



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República (PROPAC)

Doctorado en Ciencia de los Alimentos

"Desarrollo y caracterización de fibras electroestiradas e hidrogeles empleando aislado proteico de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y chícharo (*Pisum sativum*) como base biopolimérica"

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctora en Ciencias de los Alimentos

Presenta:

M.C.I.Q Guadalupe Aguilar Vázquez

Dirigido por:

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

CU., Santiago de Querétaro, Qro., Julio de 2019.



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

Doctorado en Ciencia de los Alimentos

**"Desarrollo y caracterización de fibras electroestiradas e hidrogeles
empleando aislado proteico de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y chícharo
(*Pisum sativum*) como base biopolimérica"**

Que como parte de los requisitos para obtener el Título de
Doctora en Ciencia de los Alimentos

Presenta:
Guadalupe Aguilar Vázquez

Dirigido por:
Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz
Presidente

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Secretario

Dra. Amparo López Rubio
Vocal

LOPEZ RUBIO MARIA Firmado digitalmente por LOPEZ
RUBIO MARIA DESAMPARADOS -
DNI 24375702A Fecha: 2019.06.17 09:55:00 +02'00'

Dr. Juan de Dios Figueroa Cárdenas
Suplente

Dr. Luis Antonio Ortiz Frade
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Julio 2019
México

Resumen

Las proteínas de chícharo (*Pisum sativum*) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) presentan un alto contenido de proteínas, una alta disponibilidad y un precio relativamente bajo por lo cual se propone su aplicación como biopolímeros que pueden tener aplicaciones potenciales en el área de alimentos. Mediante la técnica de electroestirado se pueden obtener fibras poliméricas con diámetros de μm a nm que encapsulan eficientemente compuestos bioactivos. Por otra parte, los hidrogeles son estructuras tridimensionales capaces de retener compuestos activos y agua y estas a su vez, se ven favorecidas por la presencia de proteínas globulares. Este proyecto tuvo como objetivo estudiar la aplicación de los aislados proteicos de chícharo (*Pisum sativum*) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) como base biopolimérica en la obtención de fibras electroestiradas e hidrogeles. Primeramente, al no tener información en la literatura sobre el aislado proteico de frijol común de la variedad Bayo Madero, se realizó la caracterización conformacional y funcional. Para la aplicación de los aislados proteicos en la obtención de fibras electroestiradas fueron propuestas dos estrategias. En la primera, se planteó la hipótesis de que la adición de pululano y surfactante mejoran las características de soluciones proteicas (viscosidad, tensión superficial y conductividad) favoreciendo el proceso de electroestirado. Para probar esta hipótesis, se utilizaron tres mezclas de proteína de chícharo-pululano (20-80, 50-50 y 80-20) y tres concentraciones de tensoactivo no iónico Tween 80 (0, 10 y 20 % p/p). Las soluciones fueron caracterizadas y sometidas a diferentes condiciones del proceso de electroestirado, finalmente las fibras obtenidas se caracterizaron mediante SEM, FTIR y DRX. Se encontró que las interacciones entre los grupos funcionales de la proteína de chícharo (-OH, -CN, -COOH) y del pululano (-OH) favorecen el proceso de electroestirado y estas son aumentadas en la presencia de surfactante en una alta concentración (20% p/p). La segunda estrategia se basó en la hipótesis de que la conformación de las proteínas en solución impactan el proceso de electroestirado y a su vez las propiedades físicas de las fibras obtenidas, para lo cual, se estudió la conformación de los aislados proteicos de chícharo y frijol en agua, HFIP y TFE mediante dicroísmo circular. Fueron preparadas soluciones de cada aislado al 10 % p/v en cada solvente, posteriormente estas soluciones fueron electroestiradas. Se encontró que los aislados proteicos presentaron como conformación hojas β y giros β tipo I y II. Los resultados provenientes del electroestirado mostraron que en las condiciones estudiadas

se obtuvieron fibras defectuosas y cápsulas. El estudio de la aplicación del aislado proteico de frijol común en la obtención de hidrogeles mediante la técnica de gelificación en frío, se encontró que los factores que afectaron las propiedades mecánicas de los geles fueron la concentración y el pH; sin embargo, no fue posible obtener hidrogeles firmes aún con la adición de CaCl_2 . Los resultados de las propiedades mecánicas mostraron que el gel obtenido con una concentración del 14% y pH 2 tiene el potencial para ser utilizado en la obtención de productos para untar.

Palabras clave: Proteínas de leguminosas, Electroestirado, Hidrogel.

SUMMARY

The proteins of pea (*Pisum sativum*) and beans (*Phaseolus vulgaris* L.) have a high protein content, high availability and a relatively low price, which is why they are proposed as biopolymers that may have potential applications in the food area. By means of the technique of electrospinning can obtain polymeric fibers with diameters of μm to nm that encapsulate efficiently bioactive compounds. On the other hand, hydrogels are three-dimensional structures capable of retaining active compounds and water and pests in turn, are favored by the presence of globular proteins. The objective of this thesis was to study the application of the protein isolates of pea (*Pisum sativum*) and beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as a biopolymer base in the production of electrospun fibers and hydrogels. Firstly, as there was no information in the literature on the common bean protein isolate of the Bayo Madero variety, conformational and functional characterization was performed. Two strategies were proposed for the application of protein isolates in obtaining electrospun fibers. In the first, it was hypothesized that the addition of pullulan and surfactant improve the characteristics of protein solutions (viscosity, surface tension and conductivity) favoring the electrospinning process. To test this hypothesis, three mixtures of pea-pullulan protein (20:80, 50:50 and 80:20) and three concentrations of non-ionic surfactant Tween 80 (0, 10 and 20% w/w) were used. The solutions were characterized and subjected to different conditions of the electrospinning process, finally the fibers obtained were characterized by SEM, FTIR and DRX. It was found that the interactions between the functional groups of the pea protein (-OH, -CN, -COOH) and pullulan (-OH) favor the electrostatic process and these are increased in the presence of surfactant in a high concentration (20% p / p). The second strategy was based on the hypothesis that the conformation of the proteins in solution impacted the electrostatic process and at the same time the physical properties of the fibers obtained, for which, the conformation of the protein isolates of peas and beans in water, HFIP and TFE through circular dichroism. Solutions of each isolate were prepared at 10% w/v in each solvent, later these solutions were electrospun. It was found that the protein

isolates had β -sheets and β -turns type I and II as conformation. The results from the electrospinning showed that defective fibers and capsules were obtained under the conditions studied. The study of the application of the common bean protein isolate in obtaining hydrogels by the cold gelling technique, found that the factors that affected the mechanical properties of the gels were the concentration and pH; however, it was not possible to obtain firm hydrogels even with the addition of CaCl_2 . The results of the mechanical properties showed that the gel obtained with a concentration of 14% and pH 2 has the potential to be used in obtaining spreads.

Key words: Legumin protein, electrospinning, hydrogel.

Agradecimientos

A Dios pues sé que todo se lo debo a Él, agradezco por la vida que me está permitiendo vivir y por bendecirme en cada momento.

A mi esposo Erick, por ser mi compañero de vida, por demostrarme su amor cada día y por brindarme su apoyo incondicional durante estos años, por acompañarme hombro con hombro en cada desvelo y en cada momento, este logro lo comparto contigo.

A mis padres por su amor, por educarme de la forma que lo hicieron, por inculcarme los principios y valores que me han permitido llegar hasta aquí.

A la doctora Sandra Mendoza Díaz, por aceptarme en su grupo de trabajo y por darme todo su apoyo desde principio hasta el fin del doctorado, por ser mi guía y por enseñarme tanto.

A la Dra. Flavía por brindarnos en todo momento su apoyo a Erick y a mí.

A la Dra. Amparo y su equipo de trabajo del IATA por recibirme con los brazos abiertos en su laboratorio y por permitirme realizar el gran reto que fue la estancia de investigación.

Al Dr. Juan de Dios Figueroa y su equipo de trabajo del CINVESTAV-Querétaro, por recibirme en su laboratorio y brindarme su apoyo en la realización de mis experimentos.

Al Dr. Luis Antonio Ortiz Frade por recibirme en su laboratorio y a Marisela por siempre apoyarme.

A Arely, por brindarme siempre su amistad y sus consejos.

A mis compañeros del PROPAC, por los buenos momentos.

A Carmelita, que siempre me guió con paciencia en cada trámite desde el inicio, hasta la finalización de esta etapa.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca para realizar mis estudios de doctorado y por la beca de movilidad que me permitió realizar mi estancia de investigación.

.

ÍNDICE

Introducción	4
I. Marco teórico	5
1.1 Nanotecnología en alimentos	5
1.2 Nanoencapsulación	5
1.3 Nanofibras	6
1.3.1 Electroestirado.....	6
1.3.1.1 Condiciones del proceso de electroestirado	8
1.3.1.1.1 Voltaje.....	8
1.3.1.1.2 Velocidad de flujo.....	8
1.3.1.1.3 Distancia entre la aguja y el colector	8
1.3.1.2 Propiedades del polímero.....	9
1.3.1.2.1 Peso molecular	9
1.3.1.2.2 Efecto de la estructura del polímero sobre la solubilidad	9
1.3.1.2.3 Solubilidad del polímero	10
1.3.1.3 Propiedades de la solución.....	10
1.3.1.3.1 Concentración de polímero	11
1.3.1.3.2 Viscosidad	11
1.3.1.3.3 Tensión superficial	11
1.3.1.3.4 Volatilidad de la solución.....	12
1.3.1.3.5 Conductividad de la solución.....	12
1.3.1.4 Condiciones ambientales	13
1.3.1.4.1 Temperatura	13
1.3.1.4.2 Humedad	13
1.3.2 Caracterización de nanofibras	13
1.3.2.1 Morfología	13
1.3.2.2 Diámetro de fibra.....	14
1.3.2.3 Tamaño de poro y porosidad.....	15
1.3.2.4 Cristalinidad.....	15
1.3.2.5 Caracterización química	16
1.3.2.6 Caracterización mecánica	16
1.3.3 Nanofibras de grado alimenticio.....	16
1.3.4 Biopolímeros utilizados en electroestirado	17

1.3.5 Mecanismos de electroestirado de proteínas	18
1.3.5.1 Ruta A: electroestirado de proteínas mediante uso de un acarreador.....	19
1.3.5.1.1 Alcohol polivinílico (PVA)	19
1.3.5.1.2 Pululano.....	20
1.3.5.1.3 Tensoactivos.....	22
1.3.5.2 Ruta B	23
1.3.5.2.1 Solventes	23
1.3.5.2.1 Conformación proteica en el proceso de electroestirado y las propiedades mecánicas	24
2. Hidrogeles	37
2.1 Gelificación inducida por calor	37
2.2 Gelificación inducida por frío.....	38
2.3 Factores en la formación de hidrogeles proteicos	39
2.3.1 Tipo y concentración de iones	39
2.4 Entrecruzamiento.....	40
3. Proteínas vegetales.....	41
3.1 Zeína	42
3.2 Aislado proteico de soya (APS)	44
3.3 Aislado proteico de amaranto (APA)	46
3.4 Leguminosas	48
3.4.1 Frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	49
3.4.2 Chícharo (<i>Pisum sativum</i>)	51
II. Justificación	53
III. Hipótesis	53
IV. Objetivo general	54
V. Objetivos específicos	54
VI. Metodología	55
6.1 Obtención y caracterización fisicoquímica, conformacional y funcional de concentrado proteico de frijol (CPF)	55
6.1.1 Materiales	55
6.1.2 Métodos.....	55
6.1.2.1 Preparación del aislado proteico de Frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	55
6.1.2.2 Cuantificación de proteína	55

6.1.2.3 Electroforesis.....	56
6.1.2.4 Calorimetría diferencial de barrido (CDB)	57
6.1.2.5 Índice de polidispersión y potencial Z	57
6.1.2.6 Dicroísmo circular.....	57
6.1.2.7 Solubilidad de aislado proteico	58
6.1.2.8 Capacidad emulsificante	58
6.1.2.9 Capacidad espumante.....	59
6.1.2.10 Capacidad de retención de agua y aceite.....	59
6.2 Desarrollo y caracterización de nanofibras electroestiradas de proteína de chícharo utilizando pululano como acarreador	60
6.2.1 Materiales	60
6.2.2 Métodos.....	60
6.2.2.1 Contenido proteico y perfil electroforético de aislado proteico de chícharo (APCH)	60
6.2.2.2 Preparación de soluciones acuosas de aislado proteico de chícharo	60
6.2.2.3 Caracterización de soluciones acuosas APCH-PUL.....	61
6.2.2.4 Electroestirado	61
6.2.2.5 Morfología de las fibras elaboradas a partir APCH-PUL.....	62
6.2.2.6 Espectroscopía Infrarroja con Reflectancia Total Atenuada ...	62
6.2.2.7 Propiedades mecánicas	62
6.3 Búsqueda del solvente ideal para desarrollar fibras electroestiradas a partir de los aislados proteicos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) y chícharo (<i>Pisum sativum</i>).	63
6.3.1 Materiales	63
6.3.2 Métodos.....	63
6.3.2.1 Preparación de soluciones para electroestirado.....	63
6.3.2.2 Viscosidad	63
6.3.2.3 Dicroísmo circular	63
6.3.2.4 Electroestirado	64
6.3.2.5 Caracterización de las propiedades físicoquímicas de las fibras obtenidas	65
6.4.1 Materiales	66
6.4.2 Métodos.....	66
6.4.2.1 Obtención de geles de CPF	66
6.4.2.2 Medición de propiedades mecánicas	66

VII. Resultados y discusión.....	68
7.1 Obtención y caracterización fisicoquímica, conformacional y funcional de concentrado proteico de frijol (CPF).	68
7.1.1 Contenido proteico y perfil electroforético.	68
7.1.2 Propiedades térmicas	69
7.1.3 Dicroísmo circular	70
6.1.4 Índice de polidispersión	71
7.1.5 Distribución de diámetro hidrodinámico	72
7.1.6 Potencial Z.....	73
7.1.7 Solubilidad.....	74
6.1.8 Capacidad espumante	75
7.2 Desarrollo y caracterización de nanofibras electroestiradas de proteína de chícharo utilizando pululano como acarreador	80
7.2.1 Contenido proteico y distribución de tamaños.....	80
7.2.2 Estudio de la solubilidad de APCH	81
7.2.3 Electroestirado.....	81
7.2.4 Estudio de la adición de polímeros como acarreadores	82
7.2.6 Pululano.....	83
7.2.7 Mezclas APCH:PUL.....	84
7.2.8 Propiedades de la solución de electroestirado	84
7.2.9 Electroestirado de soluciones poliméricas APCH:PUL.....	87
7.2.10 Caracterización de fibras APCH:PUL.....	89
7.2.11 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (ATR-FTIR).....	89
7.2.12 Difracción de rayos X y calorimetría diferencial de barrido (CDB) ...	92
7.2.13 Propiedades mecánicas.....	95
7.3 Búsqueda del solvente ideal para desarrollar fibras electroestiradas a partir de los aislados proteicos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris L.</i>) y chícharo (<i>Pisum sativum</i>)	97
7.3.1 Solubilidad	97
7.3.2 Viscosidad de soluciones de aislados proteicos en diferentes solventes	100
7.3.3 Dicroísmo circular UV lejano	103
7.3.4 Dicroísmo circular UV cercano.....	104
7.3.5 Electroestirado.....	106
7.4 Obtención y caracterización de geles a partir de concentrado proteico de frijol.....	109

7.4.1 Obtención de geles	109
7.4.2 Medición de propiedades mecánicas	110
VIII. Conclusiones	112
VIII. Bibliografía.....	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de electroestirado.....	7
Figura 2. Mecanismos propuestos de electroestirado de proteínas.....	19
Figura 3. Estructura química de una porción de pululano.....	21
Figura 4. Perfiles electroforéticos de aislados proteicos en condiciones no reductoras y reductoras	68
Figura 5. Espectros de dicroísmo circular UV lejano a diferentes valores de pH .	71
Figura 6. Efecto del pH sobre el índice de polidispersidad (IPD).....	72
Figura 7. Efecto del pH sobre el potencial Z.....	74
Figura 8. Efecto del pH sobre la solubilidad de CPF	75
Figura 9. Efecto de la capacidad espumante y estabilidad la espuma de CPF.....	76
Figura 10. Capacidad emulsificante	78
Figura 11. Perfiles electroforéticos de aislados proteicos en condiciones no reductoras y reductoras de APCH.....	80
Figura 12 Soluciones de APCH	81
Figura 13. Micrografía óptica (63x) de electroestirado de APCH.....	82
Figura 14. Micrografía óptica (63x) de electroestirado de solución acuosa de PVA	83
Figura 15. Micrografías ópticas (63x) de electroestirado de tres soluciones acuosas de pululano	83
Figura 16. Propiedades de las mezclas APCH:PUL.....	86
Figura 17. Micrografías electrónicas de barrido y distribución de diámetro de fibras electroestiradas	90
Figura 18. Espectros de absorbancia ATR-FTIR para materias primas y fibras electroestiradas APCH-Pululano	93

Figura 19. Patrones de difracción de rayos X de fibras electroestiradas y curvas DSC.	94
Figura 20. Curvas de esfuerzo-deformación representativas de fibras electroestiradas APCH:PUL.	96
Figura 21. Soluciones proteicas de APCH CPF en los diferentes solventes empleados	97
Figura 22. Curvas de flujo de APCH y CPF	100
Figura 23. Dicroísmo circular de soluciones proteicas de APCH y CPF	103
Figura 24. Espectros de dicroísmo circular UV-cercano de los aislados proteicos en los diferentes solventes.....	105
Figura 25. Imágenes SEM de muestras electroestiradas.	108
Figura 26. Curva típica de untabilidad	110

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Conformación de las proteínas y su efecto sobre las propiedades mecánicas.....	36
Tabla 2. Propiedades de proteínas vegetales	42
Tabla 3. Algunas aplicaciones de nanofibras de zeína	44
Tabla 4. Algunas aplicaciones de nanofibras de APS	46
Tabla 5. Algunas aplicaciones de nanofibras de APA-Pululano	47
Tabla 6. Algunas aplicaciones del aislado proteico chícharo	52
Tabla 7. Diseño experimental para la evaluación de solubilidad para cada aislado proteico	61
Tabla 8. Diseño experimental para el proceso de electroestirado APCH.....	62
Tabla 9. Concentración de aislados proteicos y solventes empleados en las soluciones de electroestirado.....	64
Tabla 10. Diseño experimental para el proceso de electroestirado de cada aislado proteico	65
Tabla 11. Diseño de experimentos 2^3 para la obtención de geles	66
Tabla 12. Resultados de calorimetría diferencial de barrido	69

Tabla 13. Distribución de diámetro hidrodinámico	73
Tabla 14. Diseño de experimentos para el electroestirado de PVA y pululano	82
Tabla 15. Resultados del proceso de electroestirado	88
Tabla 16. Propiedades mecánicas de fibras electroestiradas	95
Tabla 17. Propiedades de solventes seleccionados para el electroestirado de APCH y CPF	98
Tabla 18. Valores de viscosidad aparente de las soluciones proteicas	101
Tabla 19. Valores de K: coeficiente de consistencia del material, n: índice de comportamiento de flujo y coeficiente de determinación.	102
Tabla 20. Resultados de electroestirado	107
Tabla 21. Resultados del diseño 2 ³ sobre la obtención de geles de CPF	109
Tabla 22. Resultados de propiedades mecánicas de geles	111

Introducción

Dentro del área de alimentos nutraceuticos y funcionales, la nanotecnología ha mostrado gran potencial en la encapsulación y liberación de componentes bioactivos mediante algunos sistemas acarreadores; por ejemplo las nanofibras basadas en materiales naturales biodegradables como polisacáridos y proteínas. Las nanofibras ofrecen pequeños tamaños de poro y grandes superficies con novedosas y significativamente mejoradas propiedades físicas, químicas y biológicas. Por lo tanto, las nanofibras han atraído una enorme cantidad de atención en los últimos años, sin embargo, continúa un creciente interés en el desarrollo de matrices encapsulantes basadas en materiales naturales biodegradables para lo cual las proteínas de origen vegetal, por su alta disponibilidad y bajo costo, se tornan altamente atractivas. Por otra parte, los hidrogeles basados en proteínas son especialmente aceptados en diferentes sectores debido a sus propiedades sobresalientes, tales como alto valor nutricional, naturaleza anfifílica, biocompatibilidad, biodegradabilidad y menor toxicidad en comparación con los polímeros sintéticos.

