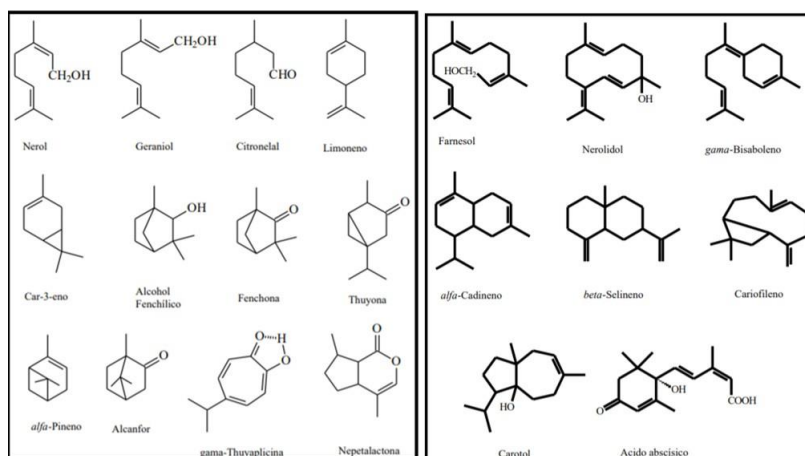


Figura 15 Terpenos presentes en aceites esenciales.

2.7.5.3 Propiedades de los aceites esenciales cítricos.

Las especies de cítricos (*Rutaceae*), originarias de las regiones tropicales del sudeste asiático y China, representan hoy en día la mayor producción de frutas a nivel mundial, con más de 123 millones de toneladas producidas durante 2010.

Las especies de cítricos de mayor importancia comercial son las naranjas dulces (*Citrus sinensis* L. Osbeck) y las mandarinas (*Citrus unshiu* Marc., *Citrus nobilis* Lour., *Citrus deliciosa* Ten., *Citrus reticulata* Blanco y sus híbridos) (más del 80%), seguido de limones (*Citrus limon* L. Burm. f.), limas (*Citrus aurantifolia* Christm. Swing.) y toronjas (*Citrus paradisi* Macf.). El género *Citrus* está relacionado con otros géneros de la familia *Rutaceae*, como *Fortunella*, *Poncirus*, *Microcitrus*, *Clymenia* y *Eremocitrus* (Dosoky & Setzer, 2018).

Los AE de los cítricos están presentes y pueden extraerse de la cáscara, las flores y de las hojas

jóvenes. Lo más común es que se extraigan de la cáscara por las técnicas de prensado e hidrodestilación. La calidad y cantidad de AE de cáscara de cítricos depende de muchos factores, como la naturaleza de la fruta en sí, la procedencia, el genotipo, el tipo de suelo y el clima, pero también del proceso de extracción. El contenido de aceite de las cáscaras de los cítricos oscila entre el 0,5 y el 5,0% (p / v).

Los AE extraídos de la piel de los cítricos son matrices muy complejas que contienen numerosos compuestos de diferentes clases químicas. Estos compuestos se dividen generalmente en dos fracciones: la fracción volátil, que es la más representativa y oscila entre el 85 y el 99% en los diferentes aceites cítricos prensados en frío, y el residuo no volátil, que contiene ácidos grasos, esteroides, carotenoides, ceras, cumarinas y flavonoides polimetoxilados (2-6% del aceite), que oscila entre el 1 y el 15%. Los componentes volátiles son una mezcla de hidrocarburos monoterpeno (limoneno) y sesquiterpeno y sus derivados oxigenados, incluidos aldehídos (citral), cetonas, ácidos, alcoholes (linalool) y ésteres.

El principal componente químico de los aceites cítricos es el limoneno. El contenido de limoneno varía del 32 al 98%. En particular, el contenido de limoneno varía del 68 al 98% en la naranja dulce, del 45 al 76% en el limón y del 32 al 45% en la bergamota (Teneva et al., 2019). Sobre el linalol, un componente oxigenado, su concentración resulta en 0.018, 0.015 y 10.231% en naranja dulce, limón y bergamota, respectivamente.

2.7.5.3 Aceite esencial de naranja amarga (*Citrus aurantium*)

El *Citrus aurantium* L. (*Rutaceae*), comúnmente conocido como naranja amarga, generalmente se utiliza como agente aromatizante y acidificante para platillos tradicionales, la cáscara se utiliza para la producción de mermeladas, también se utiliza para el tratamiento de varias dolencias como la ansiedad y trastornos gastrointestinales y obesidad.

Se ha reportado que la mayor cantidad de aceite esencial se obtiene de la cáscara con respecto a las hojas y las flores, Tabla 6 (Sarrou et al., 2013).

Tabla 6 Componentes del aceite esencial empleado (Sarrou et al 2013).

Componente	Concentración (%)			
	Hojas	Cascara	Hojas jóvenes	Hojas maduras
α- Pineno	1.35 \pm 0.01	0.53 \pm 0.02	0.19 \pm 0.00	- - -
Sabineno	2.01 \pm 0.20	0.18 \pm 0.01	0.37 \pm 0.00	0.22 \pm 0.03
β- Pineno	19.08 \pm 0.18	0.62 \pm 0.04	3.58 \pm 0.01	1.90 \pm 0.31
Mirceno	1.59 \pm 0.01	2.00 \pm 0.04	1.63 \pm 0.06	- - -
Ocatanal	- - -	0.24 \pm 0.01	- - -	- - -
3-γ-careno	0.17 \pm 0.00	- - -	- - -	0.77 \pm 0.09
Limoneno	12.04 \pm 0.16	94.67 \pm 0.01	0.53 \pm 0.01	1.22 \pm 0.07
<i>cis</i>-γ-Ocimeno	0.77 \pm 0.02	0.30 \pm 0.01	0.71 \pm 0.02	3.11 \pm 0.21
<i>trans</i>-γ-Ocimeno	6.06 \pm 0.01	- - -	4.08 \pm 0.05	- - -
Γ-terpeno	0.36 \pm 0.01	- - -	- - -	- - -
Oxido de linalool	0.29 \pm 0.02	- - -	- - -	0.70 \pm 0.04
α-terpinoleno	0.47 \pm 0.01	- - -	0.40 \pm 0.01	36.03 \pm 0.60
Linalool	29.14 \pm 0.38	0.76 \pm 0.04	58.21 \pm 0.37	0.13 \pm 0.02
Terpin-4-ol	0.68 \pm 0.02	- - -	0.17 \pm 0.01	12.89 \pm 0.37
α-terpinelol	4.56 \pm 0.05	0.13 \pm 0.01	7.11 \pm 0.06	- - -
Decanal	- - -	0.16 \pm 0.03	- - -	2.89 \pm 0.06
Nerol	0.83 \pm 0.02	- - -	1.45 \pm 0.02	- - -
Geraniol	4.31 \pm 1.43	0.18 \pm 0.03	- - -	23.00 \pm 1.42
Acetato de linalilo	3.88 \pm 0.40	- - -	12.42 \pm 0.13	
Metil antranilato	0.19 \pm 0.00	- - -	- - -	- - -
Σ – Elemeno	0.12 \pm 0.00	- - -	- - -	- - -

Acetato de terpenilo	0.20 ± 0.00	0.10 ± 0.00	- - -	0.11 ± 0.00
Acetato de nerilo	1.30 ± 0.01	- - -	2.18 ± 0.07	4.46 ± 0.22
Acetato de geranilo	2.59 ± 0.04	- - -	4.49 ± 0.11	8.70 ± 0.37
β- Carofileno	0.42 ± 0.01	- - -	1.09 ± 0.02	0.22 ± 0.01
α- Humuleno	- - -	- - -	0.10 ± 0.00	- - -
(E)-β-Farneseno	- - -	- - -	0.13 ± 0.01	- - -
δ-Germacrene	0.13 ± 0.01	- - -	- - -	- - -
Bicyclogermacrene	- - -	- - -	0.18 ± 0.00	0.20 ± 0.01
(E)-Nerolidol	1.76 ± 0.03	- - -	- - -	0.10 ± 0.00
(E)-Farnesol	5.14 ± 0.02	- - -	- - -	- - -
Rendimiento (%)	0.12 ± 0.01	1.67 ± 0.07	0.27 ± 0.01	0.45 ± 0.02

2.7.5.4 Actividad antimicrobiana

Azhdarzadeh et al 2016- reportó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de la naranja amarga, donde comparó el efecto antimicrobiano del aceite obtenido de las cáscaras maduras e inmaduras y el de las hojas ante distintos tipos de bacterias y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7.

Tabla 7 Actividad antimicrobiana de la hoja *Citrus aurantium* de la cascara inmadura, madura y antibióticos por el método de difusión en disco (Diametro en cm). (Azhdarzadeh et al 2016).

Microorganismo	Antibióticos				
	Hoja	Cáscara inmadura	Cáscara madura	Cloranfenicol	Nistatina
<i>B. cereus</i>	9.37 ± 0.12	37.5 ± 2.17	50 ± 1.32	37.5 ± 0	-----
<i>S. aureus</i>	18.75 ± 0.11	37.5 ± 1.03	100 ± 5.16	37.5 ± 0	-----
<i>S. faecium</i>	18.75 ± 0.21	37.5 ± 0.82	100 ± 4.15	37.5 ± 0	-----
<i>E. coli</i>	4.67 ± 0.14	37.5 ± 1.18	50 ± 2.65	37.5 ± 0	-----
<i>S. dysenteria</i>	9.37 ± 0.17	37.5 ± 1.58	100 ± 3.45	37.5 ± 0	-----

<i>S. typhi</i>	18.75 ± 2.21	75 ± 3.67	50 ± 2.12	37.5 ± 0	-----
<i>S. cerevisiae</i>	9.37 ± 0.18	4.67 ± 0.10	25 ± 1.37	37.5 ± 0	4.67 ± 0

Aunque, el mecanismo antimicrobiano exacto de los aceites esenciales aún se desconoce, las bacterias Gram-negativas son un poco más resistentes a los aceites esenciales que las Gram positivas. Sin embargo, se cree que se debe a la doble membrana de las Gram-negativas.

En la tabla 7 se aprecia que el aceite esencial más eficaz es el obtenido de la cáscara demostrando mayor efectividad que el estándar de Cloranfenicol, esto según los autores se lo atribuyen a la presencia de limoneno, que representa aproximadamente el 59.88% de su composición (Sanei-Dehkordi et al., 2016).

4 JUSTIFICACIÓN

En los últimos años ha ido en aumento la venta y el consumo de proteínas vegetales con la finalidad de poder reemplazar a las proteínas animales, ya que se ha demostrado que tienen diversos beneficios como buen contenido nutricional, propiedades nutraceuticas y benéficas para el organismo son de fácil obtención, los rendimientos son buenos, muchas son obtenidas a partir de subproductos agroindustriales por lo que son económicas y tienen buenas propiedades tecnofuncionales. Esto ha inducido a que haya una mayor investigación para obtener proteínas de fuentes no convencionales y determinar su potencial aplicación para generar productos con alto valor agregado.

Por otro lado, a pesar de que ya se saben las bondades de este tipo de proteínas hasta el momento no se han utilizado tecnologías modernas las cuales puedan brindar nuevas propiedades o darles nuevos usos donde una área muy potencial es la nanotecnología para el desarrollo de películas y recubrimientos comestibles ya que algunas de sus ventajas son el alargar la vida de anaquel de algún alimento, adicionar un activo de interés de distinta naturaleza con propiedades antioxidantes o antimicrobianas y que tenga una liberación modificada.

El presente trabajo representa el desarrollo de una película electrohilada usando como biopolímero un aislado proteico de semilla de yaca. Finalmente, se adiciono un aceite esencial obtenido de la cáscara de naranja amarga. Tanto la semilla y la cáscara son subproductos agroindustriales aprovechando así su uso para desarrollar una película comestible de alto valor agregado.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Desarrollar y caracterizar películas electrohiladas a partir de aislados proteicos de semilla de yaca para conocer su capacidad de formar películas comestibles que eficientemente encapsulen un aceite esencial.

4.2 Objetivos específicos

- ❖ Obtener y caracterizar fisicoquímicamente películas electrohiladas a partir de aislados proteicos de semilla de yaca mediante la técnica del electrohilado.
- ❖ Caracterizar químicamente y determinar la capacidad antioxidante del aceite esencial de naranja amarga (*Citrus aurantium*).
- ❖ Obtener y caracterizar complejos de inclusión β -CD/Aceite esencial
- ❖ Producir y caracterizar fisicoquímicamente las películas electrohiladas cargadas con el complejo de inclusión.

5 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Obtención del aislado proteico de semillas de yaca

5.2 Preparación de la solución a electrohilar

La solución a electrohilar dada su naturaleza polar y según lo reportado en la bibliografía se trabajó a un pH 12.0 ya que es donde el aislado proteico de semilla de yaca tiene su mayor solubilidad. Por lo tanto, se pesaron 0.5 g aislado proteico, disolviéndose en 5 mL agua y se mantuvo en agitación constantemente para posteriormente adicionar el 20% p/p de Tween 80 que corresponde a 0.2 g y 0.125, 0.33 g de pululano para obtener una mezcla 80:20 y 60:40. Finalmente se ajustó la solución a un pH 12.0 con NaOH 4 M.

5.3 Determinación de las concentraciones a electrohilar

El aislado proteico según lo reportado tiene una concentración de gelificación al 15% a un pH 12.0 por lo que se trabajaron sistemas al 10, 12, 14 y 15%, además de que se trabajó a distintas proporciones de proteína/ pululano siendo 80/20 y 60/40 los niveles seleccionados.

5.4 Viscosidad y conductividad de las soluciones poliméricas

La viscosidad de las soluciones poliméricas a diferentes concentraciones de polímero (10-14%) fue determinada empleando un viscosímetro Brookfield DV-II-PRO (USA) a 25 °C y una velocidad de 5 rpm. Muestras de las diferentes soluciones poliméricas empleadas fueron colocadas en un adaptador para muestras de volumen pequeño (≈ 10 ml) del equipo antes mencionado. Después de medir la viscosidad, las muestras fueron transferidas a contenedores de aproximadamente de 15ml, donde la conductividad de las soluciones poliméricas fue medida empleando un medidor de conductividad tipo pluma (Eco Test TDS de baja conductividad), las determinaciones fueron realizadas por triplicado y los resultados promedio fueron reportados.

5.5 Tensión superficial de las soluciones poliméricas

La tensión superficial de las soluciones poliméricas fue determinada empleando un tensiómetro de Dünoy modificado, sumergiendo la placa (Wihelmi) de platino (2.5cm de ancho X 1 cm de alto) en 10 ml de las diferentes soluciones poliméricas en estudio, (diferente concentración, diferente disolvente y diferente cantidad de principio activo). La fuerza necesaria para desprender la placa de platino de la superficie de la solución polimérica fue determinada. La tensión superficial de la solución polimérica fue establecida tomando como referencia la tensión superficial del agua a 25 °C. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado y el resultado promedio fue reportado.