Las leguminosas han sido consideradas como adecuadas para la preparación de aislados proteicos por su alto contenido de proteínas, bajo costo y amplia aceptabilidad. Las principales proteínas que se encuentran en las leguminosas son globulinas y albúminas. La proteína vegetal más ampliamente estudiada por sus propiedades funcionales es la proteína de soya. Sin embargo, el uso de proteínas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y chícharo (*Pisum sativum*) es muy interesante debido a su alto valor nutritivo y sus propiedades funcionales.

I. Marco teórico

1.1 Nanotecnología en alimentos

La nanociencia y nanotecnología son nuevas fronteras de este siglo y son de gran importancia debido a su amplia aplicación en diversos campos, y presentan alto potencial para generar productos innovadores y procesos en la industria alimentaria (Anandharamakrishnan, 2014).

La nanotecnología ha asumido una importancia creciente en tecnología de los alimentos y se prevé que esta importancia crecerá con fuerza en los próximos años. La fuerza motriz de este desarrollo se debe a los enormes beneficios potenciales en áreas específicas de la ciencia y tecnología de los alimentos, tanto en el procesamiento y la seguridad alimentaria. Los mayores avances hasta ahora logrados se han situado en el monitoreo de la calidad de alimentos, desarrollo de envases de alimentos y la encapsulación y entrega de nutraceuticos (Silva, 2012).

1.2 Nanoencapsulación

La investigación de vanguardia se está llevando a cabo sobre la aplicación de la nanotecnología en ingredientes de alimentos para mejorar la salud y la importancia industrial. La nanoencapsulación es una de las más prometedoras tecnologías para atrapar compuestos bioactivos así como para protegerlos de la degradación (Anandharamakrishnan, 2014).

Actualmente existen diversos sistemas de nanoencapsulación de compuestos bioactivos y aditivos alimentarios entre los que se encuentran nanoemulsiones, nanopartículas y liposomas, sin embargo se han presentado algunas desventajas como la rápida liberación, baja estabilidad y corta vida útil (Blanco-Padilla *et al.*, 2014), sin embargo, las nanofibras han presentado un creciente interés debido a que éstas brindan un mejor desempeño que los sistemas antes mencionados.

1.3 Nanofibras

Las nanofibras poliméricas son fibras con diámetros en la escala de menos de un micrómetro y área superficial relativamente grande por unidad de masa (Šimko *et al.*, 2014), presentan algunas ventajas como la alta área superficial respecto a su masa, porosidad, posibilidad de producción a gran escala, capacidad de encapsular compuestos sensibles a altas temperaturas y liberación prolongada (Aceituno-Medina *et al.*, 2015b; Neo *et al.*, 2018).

La encapsulación para la liberación controlada o fijación de aditivos funcionales en nanofibras de materiales renovables e incluso comestibles de base biológica proporciona medios para estabilizar y preservar la calidad de los alimentos, para el diseño de alimentos funcionales más eficaces debido a las características especiales de las nanofibras (Fernandez *et al.*, 2009). Diversas técnicas se han explorado para producir nanofibras, sin embargo el electroestirado ha sido reconocido como una de las técnicas más eficientes (Wei and Wei, 2012; Leidy and Quintanilla Carvajal, 2019).

1.3.1 Electroestirado

El proceso de electroestirado es una técnica versátil para la preparación de fibras poliméricas con diámetros en el orden de micro y nanómetros. El proceso inicia cuando se aplica un potencial eléctrico entre una gota de una solución polimérica que se encuentra en el extremo de la punta de una jeringa y una placa colectora conectada a tierra. En la punta de la jeringa, la superficie hemisférica de la gota se distorsiona en una forma cónica conocida como cono de Taylor debido a dos fuerzas electrostáticas principales: la repulsión electrostática de cargas similares y la fuerza coulombica del campo eléctrico externo. Una vez que el campo eléctrico aplicado supera la tensión superficial de la gota, un hilo cargado de solución de polímero es expulsado, el cual tiene inestabilidades de flexión causadas por fuerzas repulsivas entre las cargas transportadas con el hilo, en consecuencia, se

produce un alargamiento del hilo y una rápida evaporación del solvente hasta que se recoge en la placa colectora como fibra (Bhardwaj and Kundu, 2010).

Básicamente, un aparato de electroestirado consta de los siguientes cuatro componentes principales (**Figura 1**):

- Fuente de alimentación de alto voltaje: sirve para proporcionar un campo electrostático para el electroestirado.
- Bomba de control de flujo: se utiliza para ajustar la velocidad de flujo del fluido a electroestirar con el objetivo de producir fibras con un diámetro adecuado ya que la velocidad de flujo afecta el diámetro de la fibra y la eficiencia.
- Jeringa: se utiliza para formar pequeños tubos de la solución de polímero
- Colector: para obtener diferentes fibras ensambladas, un colector puede ser diseñado en varias formas como, plato, tambor rotatorio, disco rotatorio, anillos o alguna otra forma.

El proceso de electroestirado se ve afectado por diferentes factores entre los cuáles se incluyen las variables del proceso, las propiedades de la solución polimérica y las condiciones ambientales. De las cuales se hablará a continuación.

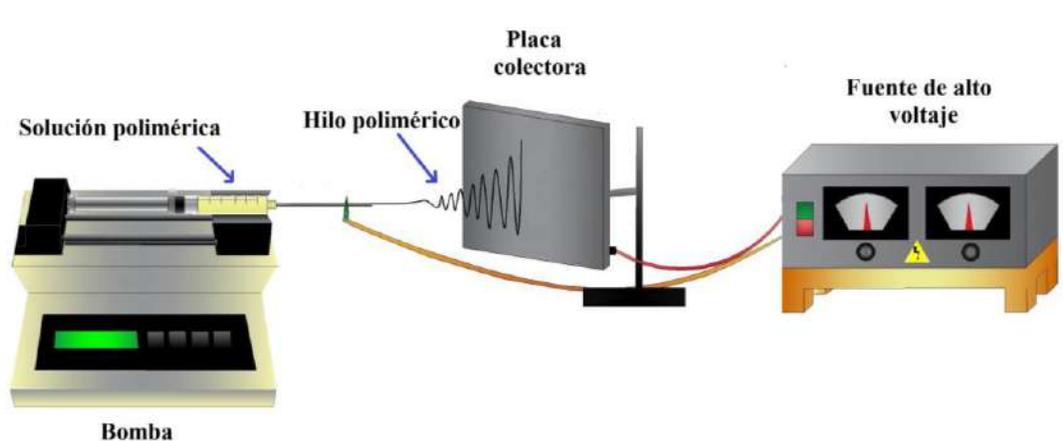


Figura 1. Proceso de electroestirado (Adaptado de Aguilar-Vázquez, Loarca-Piña, Figueroa-Cárdenas, & Mendoza, 2018)

1.3.1.1 Condiciones del proceso de electroestirado

1.3.1.1.1 Voltaje

El voltaje aplicado en el electroestirado tiene un deber importante en la caracterización de la fibra. El aumento o disminución del voltaje aplicado puede causar un cambio en la morfología y la estructura de las fibras, se ha reportado que el aumento de la corriente de electroestirado puede llevar a la formación de defectos en las fibras, lo cual puede reducir el área superficial. un aumento en la longitud de la fibra y una disminución en el diámetro de la misma (Mirjalili and Zohoori, 2016).

1.3.1.1.2 Velocidad de flujo

El flujo influye sobre la tasa de velocidad del hilo y la velocidad de transferencia de material. Una tasa de flujo inferior es más deseable debido al hecho de que ayuda a extender el tiempo de evaporación del disolvente. Mientras tanto, una velocidad de flujo que es demasiado alta da como resultado la formación de gotas debido al insuficiente tiempo de secado antes de llegar al colector (Cho, *et al.*, 2010)

1.3.1.1.3 Distancia entre la aguja y el colector

Los trabajos de investigación han demostrado que existe una distancia mínima necesaria entre la aguja y el colector para dar tiempo suficiente para la evaporación del disolvente antes de que las fibras alcancen el colector; si la distancia es demasiado corta o demasiado larga se pueden formar fibras con defectos. Se ha encontrado que fibras planas o fibras de menor diámetro pueden ser obtenidas a distancias más cercanas, mientras fibras más redondas pueden formarse con un aumento en la distancia. Otros parámetros de procesamiento, incluyendo diámetro interior de la boquilla, forma del colector y velocidad de movimiento, también tienen influencia en la formación de fibras (Bhardwaj y Kundu, 2010).

1.3.1.2 Propiedades del polímero

1.3.1.2.1 Peso molecular

El peso molecular del polímero refleja el número de entrelazamiento de cadenas de polímero en la solución, por lo tanto, la viscosidad de la solución. Se ha encontrado que una solución de bajo peso molecular tiende a formar fibras con defectos y una solución de alto peso molecular ayuda a formar fibras con diámetros más grandes. Por lo tanto, incluso cuando la concentración de polímero es baja, un número adecuado de entrelazamiento de las cadenas de polímero puede asegurar un nivel suficiente de viscosidad de la solución para fabricar una banda de fibra uniforme durante el electroestirado y restringir los efectos de la tensión superficial. En otras palabras, los altos pesos moleculares no siempre son esenciales para el proceso de electroestirado, interacciones intermoleculares son suficientes para la conectividad inter-cadena (Wei et al., 2012).

1.3.1.2.2 Efecto de la estructura del polímero sobre la solubilidad

La estructura del polímero tiene un impacto sobre la solubilidad en el solvente. Generalmente un polímero con alto peso molecular es menos soluble y toma un mayor tiempo para disolver en comparación con uno de menor peso molecular usando el mismo solvente (Ramakriishna et al., 2005). Lo anterior se debe a que las fuerzas intermoleculares entre las moléculas de cadena más larga son más fuertes y las moléculas del disolvente toman más tiempo para difundirse en la mayor parte de polímero. Polímeros reticulados no se disuelven, debido a que la unión covalente entre las moléculas es mucho más fuerte que las fuerzas secundarias ejercidas de las interacciones polímero-disolvente.

1.3.1.2.3 Solubilidad del polímero

Es importante utilizar un solvente apropiado que pueda disolver el polímero y al mismo tiempo ser electroestirable. La solubilidad del polímero en un disolvente particular también puede afectar a la morfología de la fibra resultante.

La solubilidad del polímero es más compleja que las de un compuesto de bajo peso molecular debido a la diferencia de tamaño entre el polímero y las moléculas de disolvente, la viscosidad del sistema, los efectos de la estructura y el peso molecular del polímero. Hay dos etapas, cuando un polímero se disuelve en el disolvente. En primer lugar, las moléculas de disolvente se difunden lentamente en la mayor parte de polímero para producir un gel hinchado. Si las fuerzas intermoleculares polímero-polímero son altas como consecuencia de la reticulación, cristalinidad o fuertes enlaces de hidrógeno, las interacciones polímero-disolvente pueden no ser lo suficientemente fuerte como para romper la unión de polímero-polímero. La segunda etapa de la solución solamente tendrá lugar cuando el enlace de polímero-polímero se rompe para dar una solución verdadera (Ramakriishna *et al.*, 2005).

1.3.1.3 Propiedades de la solución

Con el fin de llevar a cabo el electroestirado, el polímero debe ser primero en una forma líquida, ya sea como polímero fundido o como solución de polímero. Las propiedades de la solución juegan un papel importante en el proceso de electroestirado y la morfología de la fibra resultante. Dado que en el proceso de electroestirado la solución de polímero se extrae de la punta de la aguja, la propiedad eléctrica de la solución, la tensión superficial y la viscosidad determinará la cantidad de estiramiento de la solución.

1.3.1.3.1 Concentración de polímero

En el proceso de electroestirado, para que se produzca la formación de fibras, se requiere una concentración mínima de la solución polimérica. Se ha encontrado que, a baja concentración de la solución, se obtienen fibras con defectos, y conforme la solución aumenta, la forma esférica de los defectos en las fibras disminuye hasta que son finalmente uniformes y se tiene un aumento de los diámetros debido a la mayor resistencia a la viscosidad. La concentración de polímero en una solución determina si se puede electroestirar en nanofibras y tiene un efecto importante sobre la morfología de la fibra (Neo et al., 2018). Con el fin de obtener fibras, se requiere un mínimo de solución de alimentación, mientras que hay una concentración óptima para las fibras sin defectos (Bhardwaj and Kundu, 2010).

1.3.1.3.2 Viscosidad

Las propiedades reológicas, especialmente la viscosidad, influye en el proceso de formación de fibras. Las soluciones de alta viscosidad no pueden expulsar la solución, mientras que las soluciones de baja viscosidad no producen fibras (Bhardwaj and Kundu, 2010) . La viscosidad se relaciona con el entrelazamiento físico de las cadenas poliméricas dentro de la disolución. Cuando la viscosidad de la disolución es muy baja (<0.8 Pa.s), el fenómeno de electroatomizado puede ocurrir y se forman partículas en lugar de fibras. Durante el estiramiento de la disolución, es el entrelazamiento de las cadenas moleculares lo que impide que el flujo sea discontinuo (Aceituno Medina, 2011).

1.3.1.3.3 Tensión superficial

En electroestirado las cargas en la solución del polímero deben ser suficientemente altas para superar la tensión superficial de la solución. A medida que el hilo de solución acelera desde la punta de la fuente al colector, la solución se estira mientras que la tensión superficial de la solución puede causar el

rompimiento en gotas. Cuando esto sucede un proceso diferente llamado electrospray está ocurriendo en lugar de electroestirado. A la tensión superficial también se le ha atribuido la formación de defectos en las fibras electroestiradas. Por lo tanto es importante para entender el papel de la tensión superficial en un fluido (Wu and Wei, 2012). La tensión superficial de mezclas de disolventes no es una simple función de la tensión superficial de los componentes puros. La tensión superficial de la mezcla de solución no acuosa puede ser aproximada por una dependencia lineal de la fracción promedio mol de la tensión superficial de los componentes puros.

1.3.1.3.4 Volatilidad de la solución

Durante el proceso de electroestirado, el disolvente se evapora conforme la solución polimérica se acelera hacia el colector formando fibras individuales. Sin embargo, si la velocidad de evaporación del disolvente es demasiado baja, tal que la solución no se ha evaporado suficientemente cuando alcanza el colector, las fibras no se pueden formar en absoluto y una película delgada de solución de polímero se deposita sobre el colector (Ramakrishna *et al.*, 2005).

1.3.1.3.5 Conductividad de la solución

Para iniciar el proceso de electroestirado, la solución debe ganar cargas suficientes de manera que las fuerzas de repulsión dentro de la solución sean capaces de superar la tensión superficial de la solución. El posterior estiramiento o alargamiento del hilo también depende de la capacidad de la solución para transportar cargas. Generalmente, la conductividad eléctrica de los disolventes es muy baja (típicamente entre 10^{-3} a 10^{-9} $\text{ohm}^{-1}\text{m}^{-1}$), ya que contienen muy pocos iones libres, si los hay, que son responsables de la conductividad eléctrica de la solución. La presencia de ácidos, bases, sales y dióxido de carbono disuelto puede aumentar la conductividad del disolvente. Sustancias que pueden añadirse

al disolvente para aumentar su conductividad incluyen sales minerales, ácidos minerales, ácidos carboxílicos, algunos complejos de ácidos con aminas, cloruro de estaño y algunas sales de tetra alquilamonio. Para solventes de ácidos orgánicos, la adición de una pequeña cantidad de agua también aumentará en gran medida su conductividad debido a la ionización de las moléculas del solvente (Ramakriishna *et al.*, 2005).

1.3.1.4 Condiciones ambientales

1.3.1.4.1 Temperatura

Parámetros ambientales, especialmente la humedad y la temperatura influyen en la morfología de la fibra y la productividad del proceso de electroestirado. El aumento de temperatura de la solución provoca una disminución de viscosidad, lo que favorece la formación de fibras finas durante el electroestirado (Wei *et al.*, 2012).

1.3.1.4.2 Humedad

Se ha sugerido que un solvente volátil puede secar rápidamente conforme la humedad disminuye. Sin embargo, cuando el disolvente se evapora demasiado rápido, puede resultar en la falta de tiempo para que el hilo eyectado alcance el colector, y el capilar puede ser fácilmente obstruido. Se cree que un alto grado de humedad puede ayudar a la descarga de las fibras electroestiradas (Wei *et al.*, 2012).

1.3.2 Caracterización de nanofibras

1.3.2.1 Morfología

El estudio de la morfología de las fibras comprende la medición del diámetro promedio de la fibra, geometría de los poros en la superficie, forma de la sección transversal y la rugosidad de la superficie, también suele considerarse la propiedad hidrófoba dentro de los estudios de morfología (Ramakriishna *et al.*,

2005). La microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) son técnicas útiles para la caracterización de la morfología de la fibra (Bhardwaj and Kundu, 2010). En SEM, la muestra de nanofibras es recubierta con una capa fina de un material conductor tal como oro pulverizado sobre su superficie, se coloca en un haz de electrones de alta energía (0.1-50 keV) al bajo vacío. El haz generado por un disparo de electrones está colimado por lentes electromagnéticas en un punto controlado (1-5 nm) que es manipulado por un conjunto de bobinas de deflexión y escanea la superficie de la muestra de nanofibras. Un disparo de electrones es esencialmente una fuente de cátodo - su composición define el brillo, así como el vacío necesario para la operación (Andrady, 2008).

Con TEM, una parte del haz enfocado de electrones primarios de alta energía (típicamente 20 kV) se transmite a través de la muestra, y éstos se recogen y se procesarán para formar la imagen. La interacción entre los electrones y las nanofibras resulta en dispersión inelástica y elástica de los electrones transmitidos. Las imágenes TEM se construyen a partir de los electrones dispersados elásticamente y generalmente muestran características o defectos estructurales en una alta resolución y también se pueden utilizar en el modo de difracción (incluso simultáneamente) para obtener información acerca de la estructura cristalina. El componente inelásticamente dispersado se utiliza en la microscopía analítica como en la espectroscopia de rayos X y espectroscopia de pérdida de energía de electrones (Andrady, 2008).

1.3.2.2 Diámetro de fibra

Nanofibras poliméricas con diámetros entre 200 nm y 1000 nm se observan en una ampliación alrededor de x15000 con un valor entre 10 a 20 kV de tensión de aceleración en microscopia electrónica de barrido. Las imágenes obtenidas se examinan mediante un analizador de imágenes donde se miden de 50 a 100 diámetros de las fibras y la distribución promedio de diámetro es reportada.

1.3.2.3 Tamaño de poro y porosidad

Los poros desempeñan un papel importante en la determinación de las propiedades físicas y químicas de las nanofibras. Para diseñar nanofibras electroestiradas es necesario analizar el tamaño de poro, su distribución y la porosidad. En nanofibras electroestiradas dos tipos de poros se pueden identificar: a) poros sobre y dentro de cada fibra y b) poros entre las fibras en una membrana de nanofibras. El tamaño de poro se puede medir por métodos directos o indirectos. Los métodos directos implican el uso de técnicas tales como la microscopía electrónica (SEM y TEM) o la microscopía de fuerza atómica (AFM).