5.4.1 Electrohilado de las soluciones poliméricas

El proceso de electrohilado se llevó a cabo empleando soluciones poliméricas de aislado proteico de yaca y pululano con concentraciones en un rango de 10-12 % (p/v) en soluciones alcalinas pH 12.0 y se mezcló hasta obtener una solución homogénea. La solución polimérica obtenida fue transferida a una jeringa de 10 ml equipada con una aguja de acero inoxidable de 6mm de longitud y 31 G de diámetro interno (d.i). La solución polimérica fue inyectada a una velocidad de 0.3 mL/hr y se aplicó un voltaje de 21 KV. Las fibras fueron colectadas en un colector de metal colocado a una distancia de 14 cm. Las películas obtenidas fueron recolectadas y almacenadas a temperatura ambiente.

5.4.2 Determinación de la morfología y diámetro por MEB de las películas.

Las muestras de películas obtenidas fueron colectadas en cubre objetos de vidrio y preparadas de la siguiente manera. Las muestras secas, fueron recubiertas con oro en un evaporador catódico JFG-1100 Sputter Coater (JEOL, Tokio, Japón). Las muestras ya recubiertas fueron colocadas en la cámara de muestras y observadas empleando un microscopio electrónico de barrido LV-SEM JSM-5600, JEOL, Tokio, Japón, con una aceleración de voltaje de 10kV y una presión de 12-20 Pa. Las micrografías obtenidas fueron analizadas mediante el programa informático Image J donde se analizaron 100 fibras para obtener el diámetro promedio. El diámetro fue expresado como diámetro promedio más menos desviación estándar $\pm DS$. A las determinaciones obtenidas se les realizó un análisis estadístico empleando una Test de Student en donde un $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

5.5.1 Determinación del color

Se midieron tres puntos de las películas electrohiladas a tres concentraciones 10% (80:20), 10% (60:40) y 12% (80:20) con un colorímetro (KONICA MINOLTA, Modelo CM-600d, Japón) para obtener los valores de L* (luminosidad), a* (tonalidades verdes [-] a tonalidades rojas [+]) y b* (tonalidades azules [-] a tonalidades amarillas [-]). Se hicieron tres mediciones por muestra para obtener una media. Las imágenes representativas del color de las películas electrohiladas fueron obtenidas mediante el programa de “Nix Color Sensor”.

5.5.2 Comportamiento térmico por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

El comportamiento térmico de los componentes de la formulación presentes en las soluciones poliméricas empleadas para la obtención de NFs fueron evaluadas por DSC. Muestras de aislado proteico polvo, polímero pululano polvo, mezcla física de proteína y pululano relación (1:1), películas electrohiladas 10% (80:20), 10% (60:40) y 12% (80:20). Aproximadamente 3-5 mg de cada muestra fueron colocadas en charolas de aluminio no herméticas y calentadas de 0 a 300°C a una velocidad de 5°C/min bajo atmosfera de nitrógeno con un flujo de 50ml/min. Los termogramas fueron obtenidos empleando un calorímetro DSC Q10, TA Instruments, New Castle, DE, USA.

5.4.3 Espectroscopía FTIR de las películas electrohiladas

Se obtuvieron espectros infrarrojos mediante FTIR-ATR con un espectrómetro Spectrum GX (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) de muestras de aislado proteico de yaca, pululano, mezcla física de yaca/pululano relación (1:1), películas 10% (80:20), 10% (60:40) y 12% (80:20). Por último, se llevó a cabo un análisis para la determinación de las estructuras secundarias del JPI se determinó por medio de la deconvolución en de la banca amida I localizada 1600-1700 cm⁻¹ mediante el programa informático Origin Pro 2018.

5.6 Preparación y caracterización de los complejos de inclusión

5.6.1 Preparación de los complejos de inclusión por la técnica de precipitación

Para la formación de los complejos de inclusión se pesaron 5 g de β -ciclodextrina y se disolvieron en una solución de 50 mL agua: alcohol etílico absoluto (1:1) y se sometió a agitación turbulenta por medio un ultraturrax a 3500 r.p.m. a 55 °C hasta completa homogenización. Posteriormente, se adiciono gota a gota el aceite esencial de naranja amarga hasta que el sistema se tornó turbio mediante una agitación magnética a 55 °C por 4 hrs. Una vez transcurrido el tiempo se dejó el sistema en agitación constante por 2 hrs más a temperatura ambiente. Finalmente, se dejó en agitación toda la noche a 7 °C. Se mantuvo el sistema en reposo y se filtró al vacío el precipitado para posteriormente secar en el horno a 60 °C durante 12 h. Una vez secado se pesó el polvo obtenido y se mantuvo seco a peso constante.

5.6.2 Determinación de la morfología y diámetro por SEM de los complejos de inclusión.

Las muestras obtenidas fueron colectadas en cubre objetos de vidrio y preparadas de la siguiente manera. Las muestras secas, fueron recubiertas con oro en un evaporador catódico JFG-1100 Sputter Coater (JEOL, Tokio, Japón). Las muestras ya recubiertas fueron colocadas en la cámara de muestras y observadas empleando un microscopio electrónico de barrido LV-SEM JSM-5600, JEOL, Tokio, Japón, con una aceleración de voltaje de 10kV y una presión de 12-20 Pa. Las micrografías obtenidas fueron analizadas mediante el programa informático Image J donde se analizaron 100 partículas para obtener el diámetro promedio. El diámetro fue expresado como diámetro promedio \pm SD. A las determinaciones obtenidas se les realizó un análisis estadístico empleando una Test de Student en donde un $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

5.6.3 Espectroscopia FTIR de los complejos de inclusión

Se obtuvieron espectros infrarrojos mediante FTIR-ATR con un espectrómetro Spectrum GX (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) de muestras de β -ciclodextrina, complejo de inclusión β -CD/AE (1:1), inclusión β -CD/AE (1:2), inclusión β -CD/AE (2:1).

Por último, se llevó a cabo un análisis para conocer si había un cambio en las estructuras, aplicando la segunda derivada en los números de onda de $1200 - 700 \text{ cm}^{-1}$ mediante el programa informático Origin Pro 2018.

5.6.4 Determinación de la morfología y diámetro por SEM de las películas con complejos de inclusión.

Las muestras obtenidas fueron colectadas en cubre objetos de vidrio y preparadas de la siguiente manera. Las muestras secas, fueron recubiertas con oro en un evaporador catódico JFG-1100 Sputter Coater (JEOL, Tokio, Japón). Las muestras ya recubiertas fueron colocadas en la cámara de muestras y observadas empleando un microscopio electrónico de barrido LV-SEM JSM-5600, JEOL, Tokio, Japón, con una aceleración de voltaje de 10kV y una presión de 12-20 Pa. Las micrografías obtenidas fueron analizadas mediante el programa informático Image J donde se analizaron 100 partículas para obtener el diámetro promedio. El diámetro fue expresado como diámetro promedio \pm SD. A las determinaciones obtenidas se les realizó un análisis estadístico empleando una Test de Student en donde un $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Optimización del proceso de electrohilado

6.1.1 Solución polimérica

Las propiedades de la solución polimérica, las cuales dependen del tipo de disolvente y concentración de polímero, tienen gran influencia en el proceso de electrohilado. Para poder conocer el comportamiento del aislado de proteína de yaca, se hicieron pruebas preliminares donde se estudiaron la solubilidad, la concentración de gelificación mínima y su comportamiento a cierto pH.

Con esos datos y con respecto a lo reportado en la bibliografía se propuso trabajar con soluciones de aislados proteicos de yaca a un pH 12, donde es su máxima solubilidad (Ulloa et al, 2017) para así establecer las concentraciones a trabajar. En la Figura 16 se muestra la consistencia que adquieren dichos sistemas con base a la concentración de proteína, determinándose que a concentraciones superiores al 10 % de JPI comienza a gelificar el sistema siendo el 15% la concentración mínima gelificante (Figura 16).

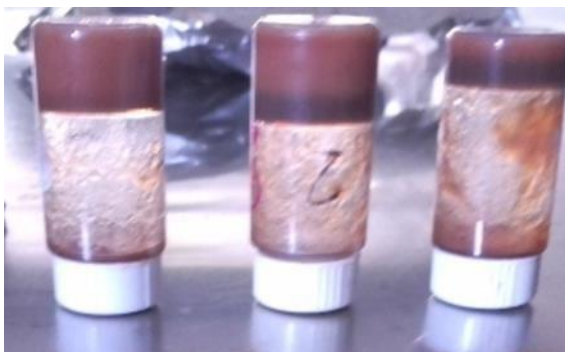


Figura 16 Concentraciones de aislados proteicos de yaca (10, 12 y 15%)

En estudios previos enfocados en el electrohilado de aislados proteicos de proteínas globulares se ha observado que las concentraciones a trabajar para poder obtener nanofibras de consistencias adecuadas han sido del 5 al 10%, además de que es necesario adicionar un polímero auxiliar que facilite la formación de las nanofibras debido a que por la conformación globular que estas proteínas adquieren no pueden electrohilar por sí mismas. Nieuwland et al. (2013) reportaron el posible mecanismo por el cual las proteínas globulares pueden cambiar su conformación al ser sometidas al proceso de electrohilado.

Sin embargo, a pesar de que hay un cambio conformacional e inclusive estructural y la formación de nuevos enlaces principalmente por puentes de hidrogeno, la proteína no tiene la habilidad de sufrir un reacomodo molecular que facilite la formación de las nanofibras esto se debe a que no tienen un comportamiento viscoelástico similar al de los polímeros sintéticos comúnmente utilizados, además de que la interacción entre proteínas globulares es tan pobre entre sí que no pueden asociarse. Para ello, se hizo una prueba donde se trató de electrohilar la proteína sola a una concentración del 10%, para posteriormente observar la influencia de un tensoactivo no iónico (tween 80) y del polímero acarreador que en este proyecto fue el pululano (Figura 17).

Dado que el pululano es un polímero biotecnológico de los más aceptados en alimentos y por su compatibilidad con sistemas acuosos a distintos pH es muy buena opción para la formación de nanofibras. Por otro lado, el tensoactivo a utilizar fue el Tween 80 ya que es de los más aceptados en alimentos, no aporta viscosidad de una manera significativa y no presenta cargas lo cual es muy importante ya que al ser un sistema acuoso alcalino las cargas negativas predominan haciendo que un tensoactivo con carga pueda generar una inestabilidad en el aislado proteico y el medio pues se ha visto que tensoactivos iónicos pueden interaccionar con los grupo -OH de los componentes de la solución polimérica y modificar drásticamente la viscosidad de la solución (Jia et al. 2012).



Figura 17 Influencia del tensoactivo y del polímero en el proceso del electrohilado izq a der solución de aislado proteico al 10%, solución polimérica de aislado proteico y pululano al 10%, solución polimérica al 10% aislado, pululano 10% Tween 80 al 10 y 20%.

En la Figura 17, se observa que este tipo de proteínas requieren la adición de un tensoactivo y de un acarreador (pululano) para la formación de la película. Al igual que la concentración polimérica se deben de conocer los otros factores determinantes en cuanto al proceso de electrohilado por lo que los factores a estudiar fueron: la velocidad de flujo, el voltaje y la distancia de la aguja al colector a la que se somete la solución para poder tener una película electrohilada.

En la Tabla 8 se resumen los valores encontrados para las variables el proceso que permitieron la formación de la película siendo la concentración de polímero, la relación JPI/pululano y el voltaje los factores críticos a considerar.

Tabla 8 Condiciones del electrohilado

Polímero	3	5	7	10	12	12
JPI: pululano	(60:40)	(80:20)	(60:40)	(80:20)	(80:20)	(60:40)
ST %	5	7	9	13	17	21
Voltaje (KV)	21	21	21	21	21	21
Flujo (mL/hr)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Distancia (cm)	14	14	14	14	14	14

Es importante destacar las propiedades fisicoquímicas de la solución acuosa a pH 12 empleada para la preparación de las soluciones poliméricas, ya que por su punto de ebullición alto (105-120 °C), permitiría una lenta evaporación del disolvente en el proceso de estiramiento de las fibras, además de poseer una tensión superficial alta, mayor a la del agua, que haría pensar que voltajes altos son necesarios para obtener fibras a partir de soluciones poliméricas que empleen este tipo de sistema acuoso. Una ventaja es que posee una constante dieléctrica alta, lo cual es favorable para el proceso de electrohilado, dado a que podrían conducir las cargas eléctricas eficientemente, cabe mencionar que no hay muchas referencias que describan el proceso de electrohilado en medio alcalino.

Otro de los principales parámetros del proceso, que afectan directamente en la formación, morfología y tamaño de las fibras es el voltaje aplicado. Para observar esto, tres diferentes soluciones poliméricas fueron empleadas, variando la concentración de polímero 10% (60:40), 10% (80:20) y 12% (80:20). Las soluciones poliméricas fueron electrohiladas aplicando un voltaje de 21 y 23 kV.

Teóricamente, un chorro líquido de bajo peso molecular impulsado eléctricamente formará

gotas de diámetro pequeño (electroatomización). La formación de estas gotas se debe principalmente a la ruptura capilar del chorro por efecto de la tensión superficial. Los sistemas al 10% (80:20) y (60:40) adquirieron dicho comportamiento puesto que en la aguja se observaba la formación de gotas que al momento de ser observadas en el microscopio se pensaría que darían origen a la formación de micropartículas. Sin embargo, no se notaron diferencias morfológicas en las películas al modificar el voltaje.

Uno de los parámetros experimentales del proceso que no impacta directamente en la morfología y tamaño de las fibras, pero repercutirá en la eficiencia del proceso, es la velocidad de flujo, la cual determina la cantidad de solución polimérica disponible en la punta de la aguja, lista para llevar a cabo el proceso de estiramiento. Durante las pruebas realizadas se varió la velocidad de flujo (0.2, 0.25, 0.3 mL/h) observándose que altas velocidades de flujo provocan un exceso de solución polimérica en la punta de la aguja que no puede ser electrohilada además de acumularse y provocar el taponamiento de la aguja. Teniendo lo anterior presente, la velocidad de flujo fue disminuida hasta un rango en donde la acumulación de polímero en la punta de la aguja fuera mínima, siendo de 0.3 mL/h, además se controló que el voltaje aplicado no exceda los 21 kV, con lo que se esperaba obtener fibras uniformes.

Varios autores han reportado que la distancia entre la punta de la aguja y el colector es otro factor que puede influir en el tamaño y la morfología de las fibras obtenidas, por lo que han propuesto que la distancia óptima debería estar en el rango de los 10 a 20 cm, lo que se considera una distancia efectiva con los métodos convencionales de electrohilado. La distancia debe permitir la evaporación del disolvente para obtener fibras poliméricas secas y al mismo tiempo permitir el estiramiento lo suficiente como para ser recogido en forma de malla no tejida. De acuerdo con lo observado, la distancia óptima entre la aguja y el colector para obtener una membrana de fibras secas fue establecida en 14 cm, distancia suficiente para permitir la evaporación del disolvente y el estiramiento de las fibras.

Las soluciones que visualmente formaban las mejores películas electrohiladas fueron a 10, 11 y 12 % de ST apreciándose que cuando la proporción es de 80/20 JPI/ Pulunano la película es más quebradiza y menos elástica esto se debe a que en su mayoría está conformada por proteína y el polímero que le da flexibilidad y mejores propiedades mecánicas es el pululano, por ello al

manejar una relación 60/40 las películas se vuelven más elásticas. Sin embargo, al trabajar una relación 50:50 el sistema es demasiado viscoso y ya no se puede electrohilar, por lo que no se procedió a trabajar estas condiciones. Lo consecuente a realizar fue la evaluación de los parámetros fisicoquímicos de dichas soluciones como la viscosidad, tensión superficial y conductividad (Tabla 9).

Tabla 9 Propiedades fisicoquímicas de las soluciones a electrohilar

JPI/Pululano	Conductividad (mS/cm)	Tension superficial (mN/m)	Viscosidad (cP)	Morfología	Diámetro (nm)
10% 60:40T	8.794 ± 0.046	65.86 ± 0.27	5,610 ± 378.21	Microcápsulas	122.52 ± 31.47
10% 80:20T	7.670 ± 0.026	62.40 ± 0.21	1,664 ± 77.46	Microcápsulas	154.52 ± 32.27
12% 80:20T	5.109 ± 0.065	50.82 ± 0.14	8,610 ± 106.22	Nano fibras	106.22 ± 30.16

La viscosidad es una de las propiedades de la solución a considerar en el proceso de electrohilado, esta se relaciona estrechamente con el entrelazamiento físico de las cadenas poliméricas dentro de la solución. Cuando la viscosidad de la solución es muy baja el fenómeno de electroatomizado puede ocurrir, formándose partículas en lugar de fibras. La solución con la viscosidad más elevada fue al 12 % debido a que es el sistema que mayor concentración de polímero tiene tanto de aislado proteico como de pululano al ser ambos solubles en dicho medio la viscosidad tiende a aumentar puesto que aumentan los enlaces por puentes de hidrógeno.

Sin embargo, para el sistema al 10% la viscosidad más elevada se presentó a una relación de 60:40 ya que al contener mayor cantidad de pululano el cual es un polímero con una viscosidad muy elevada no fluye tan fácilmente. Por lo tanto, la película se vuelve más elástica.

Se observó que cuando se emplean soluciones poliméricas con baja concentración de polímero total, además de bajos voltajes, el proceso de electrohilado no tiene lugar, obteniéndose sólo un atomizado de pequeñas partículas, pero conforme se incrementa la concentración de polímero y con ello la viscosidad de las soluciones además del voltaje aplicado en ciertos intervalos es posible obtener fibras de diferente morfología y tamaño.

Adicionalmente, la conductividad de la solución polimérica sometida a electrohilado influirá para llevar a cabo el estiramiento de la gota bajo ciertas condiciones además de repercutir en el tipo y tamaño de fibra recolectada. El electrohilado involucra el estiramiento de una microgota, lo cual es causado por la repulsión de las cargas superficiales presentes en la solución, de esta manera si la conductividad de la solución es alta, más cargas podrán ser transportadas por el jet y un mayor estiramiento e inestabilidad tendrá el flujo, lo que disminuye la energía necesaria para llevar a cabo el estiramiento, es decir menores voltajes son necesarios. A partir de los resultados obtenidos podemos observar que las soluciones poliméricas que presentan una mayor conductividad son las que se encuentran al 10% específicamente con una relación 60:40 con respecto al 80:20 ya que al haber más aislado proteico tiende a solvatarse dejando menos moléculas de agua que den la lectura correspondiente. Por otro lado, cuando se emplea una concentración al 12% la conductividad es menor debido a la gran cantidad de pululano presente que al solvatarse y no presentar cargas hay menor cantidad de iones en el medio que hacen que la conductividad disminuya, cabe destacar que entre menor sea la conductividad la película tiende a verse más uniforme y la solución no gotea tanto esto se le puede atribuir al voltaje tan elevado que se emplea, cuando se incrementa la concentración de polímero en las soluciones se obtienen fibras de diferente morfología (fibras con gotas) hasta el punto en que a concentraciones superiores al 11% p/v, la presencia de gotas disminuye y las fibras parecenser más continuas y de tamaño micrométrico.

Una vez ya analizados los factores y su influencia en la formación de la película se establecieron las condiciones a trabajar las cuales fueron las siguientes: Concentración sólidos totales/ relación JPI:pululano : 10% (80:20), 10% (60:40), 12% (80:20), velocidad de flujo: 0.3 mL/h, voltaje: 21KV, distancia: 14 cm. Para poder confirmar la morfología a nivel nanométrico con la finalidad de conocer si se forman nanofibras o alguna otra estructura submicrónica o si presentan defectos, se llevó a cabo un análisis morfológico mediante microscopia electrónica de barrido (MEB). En la Figura 18 se puede apreciar las morfologías obtenidas a distintas concentraciones de aislado proteico.

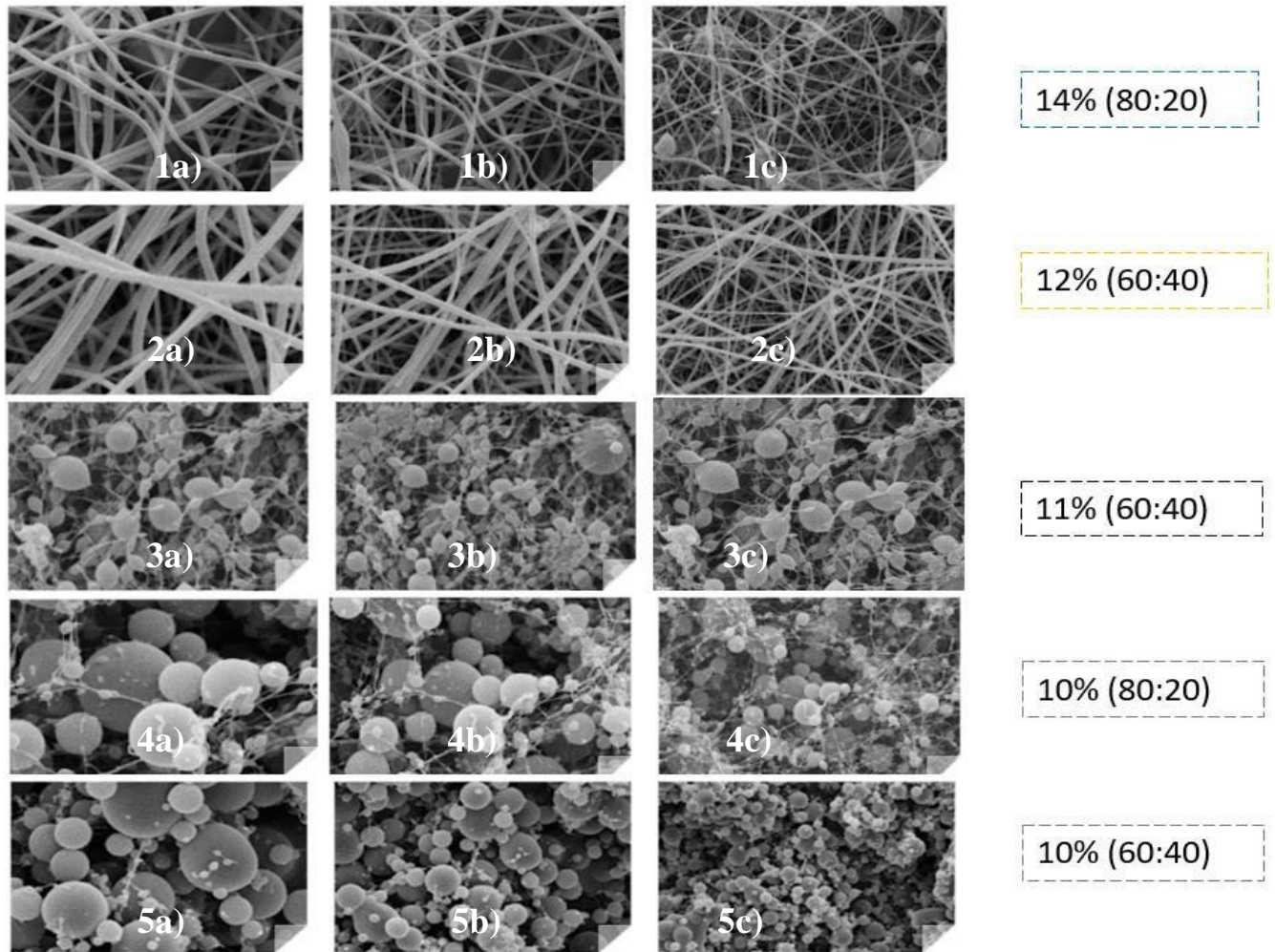


Figura 18 SEM películas electrohiladas de aislado proteico de yaca obtenidas a partir de diferentes concentraciones (10-12%) a) 15 000X, b) 10 000X c) 5000X.

Se puede apreciar que conforme la concentración de polímero aumenta se modifica la morfología del sistema a pesar de dejar constantes los demás factores como la velocidad de flujo, voltaje y distancia ya que a concentraciones de 12% predomina la técnica del electrohilado dando origen a nanofibras delgadas uniformes cuyo diámetro promedio fue de $106 \text{ nm} \pm 30.16$. (Bhushani et al 2014).

En la imagen 1a se aprecia la uniformidad de dichas fibras que al aumentar el campo se aprecian ciertas estructuras esféricas dando a entender que se llegaron a formar ciertas aglomeraciones esto a una relación 80:20.


Sin embargo, esto se puede modificar aumentando la cantidad de pululano a una relación 60:40 ya que se pueden observar nanofibras más gruesas y más uniformes lo cual indica que el pululano ayuda a darle firmeza, uniformidad y monodispersidad a las nanofibras como se puede observar en la figura 2c.

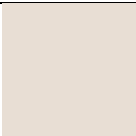

Por otro lado, a concentraciones de 11% se observan dos morfologías distintas, nanofibras y sistemas esféricos, esto se puede deber a que es la concentración límite en donde se encuentran tanto nanofibras como microcápsulas ya que la viscosidad del sistema promueve la formación de nanofibras aun con defectos. Sin embargo, a concentraciones de 10% predomina la técnica de electroatomizado ya que se puede observar como a una relación 80:20 se forman capsulas bien definidas con algunas fibras y al aumentar el contenido de pululano en la relación 60:40, estas son más escasas, aunque se puede apreciar la poli dispersión de las micropartículas generadas, lo cual puede generar problemas al momento de encapsular algún activo y a la capacidad de carga de las mismas.

6.1.4 Análisis de color

La determinación de color se llevó a cabo mediante el principio CIE L*a*b* el cual permite diferenciar el color en relación con la percepción humana (Ibraheem *et al.*, 2012). En este contexto, el color en aislados proteicos está relacionado con sus componentes pigmentarios y otras sustancias no pigmentarias como procianidinas y los ácidos fenólicos (Sharan *et al.*, 2020). En la tabla 10 se presentan los resultados de color de las películas obtenidas por electrohilado.

Tabla 10 Parámetros de color

Película	L*	a*	b*	Color de las muestras
10% (60:40)	91.33±1.01	0.92±0.20	5.93±0.31	

10% (80:20)	89.34±0.06	2.18±0.17	7.97±0.05	
12% (80:20)	85.52±1.03	3.57±0.24	12.70±0.70	

Las muestras analizadas no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en los parámetros de color (L^* , a^* , b^*). En el primer caso, los valores para la L de las películas, presentaron una tonalidad beige muy cercana al blanco por su cercanía al valor de 100, se puede apreciar que el valor de L disminuye conforme aumenta la cantidad de aislado proteico esto se debe al color natural de la solución a pH 12 ya que es de una tonalidad café oscura y al ser una concentración muy elevada, la cantidad de aislado es muy abundante en el medio pero no es lo suficientemente oscura para ser estadísticamente significativo hablando entre películas ya que visualmente no se percibe este cambio.

Para el parámetro a^* las magnitudes de los valores fueron de un valor positivo superiores a 0.5 denotando una tendencia al color rojo, y se observa claramente que la relación entre el color y la concentración de polímero es lineal debido a la coloración café intensa que presenta la solución a electrodiluir en sí. En cuanto a los valores de b^* positivos (tendencia al amarillo), los valores entre grupos son los que más variaron ya que las películas al presentar una coloración total beige son más fáciles de detectar las diferentes en las tonalidades de las mismas. Al igual se ve la relación lineal que hay entre el contenido de aislado proteico y la coloración de las películas.

6.3 Caracterización estructural

6.3.1 Espectroscopia FTIR

En la Figura 19 se observa el espectro del aislado proteico de semillas de yaca en el cual alrededor de números de onda de 3500 cm^{-1} la señal es muy intensa ya que es característico del grupo funcional $-OH$, y en los aislados proteicos es común que haya aminoácidos que aportan dicho grupo funcional como la serina, treonina, tirosina que en este caso es abundante y en si es responsable en cierto grado de la coloración característica de este aislado proteico.

Por otro lado, otro rango de número de onda muy importante a considerar en los aislados proteicos se da en rangos de 1700 a 1600 cm^{-1} ya que es donde se analiza la región amida I que brinda información sobre el grupo funcional carbonilo CO y la distribución de las estructuras secundarias y que cantidad hay de cada una bajo el modelo matemático de la deconvolución.

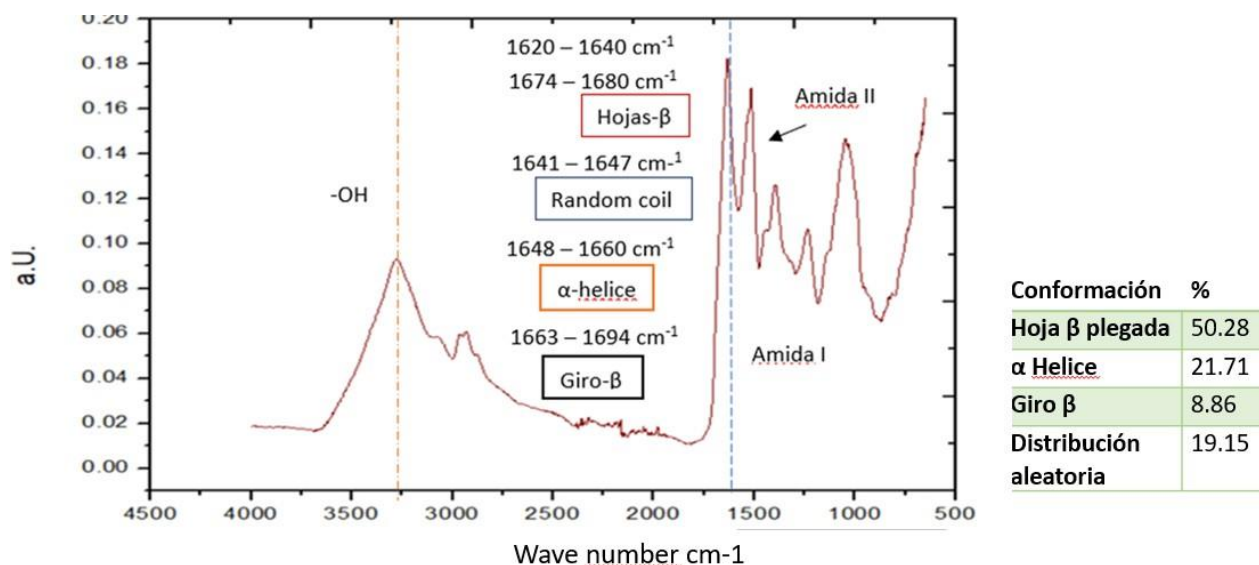


Figura 19 Espectroscopia FTIR del aislado proteico de yuca.