1.3.2.4 Cristalinidad

En el trabajo de nanofibras, los métodos de difracción de rayos X son útiles en el estudio de la naturaleza cristalina de las fibras, cambio en la morfología cristalina durante el electroestirado, así como orientación de la cadena en las fibras en forma hilada u orientadas. Muestras de fibras electroestiradas colectadas sobre un portaobjetos de vidrio se pueden estudiar directamente por difracción de rayos X sin más preparación de la muestra (Andrady, 2008). En los estudios de difracción de rayos X, un haz de rayos X se dirige a la muestra y se observa el patrón de difracción resultante. Debido a su alta energía, los rayos X son difíciles de enfocar, y generalmente son empleados colimadores de hendidura para este propósito. El haz de rayos X monocromático es dispersado de los diversos planos de la red de la muestra en ángulos específicos. La interferencia constructiva de los rayos X dispersados por un enrejado ordenado (tal como en un cristal) resulta en patrones de difracción agudos bien formados. El patrón de difracción producido es esencialmente una huella digital de la periodicidad a nivel atómico en la muestra de polímero. Es una técnica no destructiva particularmente útil que produce información sobre cristalinidad parcial (tamaños y la orientación de cristales), la composición orientación de la cadena y la fase de los materiales estudiados.

La técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC) permite el análisis de la capacidad calorífica de desnaturalización térmica y proporciona información sobre el proceso de desarrollo y de las fuerzas que intervienen en la estabilidad conformacional, que revela la información termodinámica sobre los diferentes estados (Chiu et al., 2013), además se ha utilizado para caracterizar los procesos de fusión y cristalización así como temperaturas de fusión, cristalización y de transición vítrea de nanofibras.

1.3.2.5 Caracterización química

La caracterización de la estructura molecular de nanofibras puede ser realizada mediante las técnicas de Espectroscopia Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR), debido a que si dos polímeros son mezclados en la fabricación de nanofibras, es posible detectar tanto la estructura de estos dos materiales como las interacciones intermoleculares (Aceituno-Medina et al., 2013a).

1.3.2.6 Caracterización mecánica

La medición precisa de las propiedades mecánicas de las nanofibras es crucial, sobre todo cuando se desean emplear en empaques. La técnica más común es la medición de tensión usando la misma técnica experimental general que se utiliza con películas y textiles (Andrady, 2008). Las nanofibras aleatoriamente orientadas se cortan en forma rectangular y son evaluadas usando un equipo universal de ensayos para obtener las propiedades de tensión (Khansari *et al.*, 2013).

1.3.3 Nanofibras de grado alimenticio

En la industria alimentaria el uso de nanofibras es relativamente limitado, debido a las dificultades asociadas con la producción de fibras de grado totalmente alimenticio; una situación que está, sin embargo, cambiando rápidamente debido al realce del enfoque "electroestirado verde" defendido por (Agarwal et al., 2013)

donde se está dando el creciente uso de polisacáridos y proteínas como materiales para nanofibras electroestiradas.

Rezaei, Nasirpour, & Fathi, (2015) mencionan que existe un creciente interés en el uso de fibras electroestiradas en la industria alimentaria en encapsulación de ingredientes alimentarios, enzimas y otros compuestos activos además de su empleo en los materiales de envasado de alimentos, garantizando la seguridad y la calidad del producto alimenticio (Fernandez et al., 2009; Wongsasulak et al., 2014).

Los biopolímeros naturales como proteínas e hidratos de carbono se utilizan comúnmente para la encapsulación debido a las propiedades de liberación controlada y sostenida que se pueden lograr para suministrar el compuesto incorporado en el lugar correcto y en el momento adecuado (Fathi et al., 2014).

Para evitar el uso de disolventes tóxicos para la generación de productos relacionados con la alimentación, la mayoría de los polímeros usados para electroestirado se disuelven en agua o etanol (Kayaci and Uyar, 2012) debido a que la encapsulación de compuestos activos en forma de fibras se realiza generalmente mediante la mezcla de los compuestos activos en la solución de polímero y electroestirado.

1.3.4 Biopolímeros utilizados en electroestirado

Los biopolímeros son definidos como variedad de macromoléculas, producidas por sistemas biológicos, como animales, plantas o microorganismos. Los biopolímeros pueden ser sintetizados químicamente, pero como requisito sus unidades poliméricas deben ser derivadas de sistemas biológicos, como: aminoácidos, azúcares, lípidos, entre otros. Entre los polímeros naturales comúnmente empleados en electroestirado se encuentran los polisacáridos y las proteínas. Entre los polisacáridos han sido utilizados algunos homopolímeros o copolímeros

de monosacáridos que son de origen animal (quitosano y ácido hialurónico), algal (alginato), vegetal (almidón y celulosa) y microbiano (dextrano) (Neo et al., 2018). La gran variedad en su estructura química, el peso molecular y la carga es un factor clave para las diversas propiedades funcionales que los polisacáridos muestran. La mayoría de los polisacáridos tienen baja toxicidad y son biocompatibles, biodegradables, renovables y de bajo costo (Weiss, Jochen; Kanjanapongkul, Kobsak; Wongsaulak, Saowakon; Yoovidhya, 2012).

Los biopolímeros presentan algunas dificultades para electroestirar a causa de sus diferentes pesos moleculares (es decir, su peso molecular es generalmente 'distribuido') y/o tienen diferentes estructuras químicas (es decir, sus grupos funcionales pueden ser no homogéneamente distribuidos a lo largo de la cadena principal de polisacárido) (Weiss et al., 2012).

1.3.5 Mecanismos de electroestirado de proteínas

Las proteínas son difíciles de electroestirar, principalmente debido a sus estructuras secundaria y terciaria complejas. Para ser electroestiradas, las proteínas deben ser bien disueltas en una conformación de espiral al azar. Las proteínas globulares tienen muy poca interacción interna para entrelazarse durante el proceso de hilado (Nieuwland *et al.*, 2014), sin embargo, las proteínas se prefieren sobre los polímeros sintéticos debido a que forman el ingrediente principal del cuerpo humano, y con frecuencia son en sí mismos, valiosos suplementos dietéticos y funcionales potenciadores de alimentos (Nieuwland *et al.*, 2014).

En la literatura se han mencionado varias razones por las cuales se dificulta el electroestirado de proteínas, como las interacciones hidrofóbicas, (Dong et al., 2009) interacciones iónicas, problemas de solubilidad debido a los enlaces de hidrógeno, (Meli et al., 2010) la presencia de una estructura de red compleja (Cho *et al.*, 2010) y una densidad de carga baja (Vega-Lugo and Lim, 2009).

1.3.5.1 Ruta A: Electroestirado de proteínas mediante uso de un acarreador.

Un enfoque para superar estos déficits es utilizar una mezcla entre polímeros naturales y polímeros sintéticos. Se ha sugerido que las cadenas de polímeros sintéticos que son más propensos a entrelazarse forman una red intercalada que contiene los polímeros 'no electroestirables', como un relleno proporcionando de ese modo un sistema mixto que puede ser electroestirado con éxito (Ruta A) (Agarwal *et al.*, 2013, Nieuwland *et al.*, 2014). Algunos biopolímeros que han sido utilizados para favorecer el electroestirado está el pululano (Aceituno-Medina *et al.*, 2013b), mientras que, entre los polímeros sintéticos están el óxido de polietileno (PEO) (Sullivan *et al.*, 2014) y alcohol polivinílico (PVA) (Cho *et al.*, 2010).



Figura 2. Mecanismos propuestos de electroestirado de proteínas (Adaptado de Nieuwland *et al.*, 2013).

1.3.5.1.1 Alcohol polivinílico (PVA)

Es un polímero sintético usado desde inicios de 1930, es ampliamente usado en la industria médica, comercial y aplicaciones en alimentos (Demerlis and Schoneker, 2003). Sus características físicas son dependientes del método de preparación bajo hidrólisis ácida o alcalina del acetato polivinílico y sus usos funcionales específicos dependen del grado de polimerización y el grado de hidrólisis. El alcohol polivinílico se clasifica en dos clases, parcialmente hidrolizado y completamente hidrolizados, sin embargo, el parcialmente hidrolizado es el que se

utiliza en los alimentos, se utiliza como una película de barrera de humedad para tabletas de suplementos alimenticios y para los alimentos que contienen inclusiones o alimento seco con inclusiones que necesitan ser protegidos de la absorción de humedad (FAO, 2004).

En la Unión Europea está autorizado como aditivo alimentario en los complementos alimenticios de conformidad con el anexo II del Reglamento (EC) n° 1333/2008 y está registrado con el número E1203. Por otra parte, se ha reportado que el PVA es sólo mínimamente absorbido después de la administración oral y posee un bajo orden de toxicidad oral aguda. La seguridad del PVA se documenta por un número de estudios de toxicidad en la dieta, incluyendo un estudio de 90 días por vía oral y un estudio de toxicidad reproductiva de 2 generación en rata e *in vitro*, así como en ensayos de genotoxicidad *in vivo*. No hubo evidencia de toxicidad en cualquiera de los estudios de 90 días o segunda generación en los niveles ensayados de dosis más alta de 5000 mg/kg de peso corporal/día, no es ni mutagénico ni genotóxico y tampoco hay evidencia que indique que el PVA tiene actividad carcinogénica (EFSA, 2005). El aislado proteico de soya (APS) fue electroestirado utilizando PVA como acarreador, donde se obtuvieron fibras trabajando con proporciones APS:PVA 25:75 y 50:50 (Cho et al., 2010).

1.3.5.1.2 Pululano

El pululano es un polisacárido microbiano extracelular y soluble en agua producido por *Aureobasidium pullulans* en cultivos de almidón y azúcar. El polímero lineal se compone principalmente de unidades de maltotriosa interconectados entre sí por enlaces glicosídicos $\alpha(1,4)$ y $\alpha(1,6)$ en proporción 2 a 1 respectivamente (Figura 3). Este patrón de vinculación única dota al pululano con propiedades físicas distintivas para formar una película que es fuerte, transparente y soluble en agua y con baja permeabilidad al aceite y al oxígeno (Singh et al., 2008).

El pululano en polvo es de color blanco y no higroscópico que se disuelve fácilmente en agua caliente o fría. Es no tóxico, no mutagénico, inodoro, insípido y comestibles con un número promedio de peso molecular (M_n) de aproximadamente entre 100 a 200 kDa y un peso promedio de peso molecular de aproximadamente 362 hasta 480 kDa. Las soluciones acuosas de pululano son viscosas, pero no forman geles, la viscosidad de soluciones acuosas de pululano es proporcional al peso molecular del pululano. También es estable en un amplio intervalo de condiciones de pH cuando está en solución. No libera cualquier gas perjudicial incluso cuando se quema y se descompone de forma espontánea por microorganismos. El pululano tiene excelentes propiedades adhesivas, también tiene buena barrera al oxígeno propiedades y se ha aplicado en el envasado de alimentos (Singh *et al.*, 2008).

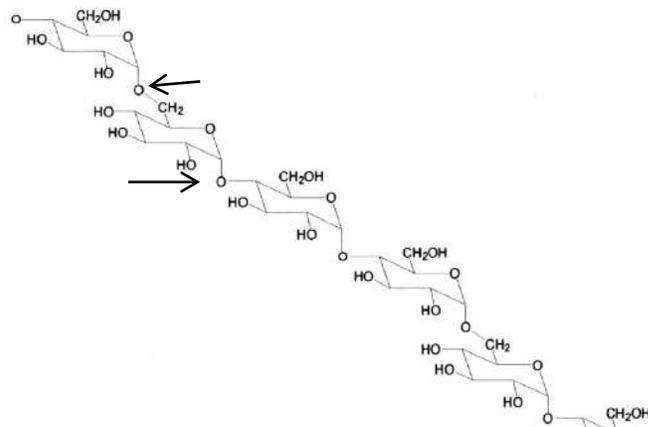


Figura 3. Estructura química de una porción de pululano

El pululano ha sido empleado como acarreador en el electroestirado del aislado proteico de amaranto (APA) (Aceituno-Medina *et al.*, 2013b), donde se obtuvieron fibras trabajando proporciones de APA-Pululano desde 50-50 hasta 80-20, sin embargo en ésta última se observaron más defectos en comparación con las otras proporciones estudiadas. A partir de espectroscopía infrarrojo se observó el incremento en la intensidad de las bandas en el intervalo de $3340\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ lo cual se atribuyó a las interacciones entre los grupos --OH del pululano y los grupos

–NH del APA. Se ha reportado que la adición de pululano y las proteínas interactúan mejorando las propiedades mecánicas y en la permeabilidad al vapor de agua.

1.3.5.1.3 Tensoactivos

La tensión superficial de la solución en electroestirado es un parámetro importante en el proceso. El uso de tensoactivos en soluciones proteicas está relacionado con el efecto sobre la unión de estos monómeros al esqueleto de la cadena proteica en la disminución de su carácter polielectrolítico y la tensión superficial (Kriegel *et al.*, 2009). Los tensoactivos son moléculas orgánicas, constituidas por una parte hidrófoba y otra hidrofílica, la parte hidrófoba es una cadena hidrocarbonada alifática, y la parte hidrofílica va en función al tipo de tensoactivo, si la cadena lleva un grupo aniónico (sulfato o sulfonato) es un tensoactivo aniónico; un grupo catiónico, como un amonio cuaternario, es un tensoactivo catiónico; y si lleva un grupo sin carga iónica, como una amida o una cadena oxietilenada, son tensoactivos no iónicos.

Randolph & Jones, (2002) menciona que la porción hidrófoba de los tensoactivos no iónicos se puede unir a áreas hidrofóbicas de las proteínas, lo que naturalmente hace que el tensoactivo se ordene para que los grupos hidrófilos estén más expuestos al disolvente. En consecuencia, el complejo tensoactivo-proteína se convierte más hidrófilo que el agente tensoactivo o la proteína por sí sola, y se tiene un aumento en la solubilidad del complejo evitando formación de agregados de orden superior, lo cual se debe a que estabilizan la proteína debido a que la mayoría de las proteínas no se asocian con tensoactivos no iónicos (Ruiz-Peña, *et al.*, 2010).

Diversos autores sugieren el uso de tensoactivos no iónicos en electroestirado de proteínas como Tween 80 (Aceituno-Medina *et al.*, 2013b) y Tritón X-100 (Cho *et*

al., 2010; Lubasova et al., 2015) donde la presencia de éstos permite la formación de un hilo continuo disminuyendo la formación de defectos en las fibras.

1.3.5.2 Ruta B: Electroestirado de proteínas mediante el uso de solvente ideal

Existen diversos estudios sobre electroestirado de soluciones de proteínas y se ha llegado a la conclusión de que este proceso es más desafiante que el de polímeros sintéticos (Regev, Khalfin, Zussman, Y Cohen, 2010). Nieuwland *et al.*, (2013) menciona que para las proteínas que contienen una estructura secundaria y terciaria (como las proteínas globulares), no existe suficiente interacción entre las proteínas para asegurar el entrelazamiento necesario, mientras que el despliegue de proteínas a menudo resulta en demasiadas interacciones intramoleculares, que conduce a la agregación de proteínas, así mismo, la calidad de disolvente en ese caso no es suficiente para permitir el electroestirado. (Figura 2, Ruta B). La parte superior de la ruta B representa la ruta ideal para el electroestirado de las proteínas, una ruta que ocurre en un solvente ideal donde ésta se disuelve de forma desnaturalizada y se puede electroestirar. En la mayoría de los casos, para evitar el uso de disolventes tóxicos para la generación de productos relacionados con la alimentación, se prefiere el uso de agua o etanol como solvente (Kayaci and Uyar, 2012), sin embargo, se tiene formación de agregados de proteínas desnaturalizadas y el electroestirado no es posible (parte inferior de la ruta B) (Nieuwland *et al.*, 2013).

Por lo anterior, la selección del solvente es algo fundamental en el proceso de electroestirado. Un solvente “ideal” se considera aquél que interrumpe las interacciones intra e inter moleculares.

1.3.5.2.1 Solventes

La elección del solvente juega un papel vital en el proceso de electroestirado, ya que las propiedades de la solución afectan fuertemente a la formación de fibras

(Nuansing, 2014). Las interacciones solvente-polímero influyen de forma crítica no sólo en la viscoelasticidad y en la concentración mínima crítica de la solución requerida para el electroestirado, sino también en el diámetro, la cristalinidad, la resistencia a la tensión, la relación de aspecto y la morfología de las fibras (Luo et al., 2012), por lo tanto, es importante una buena comprensión de los solventes disponibles para un polímero y/o biopolímero de interés.

1.3.5.2.1 Conformación proteica en el proceso de electroestirado y las propiedades mecánicas

En un reducido número de trabajos se ha estudiado el efecto de la conformación de las proteínas sobre el proceso de electroestirado. En el trabajo reportado por Minato, Ohkawa, & Yamamoto, (2006) se trabajó con una solución de poli (γ -bencil-L-glutamato) (PBLG) en ácido trifluoroacético (TFA) y diclorometano (DCM), y se reportó que la presencia de TFA cambió la conformación de hélice α a espiral al azar, lo cual fue atribuido al rompimiento de los enlaces de hidrógeno intramoleculares, y esto afectó benéficamente al proceso de electroestirado pues fueron obtenidas fibras más uniformes y con diámetros menores. También se reportó que el proceso de electroestirado produjo un cambio en la conformación proteica, pues reportaron que en la fibra electroestirada se obtuvo una conformación hélice α y que cuando la solución presentó una conformación hélice α , en la fibra no hubo un cambio de conformación y hubo un incremento en la cristalinidad.

Otros estudios en proteínas como albúmina de suero bovino (BSA), y prolaminas demostraron que las conformaciones de las proteínas influenciaron significativamente las propiedades de la solución de electroestirado, por consiguiente la morfología de las fibras obtenidas y finalmente sus propiedades mecánicas (Wang & Chen, 2012; Regev, *et al*, 2010).

Dror et al., (2008) electroestiraron BSA al desplegar la conformación de proteínas nativas, alterando su carga electrostática, la reducción de los enlaces disulfuro intra-cadena, y la promoción de la formación de nuevos de enlaces cruzados inter-cadena, utilizando una combinación de soluciones acuosas con 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) y un agente reductor, beta-mercaptoetanol (β -Me).

En el caso de proteínas de origen vegetal, Wang & Chen, (2012) trabajaron con zeína y con prolaminas de cebada: hordeína y gliadina, el solvente empleado fue ácido acético. Se reportó que las moléculas de hordeína en polvo presentó una conformación mayoritaria de Giros β , y tal conformación se desplegó formando una conformación extendida y flexible en las fibras, de modo que se combinaron más fácilmente formando enlaces intermoleculares de hidrógeno, sin embargo, las fibras presentaron menores propiedades mecánicas (Tabla 1). En el caso de gliadina y zeína, preservaron la conformación de hélices α después del electroestirado y sus propiedades mecánicas fueron mayores que las de hordeína.

El electroestirado de proteínas sin la presencia de un acarreador es un proceso muy complejo y poco entendido, es por esto en este apartado nos enfocaremos en investigar el efecto del solvente sobre la conformación de las proteínas y a su vez el efecto sobre el proceso de electroestirado de aislados proteicos de dos leguminosas: frijol y chícharo.

Tabla 1. Conformación de las proteínas y su efecto sobre las propiedades mecánicas

Proteína	Concentración (%) p/v	Solvente	Conformación en solución	Conformación en fibras electroestiradas	Resultado	Módulo de Young (Mpa)	Esfuerzo hasta la ruptura (MPa)	Deformación hasta la ruptura (%) (ϵ)
PBLG		DCM:TFE	-Espiral al azar Hélices α	-Hélices α -Hélices α	Fibras	-----	-----	-----
Hordeína	15	Ácido acético	Giros β	Hélices α	Fibras	-----	0.65	-----
Gliadina	20		Hélices α	Hélices α	Fibras	-----	3.54	-----
Zeína	30		Hélices α	Hélices α	Fibras	-----	1.2	-----
BSA	10	TFE:Agua (10:90)+ β -Me	Espiral al azar		Fibras	~1950	49	~105

2. Hidrogeles

Los hidrogeles son estructuras tridimensionales de redes macromoleculares reticuladas que pueden absorber y retener una cantidad significativa de agua sin disolverse en ella (Ali and Ahmed, 2018). Son insolubles debido a la presencia de enlaces cruzados entre los constituyentes que forman la red polimérica. A menudo están hechos de homopolímeros o copolímeros, pero también pueden consistir en moléculas pequeñas que se autoensamblan en estructuras de alto peso molecular.