Previamente, se ha reportado la caracterización del aislado proteico de semillas de yuca mediante FTIR donde mencionan el porcentaje de cada estructura secundaria presente en el aislado, Haque et al. (2020) menciona que la estructura secundaria predominante es la hoja β (62.19%), seguido la alfa hélice (26.85%) y finalmente, giro beta (11%).

Comparando con lo obtenido experimentalmente hay una variación en cuanto al porcentaje de dichas estructuras ya que a pesar que coincide el orden en el que se distribuyen estas estructuras no coincide en el porcentaje de las mismas hoja beta (50.28%), alfa hélice (21.71%), giro beta (8.86%) y finalmente la distribución aleatoria (19.15%).

Estas variaciones se pueden deber principalmente a tres factores fundamentales en la obtención del aislado proteico como lo es el pH en el que se llevó a cabo la extracción ya que el primero fue a un pH de 9.0, mientras que el experimental fue a 11.0 puesto a que mayor sea la eficiencia de la extracción, mayor será la eficiencia del contenido del aislado, aparte de que al igual que si es sometido a un proceso unitario como lo es el secado por aspersion también afecta a las

proteínas y finalmente no se considera la distribución aleatoria y la sumatoria de dichas estructuras no se lleva a cabo al 100%. Por ello, al ajustar el modelo la r^2 obtenida es de 0.97 según lo reportado encontrándose 9 bandas mientras experimentalmente se obtuvieron 12 bandas con un ajuste de 0.98. Por otro lado, Resendiz, et al. (2019), analizaron el aislado proteico de yaca al someterlo a un tratamiento enzimático asistido por ultrasonido y se observa claramente que hay un cambio significativo al modificar los tratamientos en la conformación alfa, giros beta y los aleatorios aumentan su contenido mientras que la hoja beta disminuye el contenido hasta en un 10 %.

Es importante mencionar esto ya que el electrohilado tiene una influencia directa en el desdoblamiento de las estructuras secundarias además de que el polímero auxiliar puede ser una interferencia la cual pueda afectar el análisis. Por ello, se llevó a cabo un análisis de las deconvoluciones del aislado para compararlo una vez ya formada la película a tres diferentes concentraciones y proporciones de aislado/pululano. En la Figura 20 se observa el área a estudiar para las deconvoluciones para el aislado proteico.

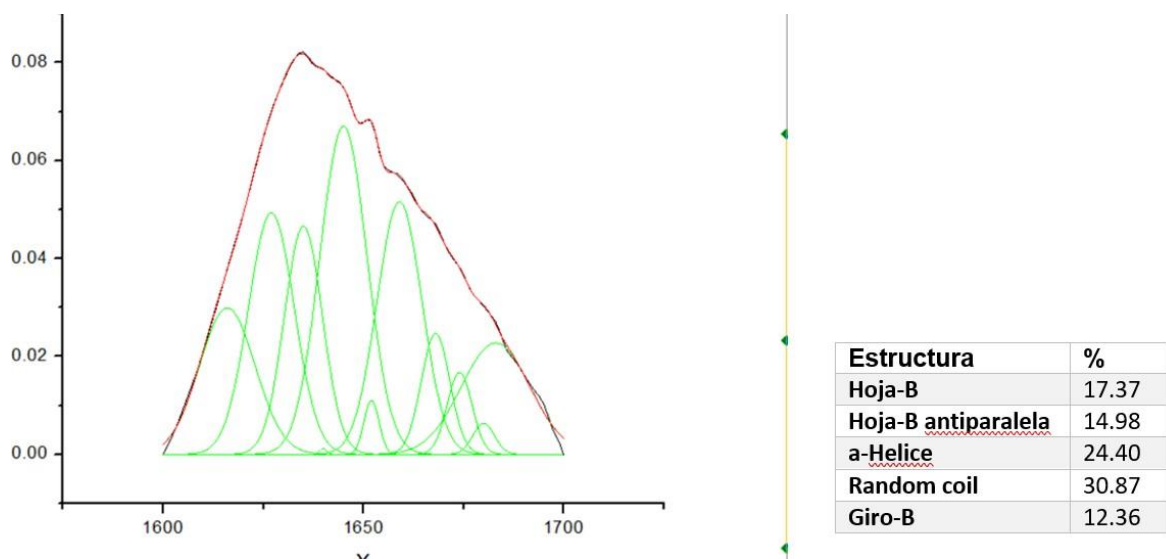


Figura 20 Deconvoluciones del aislado proteico de yaca

En la Figura 20 se observan 12 de los picos que se identifican característicos de las estructuras secundarias presentes en los cuales todos se ajustan al modelo, lo cual nos puede predecir el porcentaje de cada estructura de manera adecuada.

La estructura predominante en el aislado proteico es la estructura alternada o random coil cuyo número de onda es en un rango de 1643-1645 cm^{-1} (Shevkani, 2019). Por otro lado, Aceituno-Medina et al. (2015), reportaron la influencia que tiene el electrohilado en la distribución de estas estructuras observándose un cambio significativo. Sin embargo, se debe tomar en cuenta las interferencias que se pueden generar debido al polímero acarreador puesto que nos pueden dar un resultado erróneo.

Con este fin se llevó a cabo un análisis de la mezcla física a una proporción 1:1 y al aplicar las deconvoluciones, se obtuvieron los siguientes resultados, donde no se aprecia una diferencia en el modelo, figura 21.

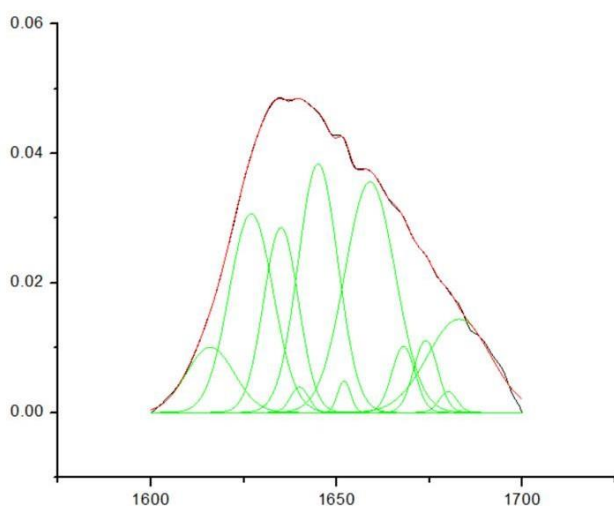


Figura 21 Deconvoluciones de la mezcla física aislado proteico/pululano (1:1)

Se aprecia, que el modelo es el mismo, la cantidad de picos es la misma. Sin embargo, al determinar el % de las estructuras se ve que en “*random coil*” la señal aumenta esto se puede deber a que en el espectro del pululano hay lectura, en la figura 22 se puede observar el espectro FTIR típico del pululano.

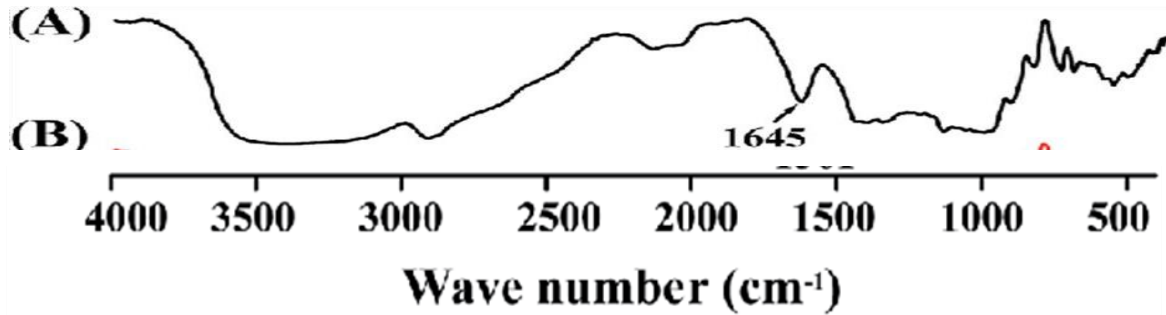
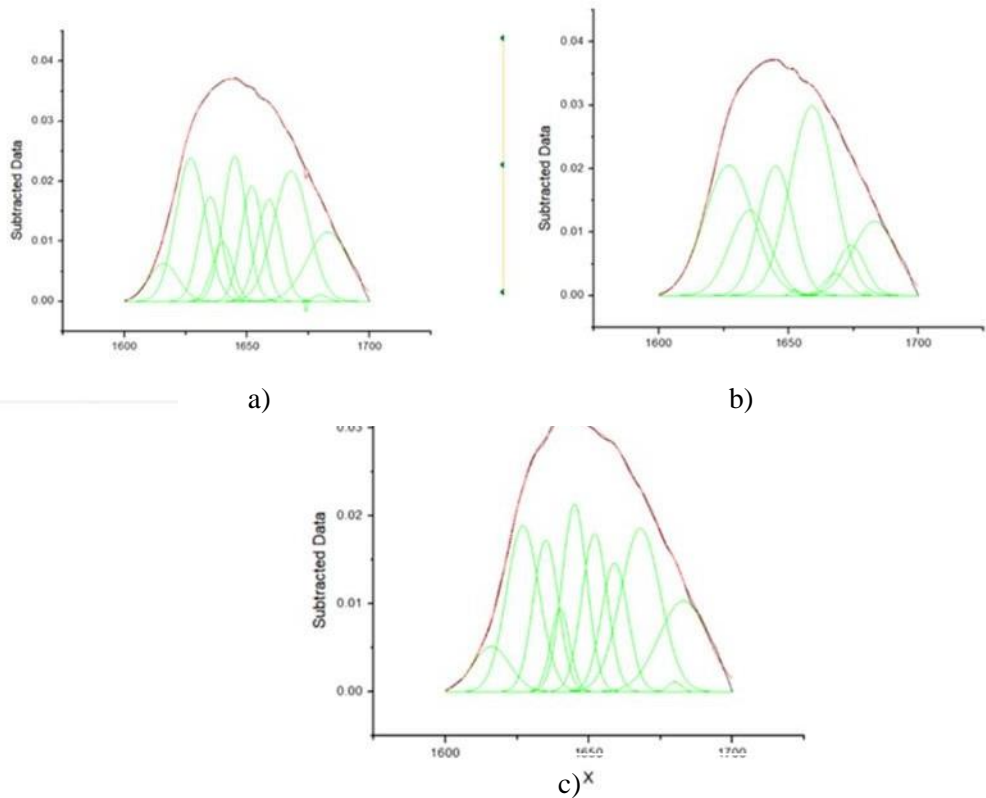


Figura 22 Espectro FTIR el pululano (Chen *et al* 2015).

Xia et al. (2013), reportaron que esta señal se da en el pululano cuando presenta moléculas de agua, es decir cuando esta hidratado. Sin embargo, se han reportado diversos espectros del pululano en el que esta señal es característica cuando se encuentra con otro polímero o material que facilita la interacción y formación de enlaces por puentes de hidrógeno (Luis et al., 2021).

A pesar de ser solo una mezcla dicho sistema es muy hidrofílico por lo que es muy predominante este tipo de enlaces. Se analizaron los perfiles FTIR de las películas al 10% (60:40), 10% (80:20) y 12% (80:20). La película al 10% (80:20) presentó una modificación en donde en promedio se ve una tendencia a disminuir el porcentaje de todas las estructuras secundarias, en mayor medida que en el caso de la mezcla física en específico a número de onda cercano a los 1600 nm^{-1} . Se podría inferir la interferencia del pululano o el otro aspecto a considerar sería el efecto del proceso del electrohilado. Figura 23.



Estructura	10% (80:20)	10% (60:40)	12% (80:20)
Hoja-B	16.98	15.96	14.15
Hoja-B antiparalela	15.30	21.58	16.72
α -Helice	31.90	39.31	27.61
Random coil	26.23	20.89	17.33
Giro-B	9.59	2.34	24.17

Figura 23 Deconvoluciones de las películas electrohiladas. a) 10% (80:20), b) 10% (60:40), c) 12% (80:20).

Al analizar las películas entre sí se puede apreciar que para poder ajustar el modelo de la fibra obtenida al 10% (80:20) y (60:40) se requirió eliminar 2 curvas a pesar de que están a la misma concentración de aislado y ambas están conformadas por micropartículas. Esto reafirma que el pululano al estar en mayor cantidad interfiere con las lecturas del porcentaje de las mismas inclusive haciendo que se tenga que hacer un ajuste con las deconvoluciones.

Finalmente, se puede concluir con que hay una ligera modificación al someter las muestras a la técnica del electrohilado aunque no se interfieren en gran medida al conocimiento de la distribución de las estructuras secundarias que no varían significativamente entre ellas, esto coincide con lo reportado por Aceituno-Medina et al. (2015).

En resumen, se puede apreciar un aumento de porcentaje en las estructuras α - hélice y la conformación aleatoria, se pensaría que esto se debe al efecto del electrohilado al ser un ambiente sumamente hidrofílico y por la naturaleza del aislado, el pululano y el medio alcalino abundante en grupos -OH la cantidad de cargas sometidas al voltaje aplicado inducirá un cambio en estas estructuras.

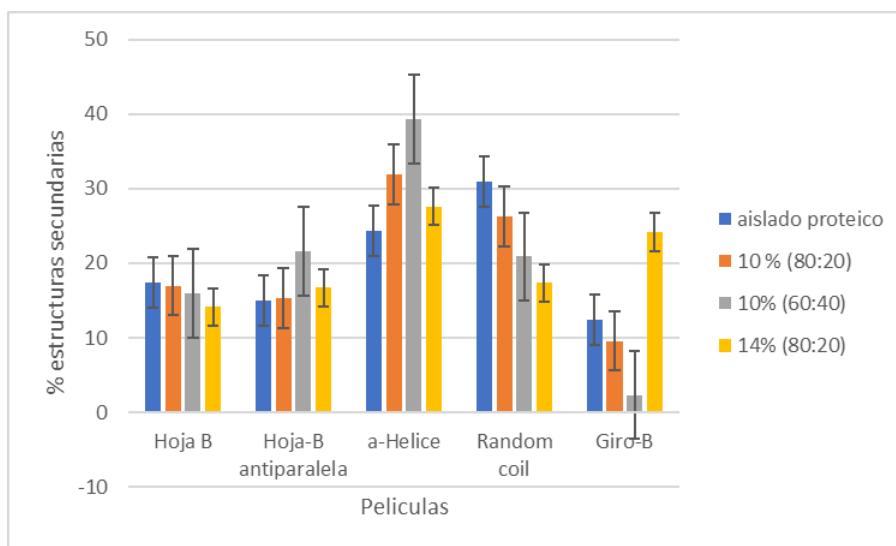


Figura 24 Estructuras secundarias en las películas.

6.3.2 Comportamiento térmico por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Para conocer el comportamiento térmico de las películas electrohiladas se llevó a cabo un estudio por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) aunque es necesario evaluar previamente el comportamiento del aislado proteico, pululano y una mezcla física relación 1:1 con la finalidad de determinar si hay algún cambio significativo inducido por el proceso del electrohilado. Se sabe que después de un proceso de calentamiento, los enlaces intermoleculares entre las proteínas se rompen y se transforman en su forma desnaturalizada (Brishti et al., 2017). La desnaturalización de proteínas regularmente se detecta como un pico endotérmico en el termograma (Gundogan y Karaca, 2020). En la Figura 25 se observan los termogramas

obtenidos del aislado proteico de yaca, pululano, mezcla física y las películas electrohiladas al 10% (60:40), 10% (80:20) y 12% (80:20) respectivamente.

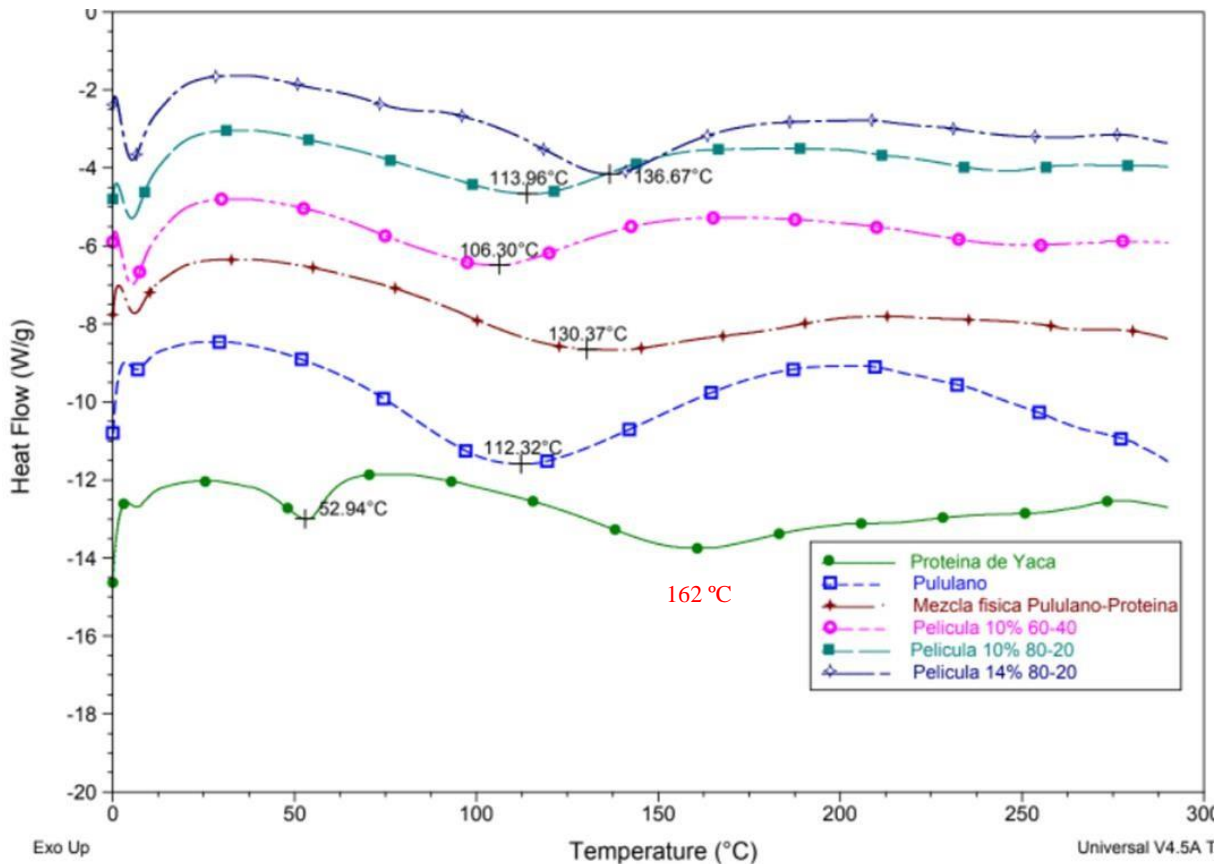


Figura 25 Termogramas obtenidos de aislado proteico de yaca (verde), pululano (azul), mezcla física (café), película 10% 80:20 (menta), película 10% 60:40 (rosa) y película 12% (azul).

El aislado proteico de yaca presenta un cambio endotérmico a una temperatura de 52.94 °C lo cual se atribuye al desdoblamiento de las proteínas, ya que de acuerdo con León et al. (2003) la temperatura de desnaturalización de las albuminas y globulinas presentes en un concentrado proteico de trigo donde el valor de T_m se dio en un rango de 50-55 °C, cabe mencionar que el aislado proteico de yaca es rico en albuminas y globulinas. Sin embargo, el mayor cambio térmico se presentó a una T_D de 162 °C. La T_D nos da información sobre las estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas respecto al rompimiento de puentes de hidrógeno que sirven de soporte para mantener la estructura secundaria de las proteínas, también nos indica la estabilidad térmica, mientras más alto sea el contenido de enlaces disulfuro en la proteína mayor será su estabilidad (Gundogan y Karaca, 2020). Lo cual se pudo observar que la completa desnaturalización del aislado se lleva a cabo a esa temperatura.

En el caso del termograma del pululano se puede observar que el pico endotérmico mostrado corresponde a su temperatura de fusión T_m (112.37°C), cabe mencionar que este polímero por lo general presenta un rango de fusión ($95\text{-}150^\circ\text{C}$) ya que depende de su peso molecular, su grado de cristalinidad, si esta anhidro o esta hidratado ya que por su distribución molecular generalmente hace que este material sea sumamente amorfo y cristalice de una forma rápida y adquiera un nuevo patrón cristalino por eso es sumamente utilizado en la formación de nanofibras. Por ello es común que se reporten distintos puntos de fusión, aunque la temperatura obtenida entra dentro del rango reportado.

Por otro lado, la mezcla física nos da una idea sobre cómo interactúan los polímeros y su representación térmica que en teoría se deberían observar las propiedades térmicas de ambos si es que la proporción a la que se encuentran es equitativa. Sin embargo, se puede observar en el termograma que la temperatura de desnaturalización aumenta con respecto al aislado proteico y el pululano por separado. Por lo que se puede observar en el termograma que la fusión es el promedio de ambos polímeros siendo 130.37°C debido a las propiedades coligativas de los mismos.

En el caso de las películas se puede observar como la T_m se modifica gradualmente conforme aumenta la cantidad de proteína ya que la que presenta mayor T_m es la película 12% y se acerca más a la T_m del aislado proteico, además de que se debe de tomar en cuenta el cambio morfológico que se da entre micropartículas y nanofibras, esto nos da una idea de la interacción entre el aislado y el polímero.

6.4 Incorporación del aceite esencial a las soluciones poliméricas empleadas para la obtención de las nanofibras.

6.4.1 Caracterización del aceite esencial de Naranja amarga por Cromatografía de gases acoplada a masas (CG-MS).

El aceite esencial utilizado fue el de la naranja amarga (*Citrus aurantium*) ya que es un subproducto agroindustrial presente en las cáscaras de dichas naranjas que son consideradas desecho en Mérida. El aceite fue obtenido por hidrodestilación (2%), método con mayor rendimiento que el arrastre de vapor (1.24%), debido a que el agua al entrar en contacto con la cáscara comienza a dilatar los componentes estructurales comienza a liberar el aceite en el medio, mientras que en el caso del arrastre de vapor solamente el vapor del agua es el que acarrea al aceite esencial.

Posteriormente se llevó a cabo una caracterización por cromatografía de gases acoplada a masas con la finalidad de saber la composición química de dicho aceite ya que se sabe que los aceites esenciales contienen alrededor de 30 terpenos oxigenados y no oxigenados dentro de los cuales algunos han demostrado capacidad antioxidante o antimicrobiana. En la Tabla 11 se muestran los componentes del aceite esencial de la naranja amarga, resaltándose el % relativo del limoneno que se encuentra en mayor proporción, seguido por el α y β pineno.

Tabla 11 Componentes del aceite de naranja amarga (*Citrus aurantium*).

Pico	Tr	Identificación	área	% relativo
1	4.607	1R- α -Pineno	5955233	1.93
2	5.493	Sabineno	674078	0.21
3	5.880	β -Pineno	15623032	5.06
4	6.319	α -fenandreno	271882	0.08
5	7.136	Limoneno	271836941	88.10
6	7.713	p-Menta-3,8-dieno	9193875	2.97
7	8.599	Oxido de cis-Linalool	357597	0.11
8	9.640	Linalol	882248	0.28
9	11.110	Oxido cis-Limoneno	1026285	0.33
10	11.308	trans-oxido de Limoneno	584108	0.18
11	13.872	α -Terpineol	434398	0.14
12	16.358	D-Carvona	323953	0.10
13	16.555	NO IDENTIFICADO	275395	0.08
14	20.031	Acetato de Geranilo	406864	0.13
15	20.745	Caryofileno	421178	0.13
16	28.383	Geranil linalool	280457	0.09

Cabe mencionar que al obtener los cromatogramas de los terpenos el área bajo la curva del limoneno es más de 12 veces mayor con respecto el pineno. En la Figura 26 se observan los cromatogramas.

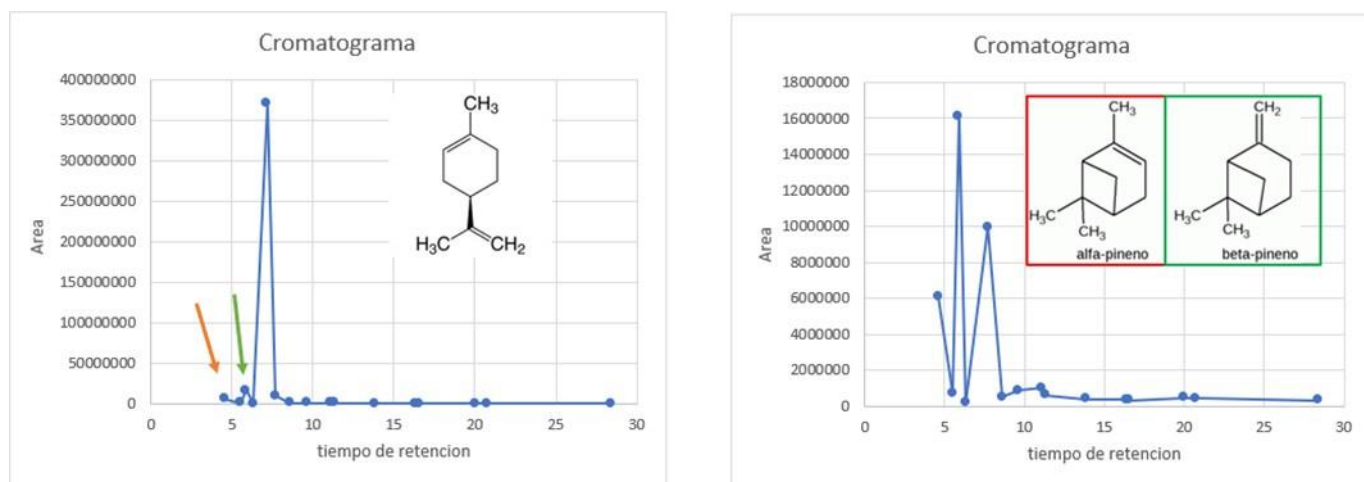


Figura 26 Cromatograma del Limoneno (izquierda) y alfa y beta pineno (derecha).

6.4.2 Capacidad antioxidante

Como se mencionó previamente algunos aceites esenciales presentan actividad antioxidante. Partiendo de la definición de Santos-Sanchez et al (2018) de lo que es un agente antioxidante, lo define como una sustancia que en bajas concentraciones retrasa o previene la oxidación de un sustrato. Los compuestos antioxidantes actúan a través de varios mecanismos químicos: transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), transferencia de un solo electrón (SET) y la capacidad de quelar metales de transición. Por lo que entre más dobles enlaces presente una estructura, mayor número de estructuras resonantes presente o bien que contenga más de un anillo aromático tendrá mayor capacidad antioxidante un ejemplo característico son los polifenoles.

Observándose que, tanto el limoneno como el pineno y sus isómeros solamente presentan dos dobles enlaces y muy alejados entre sí por lo que se podría predecir que la actividad antioxidante sería baja o nula. Por lo tanto, la prueba de Folin- Ciocalteu que es una prueba para polifenoles no se realizó. Sin embargo, se realizó la prueba de DPPH que es muy característica para evaluar la capacidad antioxidante.

La prueba de DPPH se suele realizar en medio hidroalcohólico. Es decir, metanol- agua. Sin embargo, se debe de considerar la naturaleza de la muestra ya que en el caso del aceite esencial no fue soluble en dicho medio. Generalmente en esos casos se suele utilizar una metodología

alterna del DPPH en el que es común cambiar el estándar como se suele utilizar el ácido ascórbico aunque se hizo la prueba utilizando el Trolox y se modificó el medio como el DMSO que es un solvente utilizado con mucha frecuencia ya que tiene la capacidad de disolver todo, debido a su naturaleza estructural y al par de electrones libres que posee el azufre logrando que sea parcialmente miscible con agua al igual que en solventes no polares, mientras que otro medio fue en etanol aunque cabe señalar que al tratar de disolver el aceite en el etanol la solución adquirió cierta turbidez que puede influir en los resultados. Por lo mismo se hicieron 3 diluciones del aceite esencial 1/25, 1/50 y 1/100. En la Figura 27 se muestran los resultados obtenidos.