Entre los diferentes hidrogeles, los geles proteicos son de particular interés. Se llaman hidrogeles "inteligentes" debido a su sensibilidad a las condiciones ambientales. Los estímulos como la temperatura, el pH, la luz y la composición del disolvente pueden inducir diferentes respuestas de estos sistemas (Maltais et al., 2009).

En la industria alimentaria, el uso de geles proteicos de alto valor nutricional constituye una estrategia interesante para el transporte de compuestos nutraceuticos.

Las proteínas globulares pueden producir geles mediante calor y frío. El calentamiento de soluciones acuosas de proteína desencadena el despliegue molecular y la ruptura de proteínas, lo que conduce a la exposición de parches hidrófobos, así como a la formación de enlaces disulfuro, finalmente, los geles termoestables se formarán mediante la agregación de las fracciones proteicas desplegadas junto con la participación de arquitecturas intermoleculares de hoja β (Maltais et al., 2009).

2.1 Gelificación inducida por calor

Se sabe que los geles proteicos inducidos por calor se forman en un proceso de dos pasos. En primer lugar, el despliegue de proteínas conduce a reordenamientos dimensionales de su estructura y a la exposición de sitios de

proteínas activas. Esto permite el establecimiento de puentes disulfuro, enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas y/o de van der Waals, lo que da como resultado la agregación de la molécula de proteína. El proceso de agregación continúa con la asociación de partículas de proteína, y si la concentración de proteína es suficientemente alta, se forma una red de gel (Abaee et al., 2017).

2.2 Gelificación inducida por frío

Mediante la técnica de gelificación en frío las proteínas globulares producen geles con una arquitectura uniforme, alta resistencia y capacidad de conservar sus características a temperatura ambiente. La gelificación en frío de proteínas globulares se produce en dos etapas, que inicia calentando la solución de proteína a pH neutro (por encima del punto isoeléctrico) por debajo del grado gelificante de la proteína y a baja fuerza iónica dirigiendo la reacción a desnaturalización y despliegue imperfecto de proteínas. Posteriormente se disminuye el pH para alcanzar el punto isoeléctrico de la proteína (gelificación inducida por ácido en frío) o la suplementación con sales (gelificación fría inducida por sal) de modo que la repulsión entre proteínas disminuye (cationes mono, di y polivalentes) y/o genera enlaces cruzados (solo di y polivalentes) entre los grupos de proteínas (Kuhn et al., 2010).

La técnica utilizada para la gelificación en frío presenta ventajas debido a que no implica el uso de ningún solvente orgánico incompatible con aplicaciones alimentarias. En segundo lugar, dado que las moléculas bioactivas se añaden a la suspensión de proteína enfriada justo antes de la adición de sal, no se someten a tratamiento térmico, lo cual es muy deseable cuando se usan compuestos sensibles al calor y, en tercer lugar, el gel proteico puede estabilizar la textura del alimento (Maltais et al., 2009).

Otra ventaja importante es la exposición de diferentes grupos funcionales dentro de las moléculas de proteína como resultado de la desnaturalización que puede

crear diversas interacciones entre el compuesto activo y las cadenas polipeptídicas, tales como las interacciones de enlaces de hidrógeno, electrostáticas e hidrofóbicas. Estos enlaces recién formados entre compuestos bioactivos y proteínas pueden explotarse para diseñar sistemas de entrega dirigidos (Chen et al., 2006).

2.3 Factores en la formación de hidrogeles proteicos

La gelificación y los atributos texturales de los hidrogeles basados en proteínas globulares alimentarias pueden regularse a través de diferentes factores, tales como tipo de ión, temperatura, pH, fuerza iónica y grado de adición de iones y agentes químicos utilizados para la gelificación (Nicolai et al., 2011).

2.3.1 Tipo y concentración de iones

La estructura del gel depende de la cantidad de iones agregados a las soluciones de proteína desnaturizada por calor. Los hidrogeles con filamentos de cadena fina (que consisten en filamentos flexibles entrecruzados) se forman como resultado de niveles bajos de sal junto con la robusta repulsión electrostática. Por otro lado, los geles particulados (consistentes en esferas estocásticas asociadas de tamaño micrométrico) se producen siempre que el nivel consumido de iones es alto (Nicolai y Durand, 2013) como se reportó para la soya (Maltais, Remondetto y Subirade, 2009) y proteínas de suero de leche (Kuhn *et al.*, 2010).

Además de la concentración, la clase de iones utilizados también es importante para el proceso de gelificación; los cationes mono, di o polivalentes pueden generar hidrogeles mediante efectos de detección de carga; los cationes di o polivalentes también pueden establecer fenómenos de puenteo o entrecruzamiento de iones a partir de geles (Nicolai et al., 2011).

Kuhn et al. (2010) observó que los hidrogeles de WPI generados por CaCl_2 Además eran más firmes, más elásticos y opacos en comparación con los preparados mediante la adición de NaCl. Sin embargo, estos hidrogeles (inducidos con CaCl_2) demostraron una menor capacidad de retención de agua debido a su

matriz más compacta. Normalmente, los cationes divalentes forman puentes entre las cadenas de proteínas y atrapan el agua dentro de los poros formados, mientras que las sales monovalentes atraen las moléculas de agua a través de la generación de capas de hidratación (Kuhn et al., 2010).

2.4 Entrecruzamiento

Debido a la presencia de grupos amino y carboxilo, las cadenas de polipéptidos son vulnerables al entrecruzamiento covalente a través de diferentes rutas, como la introducción de transglutaminasa (Eissa, Puhl, Kadla y Khan, 2006), genipina (Guo et al., 2017), glutaraldehído (Suesca, Dias, Braga, de Sousa y Fontanilla, 2017) y ácidos policarboxílicos (Xu, Shen, Xu y Yang, 2015a, Abaee, Madadlou y Saboury, 2017).

Los entrecruzantes químicos típicos utilizados para las proteínas incluyen glutaraldehído, gliceraldehído, formaldehído, genipina, glioxal, dialdehído almidón y carbonildiimidazol. Sin embargo, la mayoría de los agentes de entrecruzamiento actuales no son seguros y rentables (Xu and Dumont, 2015). Entre estos agentes de entrecruzamiento, el glutaraldehído y el formaldehído se han usado ampliamente como dos entrecruzantes más potentes para unir proteínas cruzadas. Sin embargo, los grupos aldehído de estos agentes son tóxicos.

Por otra parte, los entrecruzantes como genipina y carbodiimidias presentan algunas desventajas tales como una baja eficacia de entrecruzamiento y ser costosos. Como una alternativa adecuada, el ácido cítrico generalmente reconocido como seguro (GRAS), actualmente está siendo aplicado para el entrecruzamiento de proteínas y carbohidratos. El mecanismo de entrecruzamiento consiste en utilizar un álcali como catalizador y emplear bajas temperaturas, de esta forma los grupos carboxilo en el ácido cítrico reaccionan con los grupos amino de la proteína a través de un intercambio nucleofílico que da como resultado la formación de agentes amida (Xu and Dumont, 2015).

3. Proteínas vegetales

Las proteínas vegetales son ampliamente utilizadas como ingredientes principales para alimentos, productos farmacéuticos, nutracéuticos, revestimiento de papel y como adhesivos (Ebnesajjad, 2013). Las proteínas vegetales son macromoléculas complejas que contienen una serie de monómeros de aminoácidos químicamente enlazados, que en conjunto forman cadenas de polipéptidos, que constituyen la estructura primaria. Los patrones de hélice y hoja de las cadenas de polipéptidos se denominan estructuras secundarias. Un número de cadenas laterales están conectadas a monómeros de aminoácidos. Estas cadenas laterales y grupos unidos interactúan entre sí, principalmente a través de enlaces de hidrógeno y disulfuro, para formar estructuras terciarias o cuaternarias.

Algunas proteínas vegetales han sido utilizadas en la obtención de fibras electroestiradas, sin embargo, ha sido reportado que son notoriamente difíciles de electroestirar (Cho et al., 2010; Nieuwland et al., 2014), principalmente a causa de sus estructuras secundaria y terciaria complejas. Para ser electroestiradas, las proteínas deben ser bien disueltas en una conformación de espiral al azar, lo cual es posible al emplear disolventes que puedan interrumpir interacciones intra e inter proteína y solubilizan la proteína resultante no estructurada (Nieuwland *et al.*, 2014). En el caso del uso de proteínas vegetales se ha reportado que la presencia de proteínas globulares favorece la obtención de hidrogeles (Maltais et al., 2009).

En la Tabla 2 se muestran algunas propiedades de algunas proteínas vegetales y sus aplicaciones, puede observarse que sus propiedades mecánicas son bajas, por lo cual se ha sugerido, la mezcla con polímeros sintéticos o con polisacáridos para mejorar las propiedades mecánicas (Lubasova *et al.*, 2015, Aceituno-Medina *et al.*, 2013, Weiss *et al.*, 2012).

Tabla 2. Propiedades de proteínas vegetales

Propiedad	Zeína	APS	APA
Peso molecular (kDa)	19-26	26-120	10-83
Punto isoeléctrico	6	45-4.8	5
Disponibilidad potencial (Millones de toneladas)	6.5	9.1	---
Solubilidad			
Agua	No	No	No
Etanol	Sí	No	No
Solventes orgánicos	Sí	No	Sí
Solventes iónicos	-	No	-
Biomateriales			
Películas	Sí	Sí	Sí
Fibras	Sí	Sí	Sí
Hidrogeles	Sí	Sí	-
Micropartículas	Sí	Sí	-
Nanopartículas	Sí	No	-

APS= Aislado proteico de soya; **APA=** Aislado proteico de amaranto. (Aceituno-Medina *et al.*, 2013; Martínez & Añón 1996; Condés *et al.*, 2013; Reddy & Yang 2011).

A continuación, se detalla más información sobre el uso de estas proteínas vegetales en la obtención de fibras e hidrogeles.

3.1 Zeína

La zeína es una prolamina de almacenamiento del maíz que comprende cerca del 45-50 % de esta proteína, es hidrofóbica por lo que presenta propiedades de barrera en el transporte de gases, vapor de agua o solutos y tiene alto potencial de aplicación en alimentos pues presenta una serie de usos como cobertura, fibras, películas comestibles, material encapsulante y recientemente en la obtención de hidrogeles. Algunas aplicaciones sobresalientes de la zeína se presentan en la Tabla 3.

Altan *et al.*, (2018) desarrollaron fibras electroestiradas a partir de zeína y ácido poliláctico (PLA) incorporadas con carvacrol en tres concentraciones diferentes (5, 10 y 20%), encontraron que la morfología y el tamaño de las fibras obtenidas tanto

de zeína como de PLA se vieron afectadas por el nivel de carvacrol incorporado. Las fibras mostraron un comportamiento de liberación controlada por difusión sostenida. Los estudios preliminares sobre muestras de pan de trigo integral demostraron que las fibras cargadas con carvacrol conservaron las muestras de pan, lo que indicó que son buenos candidatos para aplicaciones de envasado activo de alimentos.

Moomand y Lim (2014), obtuvieron fibras de zeína cargadas con aceite de pescado, éstas presentaron diámetros cercanos a los 300 nm y tuvieron una eficiencia de encapsulación de 91%, sus resultados mostraron que la encapsulación mejora la estabilidad del aceite contra la degradación química, a diferentes humedades relativas y temperatura, así como reducción de mal sabor.

También Wongsasulak *et al.*, 2014 encapsularon α -tocoferol en nanofibras de zeína-PEO-quitosano y demostraron que pueden ser utilizadas como un vehículo de liberación mucoadhesiva en el tracto intestinal. Así mismo, Neo *et al.*, 2013, cargaron nanofibras de zeína con ácido gálico para aplicarlo como material de empaque activo, fue evaluada su capacidad antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans*, encontrando que éstas nanofibras exhibieron eficacia antimicrobiana contra *S. aureus* y *E. coli* a través de una reducción de la población de seis unidades logarítmicas comparadas con las fibras de zeína sin ácido gálico. Para *C. albicans* se tuvo una acción moderada con una reducción de una a dos unidades logarítmicas.

En el área de alimentos, la zeína ha sido poco utilizada en la obtención de hidrogeles, en otras áreas, ha sido utilizada en mezcla con ácido acrílico en la obtención de hidrogeles capaces de quelar iones cobre (208 mg / g de hidrogel a pH 4.5), estos resultados fueron atribuidos a la presencia de un gran número de grupos funcionales del ácido poliacrílico y de la zeína hidrolizada (Ni *et al.*, 2018).

Tabla 3. Algunas aplicaciones de nanofibras de zeína

Biopolímero	Aplicación	Descripción	Referencia
Zeína-PLA	Fibras	Encapsulación de carvacrol, estudiaron la liberación en pan integral, encontraron que se aumentó el tiempo de conservación,	(Altan et al., 2018)
Zeína-ácido acrílico	Hidrogel	Los hidrogeles presentaron buena capacidad de quelación de iones de cobre (máximo de 208 mg / g a pH 4.5)	(Ni et al., 2018)
Zeína	Fibras	Encapsulación de aceite de pescado: mayor estabilidad contra la degradación química, mayor estabilidad a las condiciones ambientales tales como la humedad relativa y la temperatura y reducción de mal sabor.	(Moomand and Lim, 2014)
Zeína-PEO-Quitano	Fibras	Encapsulación de α -tocoferol en nanofibras mucoadhesivas: se incrementó la mucoadhesividad ayudando de ese modo en una mejora de bioaccesibilidad y la biodisponibilidad de los nutrientes.	(Wongsasulak et al., 2014)
Zeína	Fibras	Encapsulación de ácido gálico para el uso en un empaque activo.	(Neo et al., 2013a)

3.2 Aislado proteico de soya (APS)

Es generalmente conocido que los ingredientes de proteína de soya tienen propiedades funcionales apropiadas para aplicaciones alimentarias y tiene alta aceptación por el consumidor. Algunas propiedades fisicoquímicas importantes para desarrollar preparaciones de proteína de soya en los sistemas alimentarios son la solubilidad, absorción de agua, viscosidad, gelificación, cohesión-adherencia, elasticidad, emulsificación, adsorción de grasa, etc. Aproximadamente

el 90% de las proteínas de la soya pertenecen a proteínas de almacenamiento, las cuales consisten de β -conglucina y glicina (Fukushima, 2011). Para la técnica de electroestirado es utilizado el APS, que es la forma purificada de proteína de soya con un contenido proteico de 90% en base seca y es obtenido a partir de harina desgrasada a la cual se le ha removido la mayoría de componentes que no son proteínas (grasa y carbohidratos) consiguiendo un sabor neutro (Liu & Tian, 2012). Las aplicaciones del APS electroestirado en el área de alimentos se presentan en la Tabla 4 y puede observarse que el APS se mezcló con otros biopolímeros. Nanofibras a base de APS con una pequeña cantidad de óxido de polietileno (PEO) fueron enriquecidas con extracto de frambuesa roja, estas estructuras presentaron actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus epidermidis*, sugiriendo su uso en envases activos (Wang *et al.*, 2013). Vega-Lugo & Lim (2009) incorporaron isotiocianato de alilo (ITCA), un antimicrobiano encontrado naturalmente en plantas de la familia *Cruciferae*, en nanofibras de APS-PEO-ácido poliláctico (PLA) y ciclodextrinas, los resultados obtenidos mostraron que las ciclodextrinas protegieron al ITCA de las pérdidas por evaporación durante el electroestirado incrementando la eficiencia de encapsulación en las nanofibras.

Lubasova *et al.*, (2015), obtuvieron nanofibras resistentes al agua a partir de una mezcla de APS-Gluten-Polivinil alcohol (PVA) y utilizaron azúcares oxidados como entrecruzadores para soya, donde los grupos aldehído en los azúcares oxidados pueden reaccionar con los grupos amino nucleófilos en proteínas mediante la reacción de Maillard formando los enlaces responsables de la baja solubilidad. Las microfibras con una concentración de 5% de azúcares oxidados (peso/peso) no se disolvieron en agua después de tres horas a 60 °C, no obstante, éstas comenzaron a desintegrarse después de 6 horas a 80 °C.

Tabla 4. Algunas aplicaciones de nanofibras de APS

Biopolímero	Aplicación	Descripción	Referencia
APS-Alginato	Hidrogel en perlas	Encapsulación de probióticos (<i>Lactobacillus plantarum</i>) durante el procesamiento térmico para incorporar en jugo de mango.	(Praepanitchai et al., 2019)
APS-Gluten-PVA	Fibras	Obtuvieron nanofibras resistentes al agua que pueden ser utilizada en empaques	(Lubasova et al., 2015)
APS-PEO	Fibras	Encapsulación de extracto de frambuesa roja para uso en empaques, formación de fibras con defectos	(Wang et al., 2013)
APS-PEO-Ciclodextrinas	Fibras	Encapsulación de isotiocianato de alilo para el uso en empaques activos	(Vega-Lugo y Lim, 2009)

Las nanofibras obtenidas a base de APS se utilizan con menor frecuencia en alimentos en comparación con la zeína; sin embargo, tienen una alta aplicación en el área médica para la regeneración de tejidos (Reddy y Yang, 2011).

En cuanto a la aplicación de APS en la obtención de hidrogeles, Praepanitchai et al., (2019) produjeron perlas basadas en APS en mezcla con alginato para mejorar la supervivencia de probióticos encapsulados (*Lactobacillus plantarum*) durante el procesamiento térmico para incorporar en jugo de mango, encontraron que las bacterias probióticas encapsuladas se encontraron vivas incluso después del tratamiento a 72 °C durante 90 s. y que la supervivencia de las células probióticas se encontró mayor con las perlas de hidrogel híbridas que contenían alginato y aislado de proteína de soya (1:8 w/w).

3.3 Aislado proteico de amaranto (APA)

El amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) es un pseudocereal y el cultivo es de rápido crecimiento, además tiene un bajo costo de producción. El grano de amaranto tiene más proteína que el maíz y otros granos de cereal (Rastogi and Shukla, 2013), la semilla tiene alto contenido de proteína (17%) (Martínez and Añón, 1996), y su composición de aminoácidos está cerca de la proporción

requerida para la dieta humana (Rastogi and Shukla, 2013). Aceituno-Medina *et al.*, (2013) empleó por primera vez el APA con 85.5 % de una mezcla de proteínas con pesos moleculares entre 10 y 83 kDa para la obtención de nanoestructuras mediante electroestirado. Aceituno-Medina *et al.*,(2013), obtuvieron fibras ultrafinas mediante la mezcla de APA-pululano (80:20) y actualmente se han utilizado para la encapsulación de compuestos bioactivos (**Tabla 5**). Aceituno-Medina *et al.*, (2015), encapsularon ácido fólico y obtuvieron una eficiencia de encapsulación de 95.6 % logrando incrementar la estabilidad del ácido fólico cuando es expuesto a luz ultravioleta.

Tabla 5. Algunas aplicaciones de nanofibras de APA-Pululano

Biopolímero	Solvente	Diámetro (nm)	Descripción	Referencia
APA-Pululano	Ácido fórmico	305-378	Encapsulación de ácido fólico: mayor estabilidad a la degradación	(Aceituno-Medina, <i>et al.</i> , 2015)
		260-362	Encapsulación de quercetina y ácido ferúlico	(Aceituno-Medina, <i>et al.</i> , 2015)
		224-248	Encapsulación de curcumina	(Blanco-Padilla <i>et al.</i> , 2015)
		120 nm	Encapsulación de nisina	(Soto <i>et al.</i> , 2019)

Igualmente Aceituno-Medina *et al.*, (2015), encapsularon exitosamente quercetina y ácido ferúlico y evaluaron la digestión *in vitro* de éstas nanofibras funcionales, sus resultados mostraron que se tuvo una liberación sostenida de quercetina y ácido ferúlico, además de que la encapsulación de los activos en las nanofibras mejoró la capacidad antioxidante de los compuestos bioactivos en comparación con los compuestos bioactivos libres. Blanco-Padilla *et al.*, (2015) ocuparon esta mezcla de biopolímeros (APA:Pululano,50:50) para la elaboración de nanofibras cargadas con curcumina, la actividad antioxidante de la curcumina contenida en las fibras ultrafinas se mantuvo después de la digestión *in vitro* y fue superior en comparación con el compuesto bioactivo no encapsulado. Recientemente fue

encapsulada nisina, se evaluó la cinética de liberación a pH 3.4 y 6.1 y la eficacia antimicrobiana de las fibras se evaluó en jugo de manzana y queso fresco (Soto et al., 2019), se encontró que las fibras cargadas con nisina permitieron la actividad bactericida completa contra *Salmonella Typhimurium*, *L. monocitogenes* y *L. mesenteroides* inoculados en jugo de manzana después de 48, 20 y 48 h, respectivamente. Cuando las fibras cargadas con nisina se aplicaron en queso fresco, la inactivación de microorganismos se completó después de 142, 120 y 170 h, respectivamente. Los resultados demostraron que las fibras electroestiradas de nisina APA:PUL reducen significativamente la población bacteriana y pueden ser utilizados en productos alimenticios para la seguridad microbiológica.