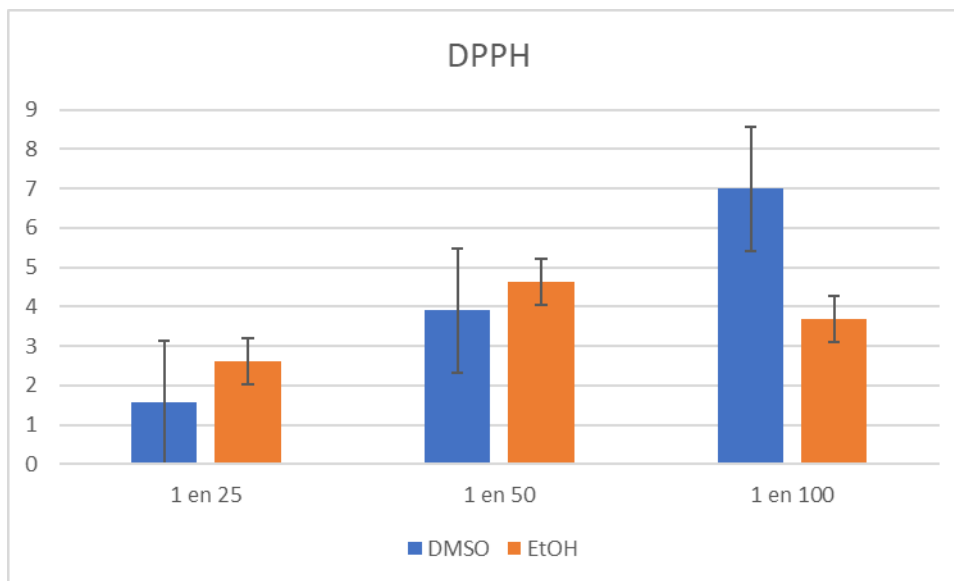


Figura 27 Capacidad antioxidante por DPPH en diferentes medios. DMSO (azul) y Etanol (naranja).

El histograma de frecuencias muestra que el % de inhibición es muy bajo menor al 10% por lo que con estas lecturas no es viable determinar la capacidad antioxidante dichos terpenos no tienen buena capacidad de inhibir un radical o algún factor que induzca la oxidación, esto concuerda con lo que mencionan Radan et al. (2018), que analizaron el aceite esencial de naranja amarga, concluyendo que su capacidad antioxidante es muy baja, por ende, dicho aceite no puede ser empleado con fines antioxidantes en las películas. Sin embargo, puede tener actividad antimicrobiana.

Los aceites esenciales son no polares e inmiscibles con el agua por lo que no es posible integrarlo directamente a la solución polimérica de las fibras. Para resolver este problema Ataei et al. (2020) mencionan que es posible integrar los aceites esenciales mediante encapsulación en liposomas y ciclodextrinas que fungen como sistemas de liberación controlada lo cual es conveniente ya que ayuda a que el aceite se libere gradualmente y se dé el efecto antimicrobiano por los componentes volátiles.

De acuerdo con los resultados y su análisis, se utilizó como vehículo la β -ciclodextrina ya que es la que tienen mayor capacidad de encapsular aceites esenciales además de que no tiene problemas en poder disolverse en medios acuosos ni alcalinos (Pinho et al. 2013) . Estos una vez que se le adiciona el aceite esencial se convierten en complejos de inclusión al encapsular el aceite esencial.

6.4.3 Microscopia Electrónica de Barrido de los complejos de inclusión

Para establecer la eficiencia de las ciclodextrinas para encapsular un activo se suelen trabajar distintas estequiometrias ya que muchas veces se requieren más de una ciclodextrina para encapsular un activo o viceversa dos moléculas de algún activo de interés pueden ser encapsuladas por una sola ciclodextrina esto depende mucho del peso molecular, polaridad y área que ocupa la molécula. Por ello, se prepararon tres sistemas a diferentes estequiometrias para saber cuál era la más eficiente para encapsular. Se trabajaron a 1:1, 1:2 y 2:1 ciclodextrinas: aceite esencial respectivamente. En la figura 28 se observan las morfologías obtenidas por MEB.

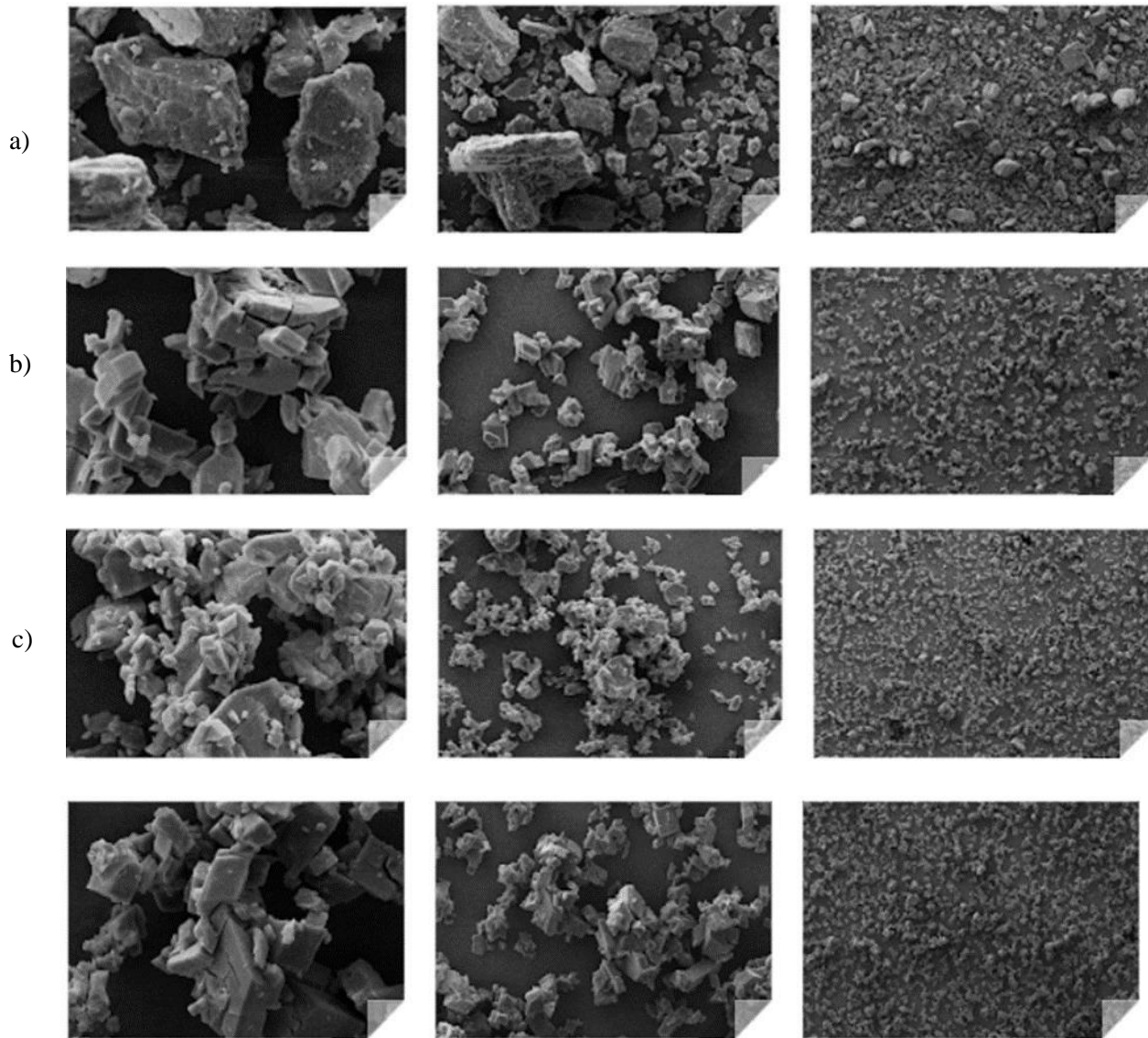


Figura 28 Micrografías de los complejos de inclusión a) beta ciclodextrina, b) complejo de inclusión 1:1 c) complejo de inclusión 1:2 d) complejo de inclusión 2:1 Falta indicar los aumentos

Los estudios de MEB fueron realizados con los complejos cargados con el aceite esencial y uno blanco de las ciclodextrinas y se puede observar que la fila a) que corresponde a las β ciclodextrina cuyo tamaño de partícula promedio es de $5.27 \mu\text{m}$ tiene una estructura compacta bien definida con superficie rugosa, porosa e irregular con ciertos desniveles.

Sin embargo, al observar la fila b) correspondiente a los complejos de inclusión 1:1 apreciándose que, el cambio morfológico es muy evidente ya que la estructura disminuye su tamaño de partícula ligeramente a 5.16 μm , además de que tiende a cuartearse por la adición del aceite.

En el caso del complejo 1:2 c) la estructura se cuartea más y se pueden observar mayor cantidad de subestructuras cuyo tamaño de partícula promedio es de 2.76 μm , esto se debe a la pérdida total de la estructura compacta por la gran cantidad de aceite esencial formándose agregados de menor tamaño de partícula.

Finalmente, en el complejo 2:1 d) se observa que el complejo se mantiene integro compacto con ciertos desniveles. Sin embargo, morfológicamente hablando las estructuras son más parecidas a la β – ciclodextrinas, además de que su tamaño de partícula incrementa hasta las 8.34 μm , esto se puede deber a que al no tener la capacidad de encapsular tanto aceite la ciclodextrina se satura y no mantiene el activo además de tomar en cuenta que es un equilibrio dinámico. Esto refuerza la idea de que la estequiometría de los complejos formados es de 1:2 y por ende para los posteriores estudios se tomaran en cuenta solo los complejos 1:1 y 1:2.

En la Figura 29 se observan las imágenes representativas de los complejos de inclusión y la β -ciclodextrina y los cambios morfológicos por influencia del aceite esencial, a una resolución de 1500 X.

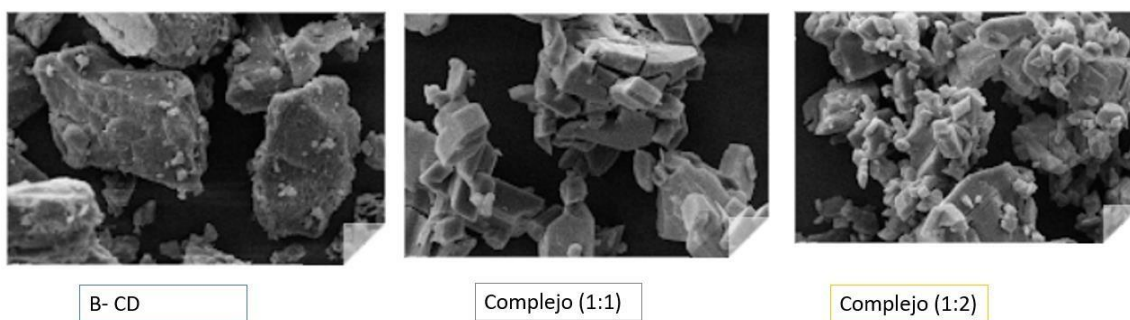


Figura 29 Micrografías de los cambios morfológicos entre las estructuras a) B-ciclodextrinas b) complejo 1:2 y complejo 2:1.

6.4.4 Espectroscopia FTIR

La espectroscopia infrarroja puede brindar un análisis más exhaustivo y complementario a las micrografías ya que con ella se pueden ver los enlaces formados y los grupos funcionales característicos de estos complejos que se forman. Para eso se analizaron la β - ciclodextrina, complejos 1:1, 1:2 y 2:1 y el aceite esencial de naranja, con la finalidad de conocer cuáles son los grupos funcionales predominantes en cada estructura y si hay una asociación entre ambos y dar una idea de la compatibilidad de ambas entidades. En la figura 30 se pueden apreciar los espectros obtenidos.

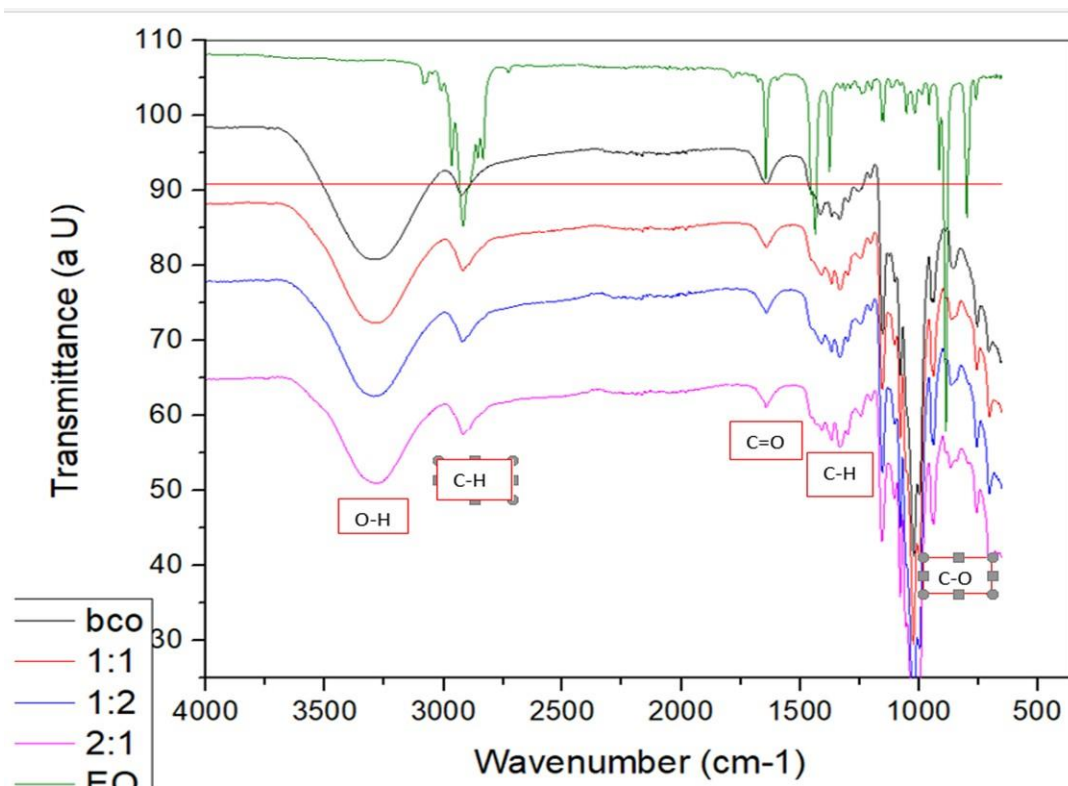


Figura 30 Espectroscopia FTIR de beta ciclodextrina (negro), complejo 1:1 (rojo), complejo 1:2 (azul), complejo 2:1 (rosa) y aceite esencial (verde).

Una vez obtenidos los espectros de cada una de las estructuras, al analizar la β ciclodextrina se puede observar que tanto cuando no presenta encapsulados y cuando forma los complejos hay una intensidad muy grande a números de onda alrededor de los 3300 cm^{-1} que es característico de los grupos -OH y eso se debe a que las ciclodextrinas al ser azúcares cíclicos los grupos funcionales que predominan son los grupos hidroxilo que son abundantes. Sin embargo, al

contrastar con el espectro del aceite esencial se puede observar que el aceite no presenta señal a esos números de onda, esto sugiere a que no existen grupos hidroxilo y ni siquiera oxigenados que coincide con lo obtenido por CG-MS.

Alrededor de números de onda cercanos a los 2700 cm^{-1} todos los sistemas tanto los complejos de inclusión, ciclodextrina y aceite esencial presentan una señal dado a que corresponde a los grupos funcionales -CH el cual todos presentan dicha estructura que es la base de las moléculas orgánicas, y dado a la complejidad del aceite esencial y sus terpenos dicha señal es más alta con respecto a los demás sistemas.

Mientras que a los 1350 cm^{-1} es otro número de onda donde todas las estructuras dan lectura ya que es representativo del grupo carbonilo ya sean compuestos cetónicos, aldehídicos, ácidos o esterés, que analizando los terpenos del aceite puede ser que se trate de los esterés del acetato de linalio, además de que los azúcares que forman los complejos suelen ser azúcares aldehídicos, mientras que a 1250 cm^{-1} igual comparte señal debido a los otros enlaces -CH.

Finalmente, la señal más intensa se observa a número de onda de 1000 y 1700 cm^{-1} que corresponden a los grupos funcionales -CH- o las cadenas alquílicas que se presentan en los azúcares y los terpenos del aceite, se puede observar que a estos números las interacciones son mayores ya que todo componente orgánico independiente los grupos funcionales que contenga debe presentar este tipo de enlaces.

Aunque se puede dar una idea de los grupos funcionales de los sistemas no es posibles conocer si se llevó a cabo una interacción entre las ciclodextrinas con el aceite. Sin embargo, al aplicar el modelo de la 2da derivada entre los complejos se puede ver el desplazamiento del número de onda con mayor claridad. En la figura 31 se observan los espectros al aplicar la 2da derivada.

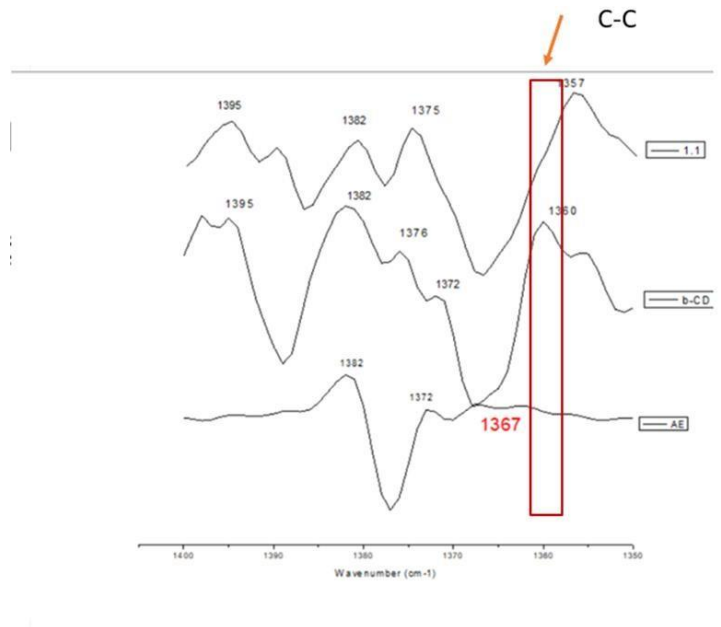


Figura 28 2a derivada del espectro entre los complejos de inclusión

Es más fácil distinguir este tipo de interacciones mediante este modelo ya que los enlaces y las fuerzas que se llegan a dar son débiles por la naturaleza del aceite esencial y en el núcleo de la ciclodextrina que es hidrófobo este desplazamiento según Hogenbum et al 2021, puede estar relacionado directamente con la capacidad de encapsulamiento de la ciclodextrina y a su vez con su estequiometría. La forma más eficiente de poder determinar esta capacidad es mediante la determinación de la eficiencia de encapsulamiento por un método analítico.

6.4.5 Formación de las películas electrohiladas con el complejo de inclusión

Una vez ya caracterizadas las fibras y los complejos por separado es necesario conocer la compatibilidad de ambos sistemas químicamente y si se pueden obtener las fibras con las mismas condiciones de electrohilado.

Otro factor importante para considerar es la cantidad de complejo de inclusión a adicionar a la mezcla polimérica. Yun et al (2015), estableció porcentajes de 2-5%; sin embargo, hay que considerar diversos factores como la naturaleza del activo encapsulado, la viscosidad de la solución, su polaridad, constante dieléctrica e inclusive tensión superficial ya que dependiendo de eso será el grado de modificación que sufrirá el sistema. Dada la naturaleza del aceite a pesar de estar complejoado, adicionar el 2 % de complejo de inclusión a la mezcla polimérica

disminuyó la viscosidad de la solución por lo que fue necesario adaptar y modificar la relación JPI/pululano, se trabajó con una relación 60/40 JPI: pululano. A su vez el voltaje tuvo que ser modificado debido a que menor voltaje impedía la formación del cono de Taylor, por lo que se consideró trabajar con un voltaje de 25 KV y una velocidad de flujo de 0.25 LmL/hr.

Una vez obtenidas las películas de JPI:pululano incorporando el complejo β - ciclodextrina: aceite esencial se realizó una microscopia electrónica de barrido con la finalidad de analizar y contrastar cambios morfológicas y tamaño de las nanofibras con el 2% de complejos de inclusión que es la máxima concentración que puede soportar el sistema sin comprometer su comportamiento reológico. En la figura 29 se aprecian dichas imágenes las imágenes de las soluciones trabajadas.

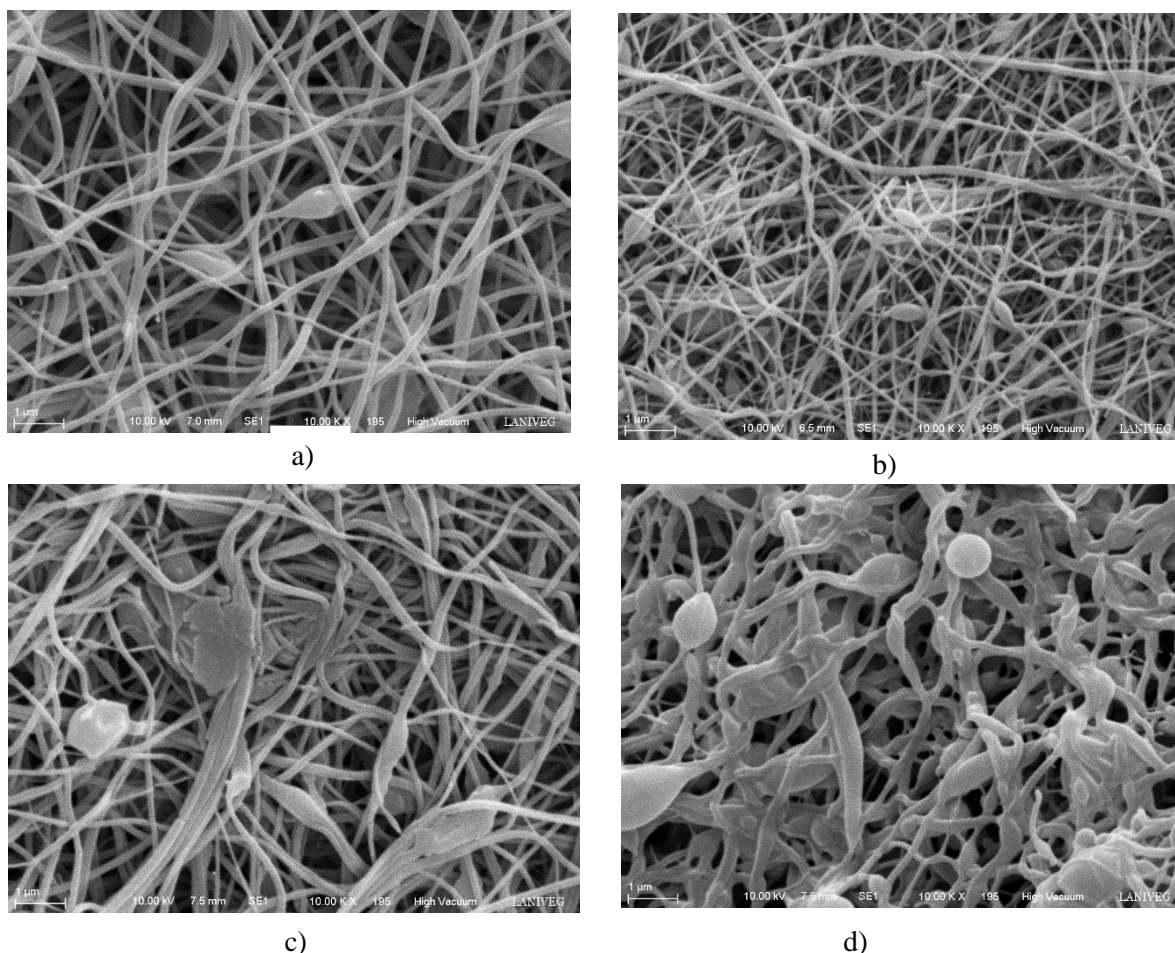


Figura 29 MEB de las películas electrohiladas con el complejo de inclusión a) 10% aislado proteico:beta ciclodextrina b) 10% (80:20) 2% complejo 1:1 c) 10% (60:40) 2% complejo 1:1 d) 12% (60:40) 2% complejo 1:1

Como se puede apreciar en las micrografías hay cambios significativos al momento de adicionar los complejos de inclusión, a una resolución de 10 000 X se puede hacer un análisis morfológico que en el caso de las nanofibras blanco que llevan la β - ciclodextrina, las fibras mantienen su integridad. Sin embargo, empiezan a adquirir defectos morfológicos derivados de la agregación de dichas fibras las denominadas “cuentas” que impiden que la fibra sea uniforme probablemente se deba a la influencia de la ciclodextrina y por su tamaño de partícula que al ser grande influirá en el proceso del electrohilado.

Por otro lado, para las películas que contienen el 10% del aislado proteico (80:20) se observan fibras similares a las fibras blanco a pesar de que ya contienen el complejo de inclusión 1:1 siguen presentando el defecto de los “cuentas”. Sin embargo, al observar la película al 10% (60:40), se puede apreciar que hay estructuras presentes del complejo de inclusión embebidos entre las nanofibras pero ya no hay presencia de agregación de fibras esto se puede deber al aumento de viscosidad del sistema debido a la mayor cantidad del pululano lo que puede dificultar la solubilidad y la completa incorporación del complejo de inclusión. En el caso, de la figura d) correspondiente a la película al 12% (80:20) se aprecia que comienzan a presentarse estructuras esféricas esto se puede deber a que la muestra se llegó a hidratar ya que también se puede observar que las nanofibras sufren un cierto grado de hinchamiento. En la figura 30 se hace la comparación de los diámetros de las nanofibras.

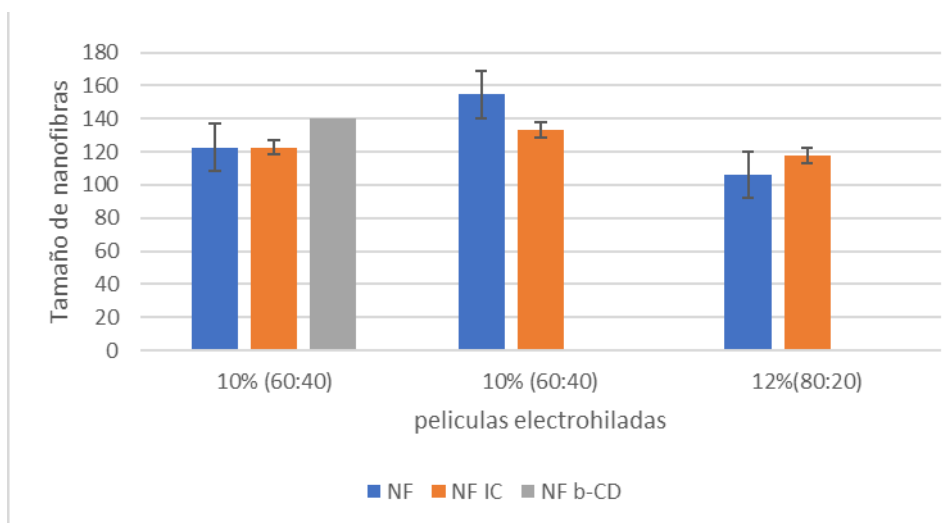


Figura 30 Comparación en el diámetro de la nanofibras (azul), nanofibras con complejos de inclusión (anaranjado) y fibras con ciclodextrinas.

Se hizo la medición del diámetro de las nanofibras obtenidas, la media obtenida fue de 100 nanofibras con la finalidad de contrastarlas con el diámetro de las nanofibras sin el complejo de inclusión y se observó que no hubo cambios significativos. Por lo que dichos complejos no interfieren en la formación de las nanofibras.

7 CONCLUSIONES

Se obtuvieron nanofibras en condiciones alcalinas lo cual no es muy común derivado a las propiedades inherentes de la solución que al ser muy polar y los tipos de enlaces que se forman en el medio dificultan la evaporación del solvente por lo que repercute directamente en la morfología de las nanofibras. Sin embargo, se observó que por las condiciones experimentales del proceso trabajadas se pudieron obtener fibras bien definidas sin defectos por la influencia del solvente.

Por otro lado, se determinó que uno de los factores críticos a considerar es la concentración del aislado proteico pues esto influyo directamente en la obtención de diferentes sistemas con distintas morfologías ya que tanto las nanofibras como las micropartículas distinta eficiencia de encapsulamiento, teniendo la capacidad de poder encapsular distintos activos de interés dependiendo las condiciones del sistema.

Visualmente las películas adquirieron una consistencia homogénea con un color muy tenue dando la capacidad de poder ser utilizadas en distintos alimentos al igual que en distintas bebidas puesto que al tener un pH elevado al ser adicionado a un alimento o bebida acida se puede obtener un pH adecuado.