En cuanto a la aplicación del APA aún no se ha reportado su uso en la obtención de hidrogeles.

3.4 Leguminosas

Las leguminosas son una importante fuente de nutrientes tales como proteínas, carbohidratos, así como minerales y vitaminas (Boye et al., 2010). Las proteínas vegetales son consideradas como una alternativa adecuada para sustituir proteínas animales tales como la gelatina que se utiliza ampliamente en los alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos (Aberkane et al., 2014).

Las principales proteínas que se encuentran en las leguminosas son globulinas y albúminas. Las globulinas representan aproximadamente el 70% de las proteínas de semillas de leguminosas y consisten principalmente de proteínas 7S, 11S y 15S. Los pesos moleculares de estas proteínas oscilan entre 8 a 600 kDa (Freitas, Ferreira, y Teixeira, 2000). Estas proteínas tienen generalmente una solubilidad mínima a valores de pH entre cuatro y cinco (punto isoeléctrico). Por la manipulación de la solubilidad de las proteínas y el uso de técnicas de filtración es como se obtienen concentrados de proteínas y aislados con diferentes niveles de pureza y funcionalidad. Propiedades funcionales de proteínas de los alimentos que son de importancia en la elaboración de alimentos incluyen, solubilidad, retención

de agua y la capacidad de unión de grasa, formación de espuma y propiedades emulsionantes, espesantes y formación de gel. Estas propiedades influyen en la textura de los alimentos y las características organolépticas y son esenciales en la fabricación de productos tales como productos de confitería, bebidas y productos cárnicos (Boye et al., 2010).

Las leguminosas pueden ser consideradas adecuadas para la preparación de aislados proteicos por su alto contenido de proteínas, bajo costo y amplia aceptabilidad de formulados (Shevkani et al., 2014).

La proteína vegetal más ampliamente estudiada por sus propiedades funcionales es la proteína de soya. Sin embargo, el uso de proteínas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y chícharo (*Pisum sativum*) es muy interesante debido a su alto valor nutritivo y sus propiedades funcionales.

3.4.1 Frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa más importante para el consumo humano y tiene un papel importante en la agricultura sustentable, debido a su capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico (Schmutz et al., 2014). En siete países se concentró el 63 % de la producción mundial de frijol en 2014: India (16.4 %), Myanmar (14.9 %), Brasil (13.1 %), Estados Unidos (5.3 por ciento), México (5.1 por ciento), China (4.1 por ciento) y Tanzania (4.1 por ciento) (FIRA, 2016). En México es un producto de gran importancia en la dieta y en la economía, debido a que participa con el 2% del valor de la producción agrícola y concentra entre 1.7 y 1.8 millones de hectáreas, el 7.4% de la superficie sembrada en México, siendo los principales productores Zacatecas (35.9 %), Durango (11.6 %), Chihuahua (9.5 %), Sinaloa (8.9 %) Y Chiapas con el 5.5% (SAGARPA, 2017). Entre 2015 y 2016 la producción creció un 14 % obteniéndose una producción de un millón 76 mil toneladas y un consumo per cápita de 8.4 kg al año, mientras que

el valor de la producción se estimó en 9.5 mil millones de pesos (SAGARPA, 2017).

Uno de los defectos que afectan la calidad del frijol es la presencia de granos quebrados, los cuales son granos que sus cotiledones se encuentran separados o bien que aun estando unidos presenten un tamaño inferior a las $\frac{3}{4}$ partes del grano entero (NMX-FF-038-SCFI-2002, 2002). El frijol de acuerdo con su calidad se clasifica en extra, primera y segunda. En la calidad extra sólo el 1 % es permitido, mientras que en las calidades primera y segunda el 3 y 4%, respectivamente (NMX-FF-038-SCFI-2002, 2002). Se ha reportado que del 5 al 10 % de la producción se desecha (Esqueda Coronado, 2009; Hernández Casas, 2012). El uso de frijol quebrado permitiría generar un valor agregado a la cosecha de frijol y utilizar un insumo que por lo general se desperdicia.

El concentrado proteico de frijol (CPF) es utilizado en la formulación de alimentos, sin embargo, existe una muy reducida aplicación como biopolímero, donde puede tener un impacto importante en la generación de materiales de pared en la encapsulación de compuestos bioactivos y materiales biodegradables. Existen pocos estudios realizados sobre el uso del CPF uno de ellos fue reportado por Liu *et al.*, (2014) donde utilizó muestras de tres aislados proteicos de frijol: frijol rojo (*Phaseolus angularis*), común (*Phaseolus vulgaris*) y mungo (*Phaseolus aureus*) como material de pared en la microencapsulación de aceite de soya mediante secado por aspersión, sin embargo, aún no se han reportado estudios sobre su uso en biopelículas o nanofibras.

La faseolina es una prominente vicilina con hoja β de estructuras secundarias y hélices al azar. Esta proteína presenta peculiaridad estructural y compacidad, como se evidencia por la ausencia de cualquier cambio en λ_{max} en presencia de perturbantes estructurales y también por la alta temperatura de desnaturalización (> 88 °C) y ΔH (> 6.5 J/g) en medios con perturbantes de proteínas. Diferentes interacciones, principalmente las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas y enlaces de hidrógeno, están involucrados en el mantenimiento de la conformación

nativa de faseolina. Los enlaces disulfuro e interacciones SS-SH no hacen una contribución significativa a la estabilidad de la proteína (Yin et al., 2010).

Por lo anterior, se puede apreciar que existe un campo inexplorado sobre el uso de los aislados proteicos de chícharo y frijol como biopolímeros y más aún su aplicación en nanofibras.

3.4.2 Chícharo (*Pisum sativum*)

El chícharo (*Pisum sativum*) es un cultivo de clima templado y húmedo. Tiene su óptimo de crecimiento entre los 16 y los 20°C. En México la producción anual es de 64,187.57 toneladas con un valor de producción de 430, 523.09 miles de pesos (SIAP-SAGARPA, 2014). El chícharo tiene un contenido de proteína de 45.8–63.4%, con un alto contenido de lisina, que complementa la deficiencia de los cereales (Adebiyi-Aluko, 2011).

Kowalczyk *et al.*, (2014) menciona que teniendo en cuenta el alto contenido de proteína, precio relativamente bajo, falta de alteraciones genéticas, así como el hecho de que la proteína de chícharo no es un alérgeno común, puede ser utilizada como un biopolímero con potenciales aplicaciones en el área de alimentos (Tabla 6). Los dos componentes principales de proteínas de guisante son 11S legumina y 7S vicilina (Rubio *et al.*, 2014). Tienen una estructura cuaternaria regular, hexamérica para proteínas legumina y trimérica para las proteínas vicilina. La legumina 11S consiste en un ácido y un polipéptido básico (de aproximadamente 40 y 21 kDa, respectivamente), que están unidos entre sí por un puente disulfuro. El peso molecular total de una unidad de legumina es de aproximadamente 380 kDa, es una proteína globular muy compacta en la que se encuentran en el exterior los polipéptidos ácidos y polipéptidos básicos constituyen el núcleo hidrófobo de la proteína (Gueguen *et al.*, 1988). La vicilina 7S es una glicoproteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 150 kDa. La estructura cuaternaria de las globulinas de guisante depende de la concentración,

pH y sal. Por ejemplo, legumina de guisante está presente como un hexámero a pH 7 y de alta fuerza iónica (0.1 M), pero se disocian (por ejemplo, a pH 3.35 y 10), y de acuerdo con la fuerza iónica, en la mezcla de trímeros, dímeros y monómeros. Las condiciones ácidas parecen ser más drásticas que las alcalinas y la legumina nativa está completamente disociada a un pH de 2.4 que conduce a la formación de un monómero con buenas propiedades interfaciales (Gueguen y Barbot, 1988).

El aislado proteico de chícharo se ha utilizado como material de pared en la microencapsulación de ácido linoleico conjugado (Costa *et al.*, 2015), ácido ascórbico (Pierucci *et al.*, 2006) y α -tocoferol (Pierucci *et al.*, 2007) (**Tabla 6**). Lo anterior contribuye a confirmar la versatilidad de la aplicación de la proteína de guisante como fuente biopolimérica.

Tabla 6. Algunas aplicaciones del aislado proteico chícharo

Aislado proteico	Descripción	Referencia
Chícharo	Encapsulación de ácido linoleico conjugado	(Costa <i>et al.</i> , 2015)
Chícharo	Elaboración de biopelículas	(Kowalczyk <i>et al.</i> , 2014)
Chícharo	Encapsulación de α -tocoferol	(Pierucci <i>et al.</i> , 2007)
Chícharo	Encapsulación de ácido ascórbico	(Pierucci <i>et al.</i> , 2006)

II. Justificación

Los aislados proteicos de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) y chícharo (*Pisum sativum*) representan una buena alternativa como fuentes biopoliméricas, debido a la alta disponibilidad y bajo costo, sin embargo, el electroestirado de proteínas representa un reto debido a la complejidad que presentan sus conformaciones estructurales en solución. Por lo anterior se planteó la necesidad de conocer el efecto de la conformación de los aislados proteicos en la formación de fibras y en sus características. Por otra parte, debido a que los aislados proteicos de leguminosas presentan un alto contenido de proteínas globulares y esto favorece la formación de hidrogeles se planteó la idea utilizar por primera vez el aislado proteico de frijol para este fin. Se espera que el conocimiento generado en este trabajo permita el incremento de las aplicaciones de los dos aislados proteicos en el área de alimentos.

III. Hipótesis

Pueden ser utilizados los aislados proteicos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y chícharo (*Pisum sativum*) como biopolímeros en la obtención de fibras electroestiradas e hidrogeles.

IV. Objetivo general

Desarrollar y caracterizar fibras electroestiradas e hidrogeles a base de proteína de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y chícharo (*Pisum sativum*)

V. Objetivos específicos

1. Caracterizar los aislados proteicos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y chícharo (*Pisum sativum*).
2. Estudiar la formulación de soluciones biopoliméricas de los aislados proteicos y de las variables del proceso de electroestirado en la obtención de fibras.
3. Estudiar la conformación proteica y su efecto en la formación de fibras y las características de las mismas.
4. Caracterizar las propiedades físico-químicas de las fibras obtenidas.
5. Evaluar el uso del aislado proteico de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en la obtención de hidrogeles.

VI. Metodología

6.1 Obtención y caracterización fisicoquímica, conformacional y funcional de concentrado proteico de frijol (CPF)

6.1.1 Materiales

Se utilizó como materia prima frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Bayo Madero donado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Ácido clorhídrico (HCl), hidróxido de sodio (NaOH), Kit BCA para cuantificación de proteína.

6.1.2 Métodos

6.1.2.1 Preparación del aislado proteico de Frijol común (*Phaseolus vulgaris*)

Se empleó el método propuesto por (Mojica & de Mejía, 2015) que consiste en moler el frijol en una relación 1:10 (frijol/agua), posteriormente el pH se ajustó a 8.0 con NaOH 0.1 M y la extracción de proteínas se llevó a cabo a 35 °C con agitación durante 1 h. La mezcla fue centrifugada a 5000 g durante 15 min a 4 °C. El precipitado se volverá a extraer en condiciones idénticas con el fin de maximizar el rendimiento y ambos extractos serán combinados. Después de esto, el pH se ajustó a 4.3 con HCl para precipitar las proteínas, seguido por centrifugación a 10000 g durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante se desechó y el sedimento se liofilizó. Finalmente, el aislado proteico de frijol se almacenó a -20 °C hasta su posterior análisis.

6.1.2.2 Cuantificación de proteína

El contenido total de proteína se determinó utilizando el kit BCA Protein Assay Thermo Scientific el cual combina la conocida reducción de Cu^{2+} a Cu^{1+} por la proteína en un medio alcalino con la detección colorimétrica altamente sensible y selectiva del catión cuproso (Cu^{1+}) por el ácido bicinconínico. El primer paso es la quelación de cobre con la proteína en un medio alcalino para formar un complejo de color azul claro. En esta reacción, conocida como la reacción de biuret,

péptidos que contienen tres o más residuos de aminoácidos forman un complejo quelato coloreado con iones cúpricos en un ambiente alcalino que contiene tartrato de sodio y potasio.

En la segunda etapa de la reacción de desarrollo de color, el ácido bicinconínico (BCA) reacciona con el catión reducido (cuproso) que se formó en el paso uno. Los productos de reacción son de un intenso color púrpura y resultan de la quelación de dos moléculas de BCA con un ion cuproso. El complejo de cobre BCA es soluble en agua y presenta una fuerte absorbancia a 562 nm, es lineal con el aumento de las concentraciones de proteína. El reactivo BCA es aproximadamente 100 veces más sensible (límite inferior de detección) que el color azul pálido de la primera reacción. La reacción que conduce a la formación de color BCA está fuertemente influenciada por cuatro restos de aminoácidos (cisteína o cistina, tirosina y triptófano) en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, a diferencia de los métodos de fijación de colorante Coomassie, el esqueleto peptídico universal, también contribuye a la formación de color, ayudando a minimizar la variabilidad causada por diferencias en la composición de proteínas.

El procedimiento que se siguió consistió en la preparación de una curva de calibración de albumina de suero bovino con un rango de cuantificación de 0 a 2000 µg/ml y se colocaron 25 µl de cada muestra o estándar en cada pozo de una microplaca de 96 pocillos, posteriormente se añadieron 200µL del reactivo de trabajo a cada pocillo y se agitó la placa durante 30 segundos. Posteriormente se cubrió la placa y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Finalmente la placa se enfrió a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 562 nm en un lector SpectraMax 190, Molecular Devices.

6.1.2.3 Electroforesis

Los aislados proteicos fueron caracterizados mediante electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras. De acuerdo con su pureza, fue pesado el equivalente a 10 µg de proteína y se disolvieron en NaOH 0.1 N. Posteriormente

se les adicionó solución amortiguadora Para la electroforesis en condiciones reductoras, se agregó 5% de β -mercaptoetanol a la solución amortiguadora donde se disolvieron las muestras. Posteriormente las muestras fueron calentadas por 1 minuto a 100 °C en un baño seco. Después fueron colocados 32 μ l en cada pocillo de geles de acrilamida 4–15% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ de BIO-RAD. Se utilizó un marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards de 10 a 250 kDa.

6.1.2.4 Calorimetría diferencial de barrido (CDB)

Las características térmicas del aislado proteico de frijol en función del pH se investigaron usando CDB, las mediciones se llevaron a cabo en un equipo DSC 7 Perkin Elmer. Fueron colocados 50 μ l de soluciones de proteína al 20 % p/p con valores de pH de 2 a 10 en crisoles de acero inoxidable sellados herméticamente, un crisol vacío fue usado como referencia. La medición se llevó a cabo bajo atmósfera de nitrógeno. Las muestras fueron calentadas de 30 a 110 ° C a una velocidad de calentamiento de 10 °C / min.

6.1.2.5 Índice de polidispersión y potencial Z

El índice de polidispersión y potencial Z de CPF en función del pH fueron medidos en un equipo Malvern Zetasizer Nano ZS Instrument (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK). Fueron preparadas soluciones proteicas en una concentración de 0.1 mg/ml y el pH fue ajustado a 2, 4, 6, 8,10 y 12 con NaOH o HCl. Posteriormente las soluciones fueron centrifugadas a 4200 RPM durante 10 minutos para eliminar partículas suspendidas. Las mediciones fueron realizadas por triplicado a temperatura ambiente.

6.1.2.6 Dicroísmo circular

La espectroscopía de dicroísmo circular (DC) fue utilizada para obtener información sobre la estructura secundaria de las proteínas presentes en el aislado proteico. El aislado proteico fue disuelto en agua en un rango de pH de 2 a 11, en una concentración de 0.4 mg/ml para la medición de dicroísmo circular en la región UV-lejano (205-250 nm), mientras que para las mediciones en la región

UV-cercano (250-320 nm) fueron preparadas soluciones de 1.2 mg/ml. Los espectros de dicroísmo circular fueron obtenidos en un espectrofotómetro Bio-Logic Science Instruments MOS-500 a 25 ° C en una celda de cuarzo de 1 cm de longitud. Los puntos de datos para los espectros fueron registrados con un ancho de banda de 1 nm.

6.1.2.7 Solubilidad de aislado proteico

Fueron preparadas soluciones de CPF en agua desionizada (1%, p/v) y se agitaron durante 30 minutos con agitador magnético, posteriormente fue ajustado el pH de 2 a 11 con NaOH y HCl 0.5 M. En caso de ser necesario el pH se reajustó después de 30 minutos de agitación. A continuación, las dispersiones fueron centrifugadas a 12 000 × g durante 20 min a 20 ° C. Después de la dilución apropiada, el contenido de proteína de los sobrenadantes fue cuantificado mediante el método de Bradford usando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. La solubilidad se expresó como gramos de proteína soluble por 100 g de proteína.

6.1.2.8 Capacidad emulsificante

La capacidad emulsificante del CPF en función del pH se determinó siguiendo la metodología descrita por Mundi & Aluko, (2012). Se pesaron 300 mg de CPF y se adicionaron 30 ml de agua destilada, la suspensión obtenida se agitó con vórtex durante 30 segundos, después fueron adicionados 10 ml de aceite de girasol. El pH fue ajustado a 2, 4, 6, 8, 10 y 12 con HCl o NaOH 1N, posteriormente cada muestra se homogenizó a 10 000 RPM durante 1 minuto. Fueron tomados 50 µl del fondo de la emulsión y diluidos en 5 ml de SDS al 0.1 % en el tiempo 0 y 10 minutos después de la homogenización.

$$IAE \left(\frac{m^2}{g} \right) = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times FD}{c \times \phi \times (1-\theta) \times 10000} \quad \text{Ec. 6.1}$$

$$IEE \text{ (min)} = \frac{A_0}{A_{0-10}} \times 10 \quad \text{Ec. 6.2}$$

Donde FD es el factor de dilución (100), c es la concentración inicial de proteína (g/mL), ϕ longitud de óptica (0.01 m), θ fracción de aceite utilizada para formar la

emulsión (0.25), y A_0 y A_{10} la absorbancia de la emulsión diluida al minuto 0 y 10, respectivamente. Las mediciones se realizaron por triplicado.

6.1.2.9 Capacidad espumante

La capacidad espumante del CPF en función del pH se determinó siguiendo la metodología descrita por Mundi & Aluko, (2012). Fueron preparados 5 ml de soluciones de proteína al 1 % en tubos de centrifuga graduados de 50 ml, el pH se ajustó con NaOH o HCl. Las muestras fueron homogenizadas a 20,000 rpm durante 1 min usando un homogeneizador Micra D9 (MICCRA GmbH Deutschland). Se determinó la capacidad de la fase continua para incluir aire (capacidad espumante) empleando la Ecuación 7.1 utilizando la media de tres mediciones.

$$CE = \frac{\text{Volumen después de homogenización} - \text{Volumen antes de homogenización}}{\text{Volumen antes de homogenización}} * 100 \quad \text{Ec. 6.3}$$

La capacidad de retener aire durante un cierto período de tiempo se realizó midiendo el volumen de espuma después del almacenamiento a temperatura ambiente durante 30 minutos y se expresó como porcentaje del volumen de espuma original.

6.1.2.10 Capacidad de retención de agua y aceite

La capacidad de retención de agua y aceite se determinó utilizando el método reportado por Mundi & Aluko, (2012). Fueron dispersados 1.5 g de CPF en 25 ml de agua destilada (o aceite de canola puro) en un tubo de centrifuga previamente pesado. Las dispersiones se agitaron en vórtex durante 1 minuto, posteriormente se dejaron reposar durante 30 minutos y luego se centrifugaron a 4200 RPM durante 25 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se decantó y el exceso de agua (o aceite) en la fase superior se drenó colocando los tubos en un ángulo de 45 °C durante 15 minutos. Finalmente el tubo que contenía el pellet de proteína se pesó nuevamente para determinar la cantidad de agua o aceite retenido por gramo de muestra.

6.2 Desarrollo y caracterización de nanofibras electroestiradas de proteína de chícharo utilizando pululano como acarreador

6.2.1 Materiales

Se empleó aislado proteico de chícharo amarillo (*Pisum sativum*) NUTRALYS® S85, el cual presenta un contenido proteico de 85% (b.s.) donado por la empresa Roquette. Ácido clorhídrico (HCl), hidróxido de sodio (NaOH), Kit BCA para cuantificación de proteína, alcohol polivinílico (PVA) y pululano.

6.2.2 Métodos

6.2.2.1 Contenido proteico y perfil electroforético de aislado proteico de chícharo (APCH)

El contenido proteico y la distribución de pesos moleculares se determinaron siguiendo la metodología presentada en el punto 6.1.1.2.3.

6.2.2.2 Preparación de soluciones acuosas de aislado proteico de chícharo

Al realizar pruebas preliminares de solubilidad del aislado proteico de chícharo directamente en agua se observó sedimentación lo cual fue un indicio de que el aislado proteico no es completamente soluble debido a las fuertes interacciones proteína-proteína que impiden la interacción con el solvente. La desnaturalización de las proteínas es el desdoblamiento de la proteína a partir de un estado nativo estructurada en un estado (parcialmente) no estructurado con poca o ninguna estructura residual fijo, que no está lejos de una espiral al azar. La desnaturalización puede ser inducida tanto por la temperatura y por desnaturalizantes (desnaturalización química) (De Graaf, 2000), es por esto que, en este punto, se evaluó la solubilidad de los dos aislados proteicos (frijol, chícharo) en agua para lo cual se planteó un diseño 3^3 para cada aislado donde los factores estudiados fueron la concentración, el pH y la temperatura y como variables de respuesta se tienen la solubilidad (Tabla 7).

Tabla 7. Diseño experimental para la evaluación de solubilidad para cada aislado proteico

Factor	Nivel bajo	Nivel medio	Nivel alto	Variables de respuesta
Concentración (% p/p)	8	10	13	Solubilidad
pH	2	9	12	
Temperatura (°C)	25	60	95	

6.2.2.3 Caracterización de soluciones acuosas APCH-PUL

Debido a que el proceso de electroestirado de proteínas globulares es muy complejo es necesario investigar el comportamiento de las proteínas de cada uno de los aislados proteicos en solución, lo cual nos brindará el conocimiento acerca de las condiciones conformacionales que favorecen o dificultan el electroestirado.

La conductividad y la tensión superficial de las soluciones poliméricas se midieron usando un medidor de conductividad (Orion Star A212 de Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.) y un tensiómetro basado en el método de anillo Du Nouy (Sigma 703, KSV Instruments Ltd., Helsinki, Finlandia), respectivamente. La viscosidad dinámica de las soluciones se determinó utilizando un sistema avanzado de expansión reométrica (ARES) de Rheometric Scientific. Las pruebas se realizaron utilizando un accesorio Couette con un cilindro de las siguientes dimensiones: 23 mm (diámetro interior), 25 mm (diámetro exterior) y 20 mm de altura. Todas las mediciones se realizaron por triplicado a 25 ° C.

6.2.2.4 Electroestirado

De los experimentos obtenidos, fue seleccionado el que presentó los resultados apropiados para que el proceso de electroestirado fuera factible. Se estudió el efecto de las variables del proceso en la formación de fibras: voltaje, velocidad de flujo y distancia del colector para lo cual se utilizó un diseño 2^3 (Tabla 8), las variables de respuesta fue la formación de fibras, cantidad de defectos y diámetro.

Tabla 8. Diseño experimental para el proceso de electroestirado APCH

Factor	Nivel bajo	Nivel alto	Variables de respuesta
Voltaje	15 kV	22 kV	
Velocidad de flujo	0.4 ml/h	1 ml/h	Formación de fibras
Distancia del colector	10 cm	15 cm	

6.2.2.5 Morfología de las fibras elaboradas a partir APCH-PUL

La morfología y las características de superficie de las fibras electroestiradas se analizaron por microscopía electrónica de barrido (EVO-50, Carl Zeiss) siguiendo el procedimiento descrito por Soto et al., (2016). Las distribuciones de diámetro de las fibras, así como las fracciones de porosidad de los mats se obtuvieron a partir de las imágenes SEM con 50 K de aumento utilizando el software ImageJ-DiameterJ (Hotaling et al., 2015).

6.2.2.6 Espectroscopía Infrarroja con Reflectancia Total Atenuada

Los espectros de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) se recogieron con un espectrómetro ATR-FTIR Perkin Elmer Spectrum 100. Los escaneos se tomaron en un rango espectral de 4000-600 cm^{-1} con resolución de número de onda de 4 cm^{-1} y un promedio de 16 escaneos.

6.2.2.7 Propiedades mecánicas

El comportamiento de las fibras electroestiradas se probó en una máquina de prueba Zwick / Roell modelo Z005 con una velocidad de cruceta de 10 mm / min a temperatura ambiente y humedad. Los mats de fibras se seccionaron en tiras rectangulares de 5 mm de ancho y 30 mm de largo. El módulo de elasticidad (E), el porcentaje de elongación a la falla (ϵ) y la resistencia a la tracción final (σ) se calcularon a partir de las curvas de distancia de carga generadas de acuerdo con el software testXpert Intelligent testing versión 12.

6.3 Búsqueda del solvente ideal para desarrollar fibras electroestiradas a partir de los aislados proteicos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y chícharo (*Pisum sativum*).

6.3.1 Materiales

Se utilizó el concentrado proteico de frijol bayo Madero obtenido y caracterizado en el capítulo 7.1. También se utilizó el aislado proteico de chícharo NUTRALYS® S85. El ácido trifluoroacético (TFA) fue suministrado por Merck Millipore, el ácido fórmico (FA), el trifluoroetanol (TFE) y el hexafluoroisopropanol (HFIP) fueron suministrados por Sigma-Aldrich. Fue utilizado hidróxido de sodio 0.1 M (NaOH) y HCl marca J.T.Baker®.

6.3.2 Métodos

6.3.2.1 Preparación de soluciones para electroestirado

En esta parte del trabajo fueron empleados los aislados proteicos de chícharo (APCH) y frijol común Bayo Madero (CPF) cuyos resultados de su caracterización se encuentran en los puntos 6.1 y 6.2. Como prueba preliminar fueron preparadas soluciones al 5, 10 y 15 % p/v en los diferentes solventes: agua, AF, HFIP, TFE y TFA. Se seleccionó la concentración al 10 % p/v de cada aislado proteico en cada solvente para realizar los experimentos de electroestirado por presentar mejores características en cuanto apariencia (Tabla 9).

6.3.2.2 Viscosidad

Fueron obtenidas las curvas de flujo de cada solución proteica en un reómetro Ares (Rheometric Scientific). Las mediciones se realizaron utilizando un accesorio Couette con un cilindro de las siguientes dimensiones: 23 mm (diámetro interior), 25 mm (diámetro exterior) y 20 mm de altura. Todas las mediciones se realizaron por triplicado a 25 ° C.

6.3.2.3 Dicroísmo circular

La espectroscopía de dicroísmo circular (DC) se usó para proporcionar información sobre la estructura secundaria de las proteínas presentes en los

aislados proteicos. Los polvos de proteína se disolvieron en agua, HFIP, trifluoroetanol, ácido trifluoroacético TFA y ácido fórmico AF en una concentración de 0.4 mg/ml para la medición de dicroísmo circular en la región UV-lejano (205-250 nm), mientras que para las mediciones en la región UV-cercano (250-320 nm) se prepararon soluciones de 1.2 mg/ml. Los espectros de dicroísmo circular se obtuvieron en un espectrofotómetro Bio-Logic Science Instruments MOS-500 a 25 ° C en una celda de cuarzo de 1 cm de longitud. Los puntos de datos para los espectros registraron en cada nanómetro con un ancho de banda de 1 nm.

Tabla 9. Concentración de aislados proteicos y solventes empleados en las soluciones de electroestirado

Muestra	Concentración (%)	Solvente
APCH	10	Agua
		Ácido fórmico (AF)
		Hexafluoroisopropanol (HFIP)
		Ácido trifluoroacético (TFA)
		Trifluoroetanol (TFE)
CPF	10	Ácido fórmico (AF)
		Hexafluoroisopropanol(HFIP)
		Ácido trifluoroacético (TFA)
		Trifluoroetanol (TFE)
		Ácido fórmico (AF)

6.3.2.4 Electroestirado

Fue evaluado el efecto de las variables del proceso en la formación de fibras: voltaje, velocidad de flujo y distancia del colector para lo cual se utilizó un diseño 2^3 (Tabla 10), la variable de respuesta fue la formación de fibras.

Tabla 10. Diseño experimental para el proceso de electroestirado de cada aislado proteico

Factor	Nivel bajo	Nivel alto	Variables de respuesta
Voltaje	15 kV	22 kV	
Velocidad de flujo	0.2 ml/h	0.4 ml/h	Formación de fibras
Distancia del colector	10 cm	15 cm	

6.3.2.5 Caracterización de las propiedades físicoquímicas de las fibras obtenidas

La morfología y las características de la superficie de las muestras electroestiradas se analizaron por FESEM (Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo JSM-7610F). Las muestras fueron recolectadas en obleas de silicio y posteriormente fueron recubiertas de oro. Después del proceso de electroestirado, las muestras fueron secadas a 40 ° C durante 4 horas y posteriormente se realizó la espectroscopía infrarroja de acuerdo al punto 6.2.2.6 Espectroscopía Infrarroja con Reflectancia Total Atenuada

6.4 Obtención y caracterización de geles a partir de concentrado proteico de frijol

6.4.1 Materiales

Se utilizó el concentrado proteico de frijol bayo Madero obtenido y caracterizado en el capítulo 7.1. Fue utilizado hidróxido de sodio (NaOH) y ácido clorhídrico (HCl) marca J.T.Baker®.

6.4.2 Métodos

6.4.2.1 Obtención de geles de CPF

Se empleó la metodología propuesta por Maltais et al., (2009) para gelificación en frío con algunas modificaciones. Se planteó un diseño de experimentos 2^3 (Tabla 11.) donde los factores estudiados fueron: concentración de proteína (9 y 14 % p/v), pH (2 y 7) y contenido de CaCl_2 (0 y 20 mM). Las soluciones fueron preparadas de acuerdo con la concentración en estudio y se mantuvieron en agitación durante 30 minutos, después el pH se ajustó y se mantuvo en agitación 30 minutos. Las soluciones de proteína se calentaron a 95 °C durante 30 minutos usando un baño de agua, pasando este tiempo, las muestras se enfriaron a 25 °C durante 2 horas. Posteriormente se adicionó CaCl_2 y se agitó con vórtex 15 segundos. Finalmente los geles fueron almacenados en refrigeración.

Tabla 11. Diseño de experimentos 2^3 para la obtención de geles

Factor	Niveles	
Concentración (%p/v)	9	14
pH	2	7
Fuerza iónica (CaCl_2)	0	20 mM

6.4.2.2 Medición de propiedades mecánicas

Las propiedades de deformación a gran escala (relajación de tensión y capacidad de untabilidad) de las muestras se midieron mediante la prueba de capacidad de untabilidad. La prueba se realizó utilizando un analizador de textura TA.XT2

(Texture Technologies Corporation, TTC, Scarsdale. NY) equipado con un dispositivo de untabilidad que es un conjunto de conos de 45 ° de plexiglás (HDP / SR) macho y hembra (HDP / SR) emparejados con precisión (Stable Micro System, Ltd., Goldaming, UK) y una celda de carga de 5 kg. Las mediciones se realizaron a 10 ± 1 ° C. Cada muestra se midió dos veces, con una muestra nueva utilizada para cada medición. La muestra se colocó entre los conos, posteriormente se retiró el cono macho de la muestra. Las muestras se colocaron en el interior del cono hembra y con una espátula fue eliminado cualquier exceso de muestra para dejar una superficie de prueba plana. Las muestras fueron equilibradas a 10 °C. El cono macho presionó la muestra de gel a 3 mm/s continuó hasta una profundidad de 23 mm. Durante esta última etapa la muestra salió de entre los conos. Finalmente, se retiró el cono macho de la muestra.

VII. Resultados y discusión

7.1 Obtención y caracterización fisicoquímica, conformacional y funcional de concentrado proteico de frijol (CPF).

7.1.1 Contenido proteico y perfil electroforético.

El CPF presentó un contenido proteico de 71 ± 3 %, esto es indicativo de que la metodología utilizada de aislamiento mediante precipitación por punto isoeléctrico no permite la obtención de un aislado de alta pureza para este tipo de frijol. La **Figura 4** muestra los perfiles electroforéticos del CPF en condiciones no reductoras y reductoras donde se observa la presencia de 9 y 11 bandas con pesos moleculares que van de 12 a 97 kDa correspondientes a lipoxigenasa (97 kDa), faseolina (43, 53 kDa), arcelina-4 (29 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa), Inhibidor de α amilasa (18 kDa) (Mojica and de Mejía, 2015). CPF presentó perfiles electroforéticos similares a los reportados en la literatura (Mojica & de Mejía, 2015).

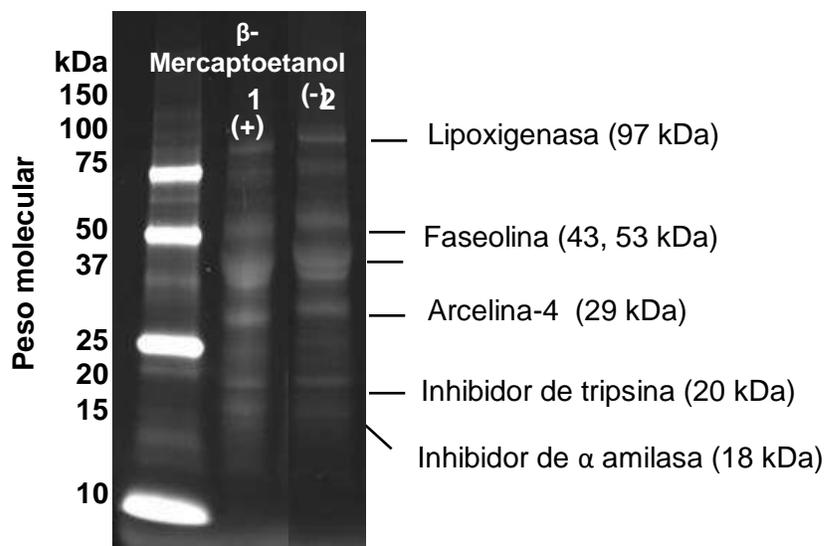


Figura 4. Perfiles electroforéticos de aislados proteicos en condiciones no reductoras y reductoras, a) CPF b) APCH

7.1.2 Propiedades térmicas

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica que proporciona información útil sobre las propiedades térmicas de proteínas como T_d (Temperatura de desnaturalización) y ΔH (Diferencial de entalpía específica total para el proceso de desnaturalización). T_d refleja la temperatura de desnaturalización de la proteína donde ocurre la interrupción de los enlaces de hidrógeno que mantienen las estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas, en particular la conformación terciaria (S.W. Yin et al., 2011) y también proporciona información sobre la estabilidad proteica (Shevkani et al., 2014). ΔH indica la cantidad de energía necesaria para poder llevar a cabo la desnaturalización proteica (Beldarraín, 2001; Shevkani et al., 2014). Las propiedades térmicas se presentan en el Tabla 12. Puede observarse que se obtienen menores valores de T_d a pH 2 y pH 10, mientras que a pH 4 (cercano al punto isoeléctrico) se observó la más alta temperatura de desnaturalización. Esto es indicativo de que a valores de pH 2 y 10 ocurre la pérdida de estructura terciaria, mientras que a pH 4 la proteína se encuentra mayormente plegada. A pH 12 no fue observado un pico endotérmico lo cual puede deberse a que a éste valor la proteína ya se encuentra desplegada. Para otras variedades de frijol rojo se han reportado valores, sin ajuste de pH, de T_d de 91 °C y 83.8 °C para chícharo de campo (Shevkani et al., 2014), éstos valore. En cuanto a los valores de ΔH se observó que a pH 2 se obtuvo el menor valor (3.707 J/g) y a pH 8 el mayor (6.78 J/g) representando un contenido de estructura secundaria de orden menor y mayor, respectivamente.

Tabla 12. Resultados de calorimetría diferencial de barrido

pH	T_{onset}	$T_{end}(^{\circ}C)$	$T_d(^{\circ}C)$	ΔH (J/g)
2	68.459	81.38	75.166	3.707
4	92.466	102.254	97.2	5.559
6	90.5652	99.437	95.366	4.493
8	81.522	94.701	88.7	6.78
10	68.64	82.244	75.866	5.098
12	Sin señal	-----	-----	-----

7.1.3 Dicroísmo circular

Los cambios conformacionales de las soluciones de CPF a diferentes valores de pH se investigaron utilizando DC-UV lejano y cercano. La Figura 5a muestra los espectros de CC del CPF a diferentes valores de pH, las mediciones a valores de pH de 4 a 6 no se realizaron debido a la baja solubilidad del CPF. Los espectros mostraron un comportamiento similar, sin embargo, se observaron algunos cambios tanto en la magnitud como en la forma de las bandas, lo que indica que hay cambios conformacionales. El valor de la elipticidad a 222 nm es un valor comúnmente utilizado para explicar los cambios de conformación porque la transición $n \rightarrow \pi^*$ del enlace peptídico se produce en este valor (Figura 5b). A pH 2, se observó la mayor elipticidad negativa, mientras que a valores de pH alcalino (8 y 10), se observaron menores valores de elipticidad, se ha informado que tal comportamiento es indicativo de que la proteína ha sido desnaturizada (Aghanouri et al., 2015). El aumento en la señal negativa a pH 12 puede deberse al hecho de que hubo un mecanismo de desnaturización de dos pasos y la existencia de una forma intermedia para la desnaturización por la solución alcalina a este valor de pH (Aghanouri et al., 2015).

Los espectros de CD cercano a UV en la región de 250-320 nm provienen de aminoácidos aromáticos, el triptófano (Trp) muestra una banda positiva a 290 nm con una estructura fina entre 290 y 305 nm; tirosina (Tyr) una banda positiva entre 275 y 282 nm, con un hombro en longitudes de onda más largas; La fenilalanina (Phe) muestra bandas más débiles pero más nítidas con una estructura fina entre 255 y 270 nm (Kelly et al., 2005). Las cadenas laterales aromáticas se encuentran con frecuencia en los sitios de unión al ligando y a menudo están presentes en las regiones afectadas por cambios conformacionales (Perczel and Hollósi, 1996).. Los resultados (Figura 5c) revelaron que hubo cambios conformacionales con respecto al pH, se observó que a pH 2 las bandas situadas a 258 y 265 nm correspondientes a Phe fueron más definidas que a pH alcalino, además, el valor de elipticidad negativo de la banda situada a 275 nm, atribuida a Tyr, se redujo a pH ácido, de igual manera, para la banda Trp se observó menos definida a pH 12. Se observó que la elipticidad negativa se redujo con el aumento del pH, se ha

reportado que la disminución de las bandas sugiere una mayor flexibilidad de las cadenas alrededor de los residuos aromáticos debido a un despliegue parcial de las proteínas (Sasaki et al., 1997).