Para poder caracterizar dichos sistemas se llevaron a cabo estudios de SEM y FTIR y así poder tener un poco más de conocimiento de la composición de dichas nanofibras

Así mismo, se evaluó la capacidad de incluir algún sistema acarreador de activos no polares como el aceite esencial de naranja amarga en ciclodextrinas y se caracterizaron fisicoquímicamente con la finalidad de conocer la influencia que tiene el aceite esencial en los mismos para posteriormente adicionarlos en las nanofibras y caracterizar sus propiedades mediante FTIR y microscopia electrónica SEM

Estos resultados podrían ser beneficiosos para ofrecer nuevas alternativas para la conservación de distintos alimentos, además de poder aportar nuevas propiedades sensoriales, nutrimentales o nutraceúticas en la formulación de nuevos productos o aditivos.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Vázquez, G., Ortiz-Frade, L., Figueroa-Cárdenas, J. D., López-Rubio, A., & Mendoza, S. (2020). Electrospinnability study of pea (*Pisum sativum*) and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using the conformational and rheological behavior of their protein isolates. *Polymer Testing*, *81*.
<https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2019.106217>
- Ajayi, I. A. (2008). Comparative study of the chemical composition and mineral element content of *Artocarpus heterophyllus* and *Treculia africana* seeds and seed oils. *Bioresource Technology*, *99*(11), 5125–5129. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.027>
- Akman, P. K., Bozkurt, F., Balubaid, M., & Yilmaz, M. T. (2019). Fabrication of Curcumin-loaded Gliadin Electrospun Nanofibrous Structures and Bioactive Properties. *Fibers and Polymers*, *20*(6), 1187–1199. <https://doi.org/10.1007/s12221-019-8950-8>
- Anu Bhushani, J., & Anandharamakrishnan, C. (2014). Electrospinning and electro spraying techniques: Potential food based applications. *Trends in Food Science and Technology*, *38*(1), 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.03.004>
- Ataei, S., Azari, P., Hassan, A., Pinguan-Murphy, B., Yahya, R., & Muhamad, F. (2020). Essential Oils-Loaded Electrospun Biopolymers: A Future Perspective for Active Food Packaging. *Advances in Polymer Technology*, *2020*, 1–21. <https://doi.org/10.1155/2020/9040535>
- Azeez, S., Lasekan, O., Jinap, S., & Sulaiman, R. (2015). Effect of roasting conditions on the browning intensity and structural changes in jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seeds. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(12), 8050–8058. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1900-6>
- Azhdarzadeh, F., & Hojjati, M. (2016). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Leaf, Ripe and Unripe Peel of Bitter Orange (*Citrus aurantium*) Essential Oils. *Nutrition and Food Sciences Research*, *3*(1), 43–50. <https://doi.org/10.18869/acadpub.nfsr.3.1.43>
- Aziz, S., Hosseinzadeh, L., Arkan, E., & Azandaryani, A. H. (2019). Preparation of electrospun nanofibers based on wheat gluten containing azathioprine for biomedical application. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, *68*(11), 639–646.
<https://doi.org/10.1080/00914037.2018.1482464>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, *46*(2), 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Bnina, E. Ben, Hajlaoui, H., Chaieb, I., Daami-Remadi, M., Said, M. Ben, & Jannet, H. Ben. (2019).

- Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activities of the tunisian Citrus aurantium essential oils. *Czech Journal of Food Sciences*, 37(2), 81–92. <https://doi.org/10.17221/202/2017-CJFS>
- Botre, D. A., Soares, N. de F. F., Espitia, P. J. P., Sousa, S. de, & Renhe, I. R. T. (2010). Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. *Revista Ceres*, 57(3), 283–291. <https://doi.org/10.1590/s0034-737x2010000300001>
- Campos, C. A., Gerschenson, L. N., & Flores, S. K. (2011). Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 849–875. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0434-1>
- Chávez-Santiago, J. O., Perales-Torres, A. L., Alemán-Castillo, S. E., & Santiago-Adame, R. (2020). Composición química proximal de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam .). *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 5, 207–210.
- Chen, H. (1995). Functional Properties and Applications of Edible Films Made of Milk Proteins. *Journal of Dairy Science*, 78(11), 2563–2583. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76885-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76885-0)
- Cho, D., Nnadi, O., Netravali, A., & Joo, Y. L. (2010). Electrospun hybrid soy protein/PVA fibers. *Macromolecular Materials and Engineering*, 295(8), 763–773. <https://doi.org/10.1002/mame.201000161>
- Chrips, N. R., Balasingh, R. G. S., & Kingston, C. (2008). Nutrient constituents of neglected varieties of *Artocarpus heterophyllus* Lam. from Kanyakumari district, South India. *Journal of Basic and Applied Biology*, 2(1), 36–37.
- De Matos, S. P., Teixeira, H. F., De Lima, Á. A. N., Veiga-Junior, V. F., & Koester, L. S. (2019). Essential oils and isolated terpenes in nanosystems designed for topical administration: A review. *Biomolecules*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/biom9040138>
- de Melo, A. A. M., Geraldine, R. M., Silveira, M. F. A., Torres, M. C. L., e Rezende, C. S. M., Fernandes, T. H., & de Oliveira, A. N. (2012). Microbiological quality and other characteristics of refrigerated chicken meat in contact with cellulose acetate-based film incorporated with rosemary essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1419–1427. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400025>
- Dhall, R. K. (2013). Advances in Edible Coatings for Fresh Fruits and Vegetables: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(5), 435–450. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.541568>
- Dosoky, N. S., & Setzer, W. N. (2018). Biological activities and safety of citrus spp. Essential oils.

- International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 1–25. <https://doi.org/10.3390/ijms19071966>
- Du, W. X., Avena-Bustillos, R. J., Sheng, S., Hua, T., & McHugh, T. H. (2011). Antimicrobial volatile essential oils in edible films for food safety. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, 2(February 2015), 1124–1134.
- Emiroğlu, Z. K., Yemiş, G. P., Coşkun, B. K., & Candoğan, K. (2010). Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science*, 86(2), 283–288. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.016>
- Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., & Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science and Technology*, 22(6), 292–303. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.02.004>
- Figen, A. K. (2020). History, Basics, and Parameters of Electrospinning Technique. *Electrospun Materials and Their Allied Applications*, 53–69. <https://doi.org/10.1002/9781119655039.ch2>
- Galvão, J. G., Cerpe, P., Santos, D. A., Gonsalves, J. K. M. C., Santos, A. J., Nunes, R. K. V., Lira, A. A. M., Alves, P. B., La Corte, R., Blank, A. F., Silva, G. F., Cavalcanti, S. C. H., & Nunes, R. S. (2019). Lippia gracilis essential oil in β -cyclodextrin inclusion complexes: an environmentally safe formulation to control Aedes aegypti larvae. *Pest Management Science*, 75(2), 452–459. <https://doi.org/10.1002/ps.5138>
- Higashi, S., Hirai, T., Matsubara, M., Yoshida, H., & Beniya, A. (2020). Dynamic viscosity recovery of electrospinning solution for stabilizing elongated ultrafine polymer nanofiber by TEMPO-CNF. *Scientific Reports*, 10(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69136-2>
- Hossain, M. T. (2014). Development and Quality Evaluation of Bread Supplemented with Jackfruit Seed Flour. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3(5), 484. <https://doi.org/10.11648/j.ijnfs.20140305.28>
- Kebede, T. G., Dube, S., & Nindi, M. M. (2018). Fabrication and characterization of electrospun nanofibers from Moringa stenopetala seed protein. *Materials Research Express*, 5(12). <https://doi.org/10.1088/2053-1591/aae04c>
- Lin, D., & Zhao, Y. (2007). Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6(3), 60–75. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2007.00018.x>
- Liu, W., Liu, W., Ye, A., Peng, S., Wei, F., Liu, C., & Han, J. (2016). Environmental stress stability of microencapsules based on liposomes decorated with chitosan and sodium alginate. *Food Chemistry*,

196, 396–404. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.050>

- López-Rubio, A., Blanco-Padilla, A., Oksman, K., & Mendoza, S. (2020). Strategies to improve the properties of amaranth protein isolate-based thin films for food packaging applications: Nano-layering through spin-coating and incorporation of cellulose nanocrystals. *Nanomaterials*, *10*(12), 1–12. <https://doi.org/10.3390/nano10122564>
- Maurya, P., & Mogra, R. (2016). Assessment of Consumption Practices of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* lam.) Seeds in Villages of Jalalpur Block District Ambedarnagar (U.P.) India. *Remarking*, *2*(8), 73–75.
- Mele, E. (2020). Electrospinning of essential oils. *Polymers*, *12*(4). <https://doi.org/10.3390/POLYM12040908>
- Moradi, S., Barati, A., Tonelli, A. E., & Hamed, H. (2020). Chitosan-based hydrogels loading with thyme oil cyclodextrin inclusion compounds: From preparation to characterization. *European Polymer Journal*, *122*, 109303. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109303>
- Neo, Y. P., Swift, S., Ray, S., Gizdavic-Nikolaidis, M., Jin, J., & Perera, C. O. (2013). Evaluation of gallic acid loaded zein sub-micron electrospun fibre mats as novel active packaging materials. *Food Chemistry*, *141*(3), 3192–3200. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.018>
- Nieuwland, M., Geerdink, P., Brier, P., Van Den Eijnden, P., Henket, J. T. M. M., Langelaan, M. L. P., Stroeks, N., Van Deventer, H. C., & Martin, A. H. (2013). Food-grade electrospinning of proteins. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *20*, 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.09.004>
- Okutan, N., Terzi, P., & Altay, F. (2014). Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers. *Food Hydrocolloids*, *39*, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.12.022>
- Otoni, C. G., Avena-Bustillos, R. J., Azeredo, H. M. C., Lorevice, M. V., Moura, M. R., Mattoso, L. H. C., & McHugh, T. H. (2017). Recent Advances on Edible Films Based on Fruits and Vegetables—A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *16*(5), 1151–1169. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12281>
- Palazzolo, E., Armando Laudicina, V., & Antonietta Germanà, M. (2013). Current and Potential Use of Citrus Essential Oils. *Current Organic Chemistry*, *17*(24), 3042–3049. <https://doi.org/10.2174/13852728113179990122>
- Park, J. Y., Lee, I. H., & Bea, G. N. (2008). Optimization of the electrospinning conditions for preparation

- of nanofibers from polyvinylacetate (PVAc) in ethanol solvent. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 14(6), 707–713. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2008.03.006>
- Pinho E, Grootveld M, Soares G, Henriques M. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydrate Polymers*. 2014;101:121-135. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.08.078
- Ranasinghe, R. A. S. N., Maduwanthi, S. D. T., & Marapana, R. A. U. J. (2019). Nutritional and Health Benefits of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.): A Review. *International Journal of Food Science*, 2019(January). <https://doi.org/10.1155/2019/4327183>
- Raval, D., & Ramani, V. (2019). A Review on Electrospinning Technique and Its Application in the Field Of Nanoencapsulation of Bioactive Compounds. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(07), 2724–2730. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.807.334>
- Resendiz-Vazquez, J. A., Ulloa, J. A., Urías-Silvas, J. E., Bautista-Rosales, P. U., Ramírez-Ramírez, J. C., Rosas-Ulloa, P., & González-Torres, L. (2017). Effect of high-intensity ultrasound on the technofunctional properties and structure of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed protein isolate. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37, 436–444. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.01.042>
- Rodoplu, D., & Mutlu, M. (2012). Effects of electrospinning setup and process parameters on nanofiber morphology intended for the modification of quartz crystal microbalance surfaces. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 7(2), 118–123. <https://doi.org/10.1177/155892501200700217>
- Rodríguez-Palomera, M., Cambero-Campos, O. J., Luna-Esquivel, G., Robles-Bermúdez, A., & Cambero-Nava, K. G. (2017). ENTOMOFAUNA ASOCIADA AL CULTIVO DE YACA (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) EN NAYARIT, MÉXICO. *Entomología Mexicana*, 4(4), 220–225. http://www.entomologia.socmexent.org/revista/entomologia/2017/EA/EM0122017_220-225.pdf
- Roy Chowdhury, A., Bhattacharyya, A. K., & Chattopadhyay, P. (2012). Study on functional properties of raw and blended jackfruit seed flour (a non-conventional source) for food application. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 3(3), 347–353.
- Salgado, P. R., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Mauri, A. N., & Montero, M. P. (2013). Sunflower protein films incorporated with clove essential oil have potential application for the preservation of fish patties. *Food Hydrocolloids*, 33(1), 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.02.008>
- Sanei-Dehkordi, A., Sedaghat, M. M., Vatandoost, H., & Abai, M. R. (2016). Chemical compositions of the peel essential oil of *Citrus aurantium* and its natural larvicidal activity against the malaria vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) in comparison with *Citrus paradisi*. *Journal of Arthropod-*

Borne Diseases, 10(4), 577–585.

- Sarrou, E., Chatzopoulou, P., Dimassi-Theriou, K., & Therios, I. (2013). Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of *Citrus aurantium* L. growing in Greece. *Molecules*, 18(9), 10639–10647. <https://doi.org/10.3390/molecules180910639>
- Silva-Weiss, A., Ihl, M., Sobral, P. J. A., Gómez-Guillén, M. C., & Bifani, V. (2013). Natural Additives in Bioactive Edible Films and Coatings: Functionality and Applications in Foods. *Food Engineering Reviews*, 5(4), 200–216. <https://doi.org/10.1007/s12393-013-9072-5>
- Swami, S. B., Thakor, N. J., Haldankar, P. M., & Kalse, S. B. (2012). Jackfruit and Its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(6), 565–576. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2012.00210.x>
- Teneva, D., Denkova-Kostova, R., Goranov, B., Hristova-Ivanova, Y., Slavchev, A., Denkova, Z., & Kostov, G. (2019). Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial activity of essential oil from *Citrus aurantium* L zest against some pathogenic microorganisms. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 74(5–6), 105–111. <https://doi.org/10.1515/znc-2018-0062>
- Ulloa, J. A., Villalobos Barbosa, M. C., Resendiz Vazquez, J. A., Rosas Ulloa, P., Ramírez Ramírez, J. C., Silva Carrillo, Y., & González Torres, L. (2017). Producción y caracterización fisico-química y funcional de un aislado proteínico de semillas de jaca (*Artocarpus heterophyllus*). *CYTA - Journal of Food*, 15(4), 497–507. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1301554>
- Vu, K. D., Hollingsworth, R. G., Leroux, E., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2011). Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. *Food Research International*, 44(1), 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.037>
- Waghmare, R., Memon, N., Gat, Y., Gandhi, S., Kumar, V., & Panghal, A. (2019). Jackfruit seed: An accompaniment to functional foods. *Brazilian Journal of Food Technology*, 22, 1–9. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.20718>
- Wang, Y., Guo, Z., Qian, Y., Zhang, Z., Lyu, L., Wang, Y., & Ye, F. (2019). Study on the electrospinning of gelatin/pullulan composite nanofibers. *Polymers*, 11(9), 1–10. <https://doi.org/10.3390/polym11091424>
- Xue, J., Wu, T., Dai, Y., Xia, Y., States, U., & States, U. (2019). *Nihms-103549* *5.Pdf*. 119(8), 5298–5415. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00593> Electrospinning
- Yun, J., Fan, X., Li, X., Jin, T. Z., Jia, X., & Mattheis, J. P. (2015). Natural surface coating to inactivate

Salmonella enterica serovar Typhimurium and maintain quality of cherry tomatoes. *International Journal of Food Microbiology*, 193, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.013>

Zavala-leal, I., & Ruiz-velazco, J. M. J. (2018). *Efecto del descascarillado de semillas de jaca (Artocarpus heterophyllus) sobre antinutrientes , parámetros hematológicos y desempeño productivo de tilapia (Oreochromis niloticus)*. June.

Zhang, H., Xi, S., Han, Y., Liu, L., Dong, B., Zhang, Z., Chen, Q., Min, W., Huang, Q., Li, Y., & Liu, J. (2018). Determining electrospun morphology from the properties of protein-polymer solutions. *Soft Matter*, 14(18), 3455–3462. <https://doi.org/10.1039/c7sm02203d>