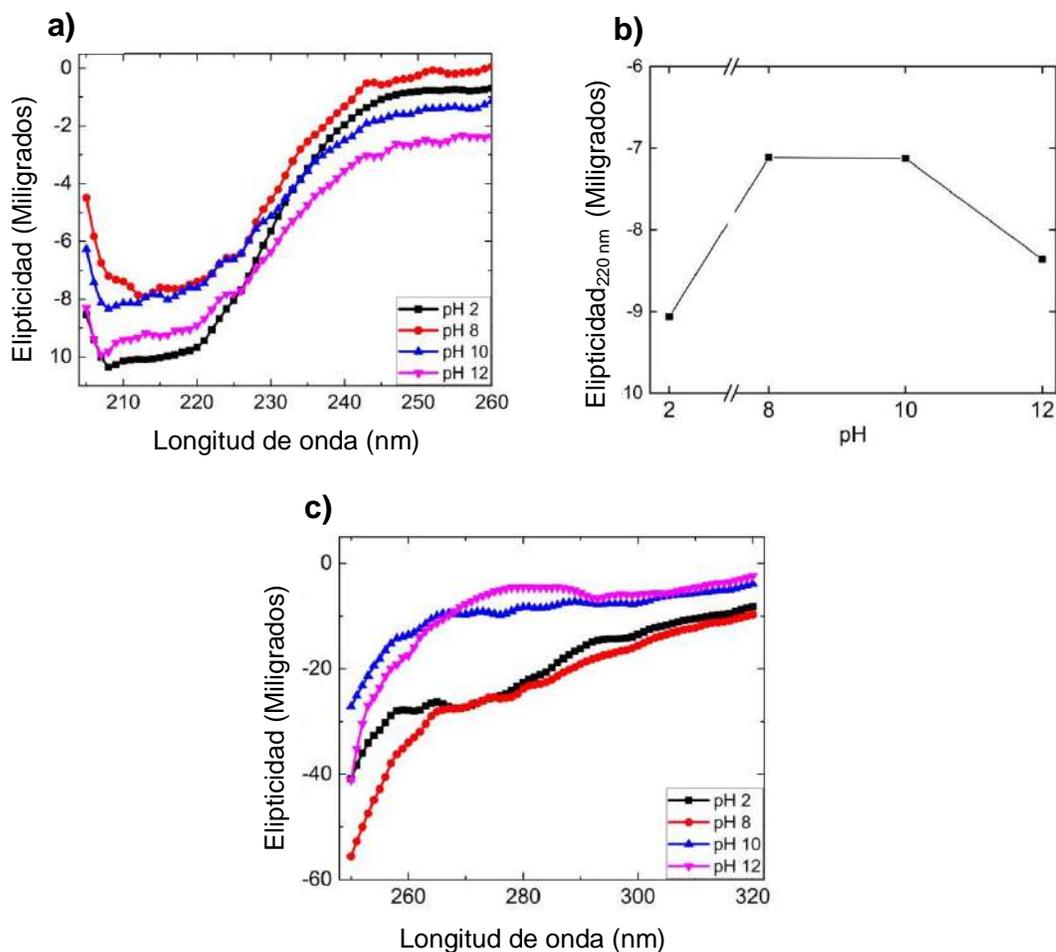


Figura 5. a) Espectros de dicroísmo circular UV lejano a diferentes valores de pH b) Efecto del pH sobre el espectro de dicroísmo circular a 222 nm, c) Espectros UV cercano.

6.1.4 Índice de polidispersión

La dispersión dinámica de la luz (DLS), a la que a veces se hace referencia como dispersión de luz cuasi elástica (QELS), es una técnica no invasiva que es adecuada para la determinación del peso molecular y mediciones de tamaño de las moléculas en el rango de 10 μm a menos de 1 nm y con un peso molecular inferior a 1000 Da (Naveen et al., 2019).

Las aplicaciones típicas de la dispersión de luz dinámica son la caracterización de partículas, emulsiones o moléculas que se han dispersado o disuelto en un líquido. El movimiento Browniano de las partículas o moléculas en suspensión hace que la luz láser se disperse en diferentes intensidades. Del análisis de estas fluctuaciones de intensidad se obtiene la velocidad del movimiento browniano y por lo tanto el tamaño de partícula utilizando la relación de Stokes-Einstein.

En la Figura 6 se presentan los resultados correspondientes al índice de polidispersidad (IPD) el cual es un valor adimensional, los valores superiores a 0.7 indican que la muestra tiene una distribución de tamaño muy amplia. Puede observarse que a valores de pH de 2, 4 y 10 se observó mayor dispersidad, mientras que a pH 12 la muestra fue menos dispersa

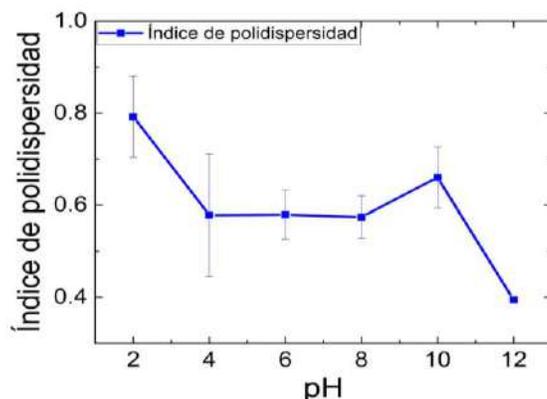


Figura 6. Efecto del pH sobre el índice de polidispersidad (IPD)

7.1.5 Distribución de diámetro hidrodinámico

En la Tabla 13 se presentan los resultados correspondientes a las distribuciones de diámetro hidrodinámico así como los valores de intensidad de cada pico, los cuales representan la proporción de la muestra que presenta cada tamaño. Puede observarse que el pH influyó en el diámetro hidrodinámico, se observaron dos tamaños de agregados predominantes en los valores de pH estudiados, excepto para el pH 12, donde una población fue la dominante. Los valores de diámetro

hidrodinámico más alto se obtuvieron a pH 8 donde el 57.45 % de la muestra presentó un tamaño de 811.750 ± 65.973 nm y el 39.1 % de 149.800 ± 21.779 nm, mientras que a pH 12 se obtuvo los tamaños más bajos al presentar 90.16 % de las moléculas un valor de 288.467 ± 21.020 . Han sido reportados diámetros hidrodinámicos de 30 a 40 nm para aislado proteico de frijol rojo arriñonado a pH 2 (Zhang et al., 2010), por lo cual, los resultados obtenidos indican que la proteína se encuentra formando agregados y que éstos tienen un tamaño menor a pH 12. Resultados similares fueron reportados para hordeína disuelta en ácido acético, donde el 54.8 % de la muestra presentó agregados con diámetro hidrodinámico de 728.6 nm, mientras que gliadina en el mismo solvente presentó el 74.5 % un diámetro de 33 nm, al observar la muestra mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) encontraron que las partículas de hordeína exhibieron una arquitectura flexible y extendida, mientras que en gliadina también fueron observados agregados pero estos fueron muy compactos (Wang and Chen, 2012).

Tabla 13. Distribución de diámetro hidrodinámico

pH	Diámetro hidrodinámico (nm)			Intensidad de pico (%)		
	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 1	Pico 2	Pico 3
2	619.83 ± 46.17	100.15 ± 14.10	5338.00 ± 130.11	69.07 ± 6.47	28.30 ± 4.29	2.63 ± 2.70
4	537.75 ± 58.05	103.53 ± 32.43	-----	87.00 ± 6.65	13.00 ± 6.65	-----
6	392.20 ± 111.02	75.05 ± 8.11	5011.50 ± 19.09	50.30 ± 3.39	43.50 ± 5.66	6.15 ± 2.33
8	811.75 ± 65.97	149.80 ± 21.78	13.86 ± 19.60	57.45 ± 10.11	39.10 ± 5.23	3.45 ± 4.88
10	692.70 ± 82.59	162.10 ± 46.10	5091.00 ± 11.31	57.35 ± 12.80	33.60 ± 11.46	9.00 ± 1.27
12	288.47 ± 21.02	4220.33 ± 783.61	-----	90.167 ± 5.853	9.83 ± 5.85	-----

7.1.6 Potencial Z

El potencial Z se usa comúnmente en la interpretación de la estabilidad de la suspensión proteica. En la **Figura 7** se presentan los resultados del efecto del pH sobre el valor de potencial Z a 25 °C de CPF. A valores de pH por debajo del

punto isoelectrico fueron observados valores positivos de potencial Z, encontrándose a pH 2 el valor más alto (15.46 ± 1.10 mV) en comparación con el valor a pH 4 (12.1), después del punto isoelectrico el potencial se volvió negativo pasando a -19.466 ± 1.501 mV a pH 6, posteriormente, a partir de pH 8 se alcanzó el máximo valor (-30.133 ± 0.929 mV) el cual permaneció sin cambio a valor de pH 10 y 12. Este patrón de comportamiento coincide con lo reportado para faseolina (S.-W. Yin et al., 2011), se reportó que las cargas en la proteína son gradualmente cambiadas de positivas a negativas como resultado de desprotonación gradual de los grupos carboxilo y protonación de los grupos amino.

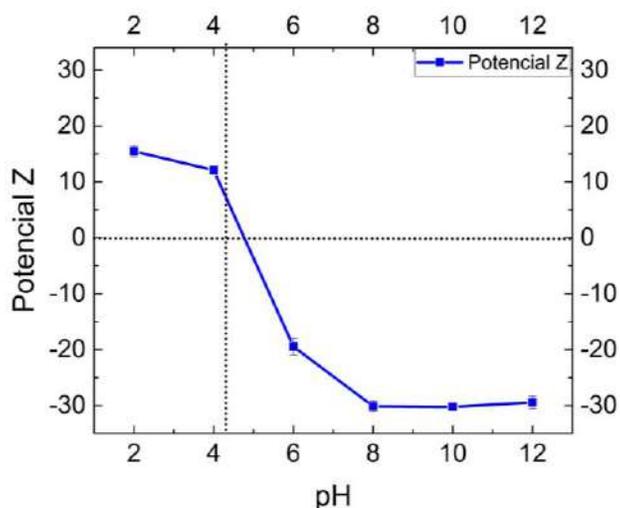


Figura 7. Efecto del pH sobre el potencial Z

7.1.7 Solubilidad

La solubilidad de proteínas a diferentes valores de pH es un indicador del rendimiento de aislados de proteínas en los sistemas alimentarios, y también el grado de desnaturalización de proteínas debido al calor o el tratamiento químico. Como era de esperarse, el pH afectó significativamente ($\alpha=0.05$) la solubilidad de CPF (Figura 8). Se observó solubilidad mínima en el rango de pH de 4 a 6 (1 %) que es el rango cercano al punto isoelectrico, la solubilidad se ve desfavorecida debido a que en este punto no hay carga neta en la proteína, como resultado, no hay interacciones repulsivas y las interacciones proteína-proteína son predominantes. A pH 2 se observó solubilidad del 49.6 % y a pH 7 se observó un

51.36 %, como era de esperarse, a valores de pH alcalinos se observó un incremento la solubilidad con el aumento del pH alcanzando un 80.66 % a pH 12. Fue reportado para aislados proteicos de frijol rojo arriñonado el mismo perfil de solubilidad, sin embargo la solubilidad reportada fue mayor, pues a pH 2 y 9 se obtuvo de 65.8 a 78.8% y de 75.1 a 94.6 % de solubilidad, respectivamente. Se ha reportado que la solubilidad para aislado proteico de chícharo puede ser influenciada por la formación de complejos de proteínas insolubles durante la precipitación por punto isoeléctrico (Adebiyi and Aluko, 2011), además también se debe tener en cuenta que existen más proteínas presentes en el aislado que por su naturaleza son insolubles lo cual puede reducir la solubilidad general del aislado de proteína.

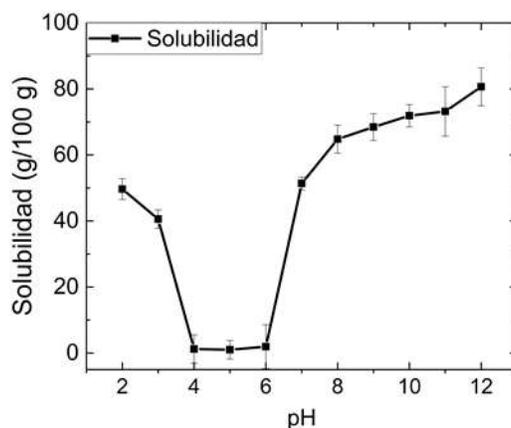


Figura 8. Efecto del pH sobre la solubilidad de CPF

6.1.8 Capacidad espumante

Las propiedades de formación de espuma (capacidad y estabilidad) son las propiedades funcionales de los aislados de proteínas que determinan su utilización en sistemas alimentarios, donde se requiere aireación, por ejemplo coberturas batidos, alimentos horneados y mezclas para helados. En la Figura 9 se presentan los valores correspondientes a la capacidad espumante en función del pH de CPF, se observó que a pH 10 se obtuvo la mayor capacidad espumante (53.33 ± 5.08 %) sin embargo el análisis estadístico ($\alpha=0.05$) no mostró diferencias respecto a los valores obtenidos a pH 2, 8 y 12, mientras que los valores más bajos fueron

observados a valores de 4, 6 y 7, no observándose diferencia significativa entre ellos. Los resultados de capacidad espumante fueron menores comparados con los reportados para el frijol rojo arriñonado (120 %) (Shevkani et al., 2014).

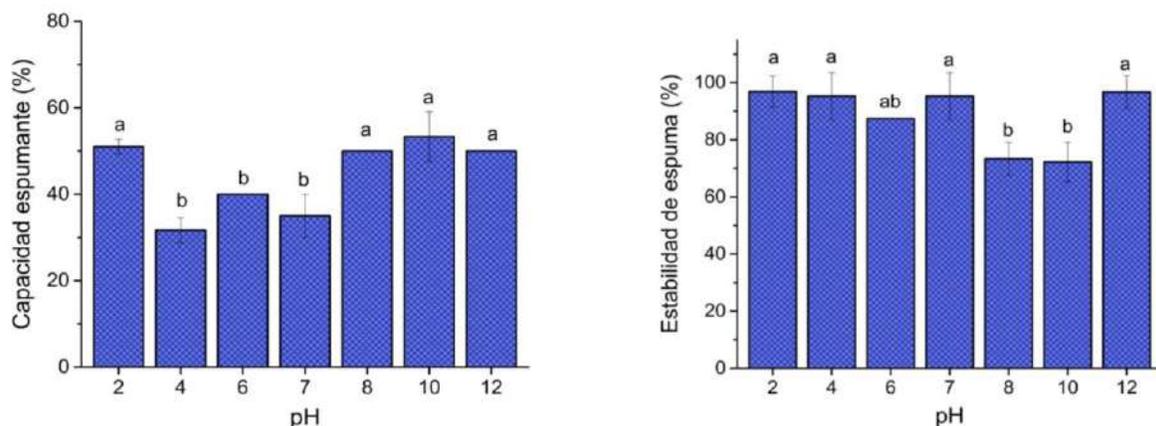


Figura 9. Efecto de la capacidad espumante y estabilidad la espuma de CPF

Los resultados se expresaron como la media \pm E.E. De tres experimentos independientes. Diferentes letras mayúsculas y minúsculas indican diferencia significativa ($\alpha < 0.05$).

En cuanto a la estabilidad de la espuma después de 30 minutos, se observó que el 97 % de ésta permaneció estable en la mayoría de los valores de pH estudiados (2, 4, 7 y 12), mientras que a pH 8 y 10 se observó una menor estabilidad. Shevkani et al., (2014) reportaron valores similares a pH 2 y 9, mientras que la menor estabilidad (75 %) se observó a valores de pH cercanos al punto isoeléctrico (4 y 5), en nuestro caso, a pH 4 un 95.24 % de la espuma se mantuvo.

7.1.9 Capacidad emulsificante

Las emulsiones son sistemas dispersos de dos o más líquidos inmiscibles. Se estabilizan mediante emulsionantes que son compuestos que forman películas interfaciales y evitan que la fase dispersa se una. Las proteínas son capaces de estabilizar las emulsiones debido a su naturaleza anfipática. Las propiedades emulsionantes de una proteína dependen de la velocidad a la que se difunde en la

interfaz, de su capacidad de adsorción y de la deformabilidad de su conformación a través de la tensión interfacial (desnaturalización de la superficie) (Weder and H.D., 2003). La velocidad de difusión depende de la temperatura y la masa molecular de la proteína, que a su vez puede verse influida por el pH y la fuerza iónica. La capacidad de adsorción depende de la exposición de los grupos hidrófilos e hidrófobos y, por lo tanto, de la composición de aminoácidos, así como del pH, la fuerza iónica y la temperatura.

En la Figura 10a se muestran los resultados correspondientes al índice de actividad emulsificante (IAE), el cual se presenta en unidades de área de interfase estabilizada por g de proteína. Se observó que a valores de pH 2, 10 y 12 se obtuvieron los valores más altos (136.82 ± 8.75 , 127.50 ± 5.29 y 121.43 ± 0.81 m²/g, respectivamente), mientras que a pH 6 y 8 se encontraron valores intermedios (79.82 ± 3.90 y 86.06 ± 1.31 m²/g) y a pH 4 (cerca del punto isoeléctrico) se encontró el valor más bajo (31.50 ± 0.08 m²/g)-

Se ha reportado que la capacidad o actividad de la emulsión generalmente depende de la capacidad de las proteínas para adsorber en la interfaz, mientras que la estabilidad de la emulsión está relacionada con las propiedades de esta capa adsorbida (Shevkani et al., 2014). Podemos observar que el perfil de IAE respecto al pH coincide con el perfil de solubilidad, por lo cual puede decirse que la actividad emulsificante está siendo afectada por la solubilidad (Tang and Sun, 2011), y esto a su vez, se debe al cambio en las cargas en las proteínas. Presumiblemente, una mayor carga en la superficie de la proteína conduce a la repulsión electrostática entre las proteínas adsorbidas en la película de proteína interfacial lo cual proporciona estabilidad a la emulsión contra la coalescencia o floculación (Dickinson et al., 1988), por lo tanto, los valores de pH donde la proteína está más cargada producirán un efecto positivo en la capacidad emulsificante. Por otra parte, se ha reportado que la conformación proteica impacta los valores de IAE, en el estudio reportado por Shevkani et al., (2014) se encontró que un mayor grado de despliegue de polipéptidos pudo haber ocurrido

en el aislado proteico de frijol arriñonado, lo que ocasionó que estuviera disponible una mayor área de superficie de las proteínas para formar la emulsión.

En cuanto al valor del índice de estabilidad de la emulsión (IEE) (Figura 10b), a valores de pH 2 y 4 se encontraron los valores más altos (71.38 ± 8.11 y 96.66 ± 8.12 , respectivamente), mientras que a pH 6 y 8 se encontraron los valores más bajos (17.56 ± 3.10 y 24.51 ± 3.10 , respectivamente). Contrariamente a lo esperado, se observó que a pH 12 (30.40 ± 6.97) se encontró un menor valor de IEE que el obtenido a pH 10 (62.12 ± 7.08). Una emulsión debe mantener constante su área interfacial para conservar su estabilidad.

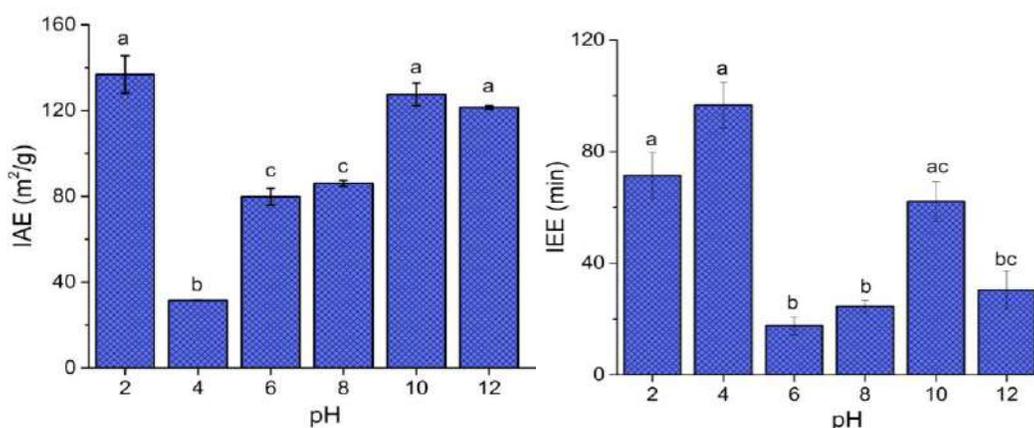


Figura 10. Capacidad emulsificante

Los resultados se expresaron como la media \pm E.E. De tres experimentos independientes. Diferentes letras mayúsculas y minúsculas indican diferencia significativa ($\alpha < 0.05$).

6.1.2.10 Capacidad de retención de agua y aceite

El valor de la capacidad de retención de agua (CRA) es una medida de la cantidad total de agua que se puede absorber por gramo de proteína en polvo, también se ha definido como la capacidad de mantener su propia agua y adicional durante la aplicación de fuerzas, prensado, centrifugación o calentamiento (Zayas, 1997). esta propiedad se basa en la interacción directa de las moléculas proteínas con el agua y otros solutos. Juega un papel importante en la formación de la textura de los alimentos, especialmente en productos cárnicos triturados y masas horneadas, es por eso que las proteínas vegetales son utilizadas como aditivos en

diversos alimentos pues influyen en las características de calidad de los productos alimenticios terminados. La unión del agua a las proteínas se relaciona con los grupos hidrofílicos polares, tales como los grupos imino, amino, carboxilo, hidroxilo, carbonilo y sulfhidrilo. Las proteínas que contienen numerosos aminoácidos cargados tienden a unirse a grandes cantidades de agua. El CPF presentó un valor de CRA DE 117.5 ± 1.6 g/100 g. Este valor es considerado bajo en comparación con los valores reportados para otros concentrados proteicos de otras leguminosas como el garbanzo (230 g/100 g) y lenteja (390 g/100 g)(Toews and Wang, 2013). Los procedimientos experimentales, que incluyen cómo se prepara una muestra, diferentes estructuras de proteínas y la presencia de diferentes hidratos de carbono hidrófilos también pueden ser responsables de las variaciones en las propiedades de hidratación de las proteínas (Fuhrmeister and Meuser, 2003; Obatolu et al., 2006; Withana-Gamage et al., 2011).

La capacidad de retención de grasa (CRG) es una medida de la cantidad de aceite absorbido por peso de proteína en polvo. Esta propiedad es útil en la retención y textura de grasas y sabores. El alto contenido de aminoácidos no polares o hidrófobos en proteínas de origen vegetal es importante para que se unan a cadenas hidrocarbonadas, lo que explica su alto valor de CRG (Aryee et al., 2018). El CPF presentó un valor de 95.3 ± 6.9 g/100 g, este resultado es menor a lo reportado para otros concentrados proteicos (Toews and Wang, 2013), esto puede deberse a que se ha reportado un bajo valor en CRG en aislados proteicos ricos en globulinas debido a que la estructura globular limita la interacción con la fase lipídica en comparación con la estructura más abierta (Mundi and Aluko, 2012).

7.2 Desarrollo y caracterización de nanofibras electroestiradas de proteína de chícharo utilizando pululano como acarreador

7.2.1 Contenido proteico y distribución de tamaños

La Figura 11 muestra los perfiles electroforéticos de APCH en condiciones no reductoras y reductoras donde se observa la presencia de 9 y 11 bandas con pesos moleculares que van de 12 a 97 kDa correspondientes a lipoxigenasa (97 kDa), faseolina (43, 53 kDa), arcelina-4 (29 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa), Inhibidor de α amilasa (18 kDa) (Mojica and de Mejía, 2015), mientras que el APCH, presentó bandas correspondientes a pesos moleculares de 15 a 97 kDa, que de acuerdo con lo reportado por Liang & Tang, (2013) corresponden a lipoxigenasa (97 kDa), convicilina (70 kDa), α -Legumina (38-40 kDa), β -Legumina (19-22 kDa). Los aislados proteicos presentaron perfiles electroforéticos similares a los reportados en la literatura (Liang and Tang, 2013; Mojica and de Mejía, 2015). APCH presentó un valor cercano al reportado por el fabricante ($85\pm 1\%$).

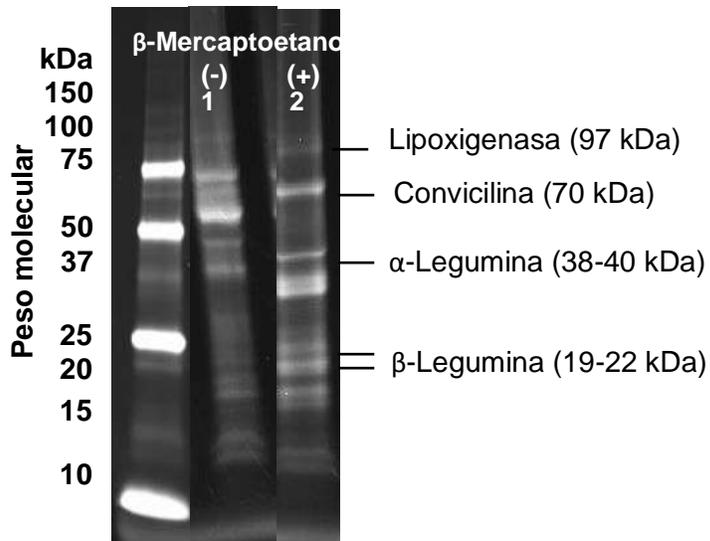


Figura 11. Perfiles electroforéticos de aislados proteicos en condiciones no reductoras y reductoras de APCH

7.2.2 Estudio de la solubilidad de APCH

El diseño 3³ (Tabla 7.) mostró que conforme aumentan el pH y la temperatura de calentamiento se favorece la solubilidad del APCH, mientras que a valores de pH ácido (pH=2) las soluciones tienden a gelificarse, condición no favorable (Figura 12). La solución al 13% (p/p), pH=12, temperatura=95 °C fue seleccionada para continuar los estudios de electroestirado, pues ha sido reportado que *soluciones con pH>11 producen nanofibras con menor número de defectos (Bhardwaj and Kundu, 2010; Cho et al., 2010) y concentraciones entre 11 y 20% favorecen el electroestirado (Cho et al., 2010; Aceituno-Medina et al., 2013b). Esta solución presentó un valor de conductividad de 11.81 ± 0.85 mS/cm y un valor de viscosidad de 0.031 Pa.s, resultados similares se obtuvieron con soluciones proteicas de soya (Cho et al., 2010; Wang et al., 2013). Para posteriores referencias, ésta solución se denominará como PPI.

7.2.3 Electroestirado

Al usar la solución de APCH no hubo formación de fibras (Figura 13), lo cual puede deberse a que el disolvente no es adecuado y las proteínas se encuentran formando agregados lo que evita el electroestirado (Nieuwland *et al.*, 2014), por otra parte, se ha reportado que las soluciones proteicas que son altamente conductoras (tales como SPI solo) tienden a presentar dificultades de electroestirado sin la adición de un acarreador (Cho et al., 2010; Wang et al., 2013). La obtención de estructuras amorfas ha sido reportada previamente para otros sistemas proteicos (amaranto, soya), en donde se sugiere una falta de entrecruzamiento y una baja viscosidad (Cho et al., 2010; Aceituno-Medina et al., 2013b).



Figura 12 Soluciones de APCH (13%, T=95 °C)

Por lo anterior se decidió seguir la ruta A reportada por Nieuwland *et al.*, (2013) donde se explica que cuando se tienen proteínas globulares o agregados (que es

nuestro caso) puede emplearse un acarreador que electroestire y así tendremos la proteína intercalada con el acarreador a lo largo de las fibras.

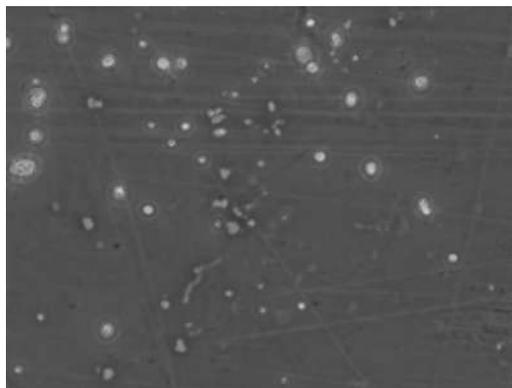


Figura 13. Micrografía óptica (63x) de electroestirado de APCH

7.2.4 Estudio de la adición de polímeros como acarreadores

Como acarreadores fueron empleados PVA y pululano pues han sido reconocidos como seguros para estar en contacto con alimentos y han sido utilizado anteriormente en el desarrollo de fibras proteicas (Aceituno *et al.*, 2016; Cho *et al.*, 2010). Para cada polímero se estudió el electroestirado de tres soluciones acuosas de diferentes concentraciones (5, 10 y 15%) y fue planteado un diseño 2x3x3 donde los factores estudiados fueron las variables del proceso: distancia, voltaje y flujo (Tabla 14).

Tabla 14. Diseño de experimentos para el electroestirado de PVA y pululano

Factor	Nivel bajo	Nivel medio	Nivel alto	Variables de respuesta
Distancia (cm)	10	15	----	Formación de fibras
Voltaje (kV)	10	20	22	
Flujo (ml/h)	0.4	0.7	1	

7.2.5 Alcohol polivinílico PVA

Los resultados obtenidos a partir del electroestirado de las tres soluciones acuosas de PVA mostraron que las concentraciones y condiciones evaluadas favorecieron la llegada de gotas en escala micrométrica en lugar de fibras (Figura 14).

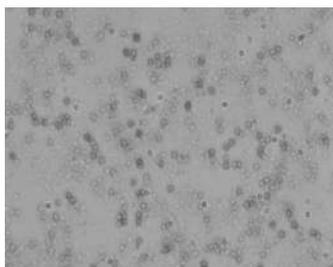


Figura 14. Micrografía óptica (63x) de electroestirado de solución acuosa de PVA

7.2.6 Pululano

Los resultados obtenidos a partir del estudio del electroestirado de las tres soluciones acuosas de pululano mostraron que, de manera general, conforme aumenta la concentración de pululano favorece la formación de fibras (**Figura 15**), lo cual se debe a que se ha alcanzado un entrelazamiento molecular suficiente (Kong and Ziegler, 2014), también se ha reportado que, a baja concentración de la solución, se obtienen fibras con defectos, y conforme la concentración aumenta, la presencia de defectos en las fibras disminuye hasta que son obtenidas fibras uniformes. Para realizar la mezcla con la solución de aislado proteico de chícharo se seleccionó la solución C correspondiente al 15 % de pululano. A esta solución se le referirá posteriormente como PUL.

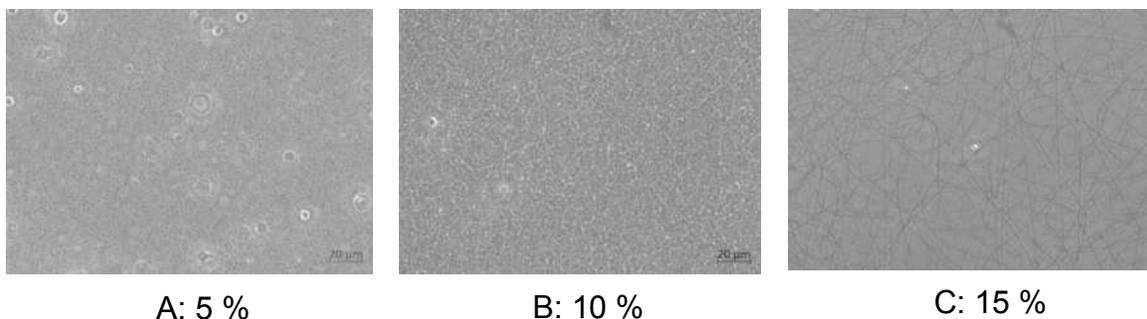


Figura 15. Micrografías ópticas (63x) de electroestirado de tres soluciones acuosas de pululano

7.2.7 Mezclas APCH:PUL

Para evaluar el efecto de la adición de pululano en la formación de fibras fueron preparadas 3 mezclas, esto para conocer qué cantidad mínima y máxima de pululano era requerida para la formación de fibras, las proporciones de APCH y PUL fueron APCH:PUL 20:80 (20% APCH:80% PUL), 50:50 (50% APCH:50% PUL), y 80:20 (80% APCH:20% PUL). Para la preparación se partió de la solución acuosa de APCH (13%, pH 12, temperatura de calentamiento: 95 °C) y de la solución acuosa de pululano (15%), cuando se adicionó el surfactante Tween 80 se adicionó a la nomenclatura T10 (Adición de Tween 80 al 10 % p/p del peso en seco de los biopolímeros en la mezcla) y T20 (Adición de Tween 80 al 20 % p/p del peso en seco de los biopolímeros en la mezcla).

7.2.8 Propiedades de la solución de electroestirado

La **Figura 16A** muestra los valores de conductividad eléctrica de las soluciones de APCH:PUL en ausencia y presencia de tensoactivo. La conductividad eléctrica de la solución APCH100 fue de 10.20 ± 0.70 mS/cm, cerca del valor informado para el aislado de proteína de soya (11.05 mS/cm) (Wang et al., 2013) y superior a los valores de proteína albúmina de huevo (5.75 mS / cm) (Wongsasulak *et al.*, 2010) y aislado de proteína de amaranto (6.82 mS / cm) (Aceituno-Medina, *et al.*, 2013a). Al ser el valor de conductividad eléctrica de la solución de pululano 100% de 0.06 ± 0.00 mS / cm, la conductividad eléctrica de las soluciones de mezcla disminuyó significativamente ($\alpha < 0.05$) a medida que aumenta la cantidad de pululano. Por otro lado, la adición de tensoactivo no iónico a una concentración de 20% en peso disminuyó significativamente ($\alpha < 0.05$) el valor de conductividad eléctrica de 9.15 ± 1.09 a 6.23 ± 0.11 mS/cm y 5.79 ± 0.08 mS/cm a 3.96 ± 0.20 mS/cm en mezclas APCH:Pul 80:20 y 50:50, respectivamente. Se observó un comportamiento similar para el aislado de proteína de amaranto (Aceituno-Medina, *et al.*, 2013b). La disminución del valor de la conductividad eléctrica puede ser benéfico para el proceso pues se ha reportado que una disminución en la conductividad puede mejorar la formación de fibras electroestiradas debido a la modificación de las

cargas estáticas sobre la superficie del hilo en el proceso de electroestirado (Wang et al., 2013).

La viscosidad de la solución es otro parámetro que juega un papel importante en el tamaño y la morfología de la fibra durante el electroestirado (Bhardwaj and Kundu, 2010). La Figura 16B muestra los valores de viscosidad dinámica de las mezclas de APCH:PUL en ausencia y presencia de tensoactivo. El valor de viscosidad de la solución APCH:PUL 100:0 fue el más bajo (0.0319 ± 0.0017 Pa.s), cabe señalar que ésta solución no formó fibras, mientras que el APCH:PUL 0: 100 fue el más alto (0.6023 ± 0.0092 Pa.s). En general, la viscosidad dinámica de las soluciones de mezcla aumentó significativamente ($\alpha = 0,05$) a medida que aumentaba la cantidad de pululano en la mezcla. Para la mezcla de APCH:PUL 80:20, el valor de viscosidad fue igual a APCH:PUL 100: 0, lo que sugiere que en esta relación no se mejoró el entrecruzamiento de las cadenas. Como se esperaba, a medida que la concentración de tensoactivo aumentaba, el valor de viscosidad dinámica disminuyó.

La tensión superficial de la solución juega un papel crítico en el proceso de electroestirado y al reducir este valor, las fibras se pueden obtener sin defectos. La Figura 16B muestra los valores de tensión superficial de las mezclas de APCH:PUL en ausencia y presencia de tensoactivo. APCH:PUL 100: 0 mostró el valor más bajo de tensión superficial (48.00 ± 0.60 mN / m) y APCH:PUL 0:100 el valor más alto (81.20 ± 1.60 mN / m). El contenido de pululano influyó fuertemente en la tensión superficial de las soluciones; el incremento de la cantidad de pululano en la mezcla trajo un incremento significativo ($\alpha = 0.05$) en el valor de tensión superficial. Como se esperaba, la presencia del tensoactivo disminuyó significativamente ($\alpha = 0.05$) el valor de tensión superficial de las soluciones.

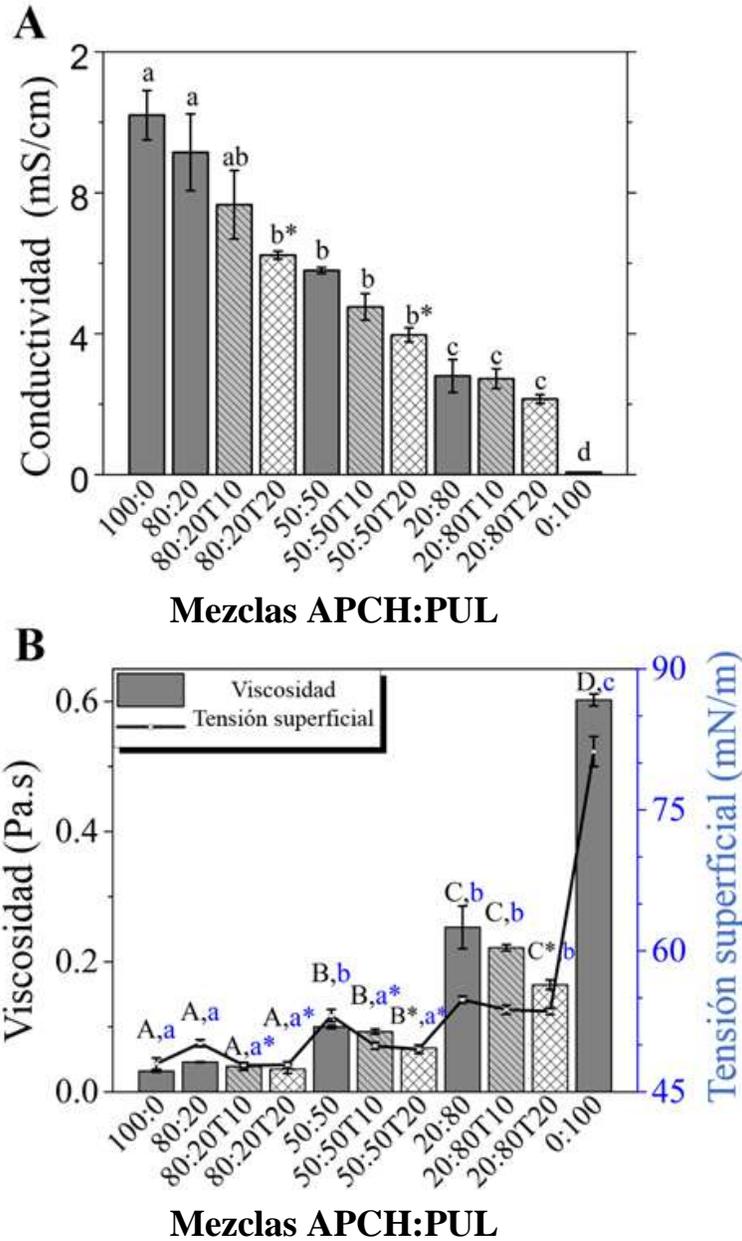


Figura 16. A) Conductividad de las mezclas de proteína de chícharo (APCH) y pululano (PUL) en ausencia y presencia de surfactante. B) Viscosidad y tensión superficial de mezclas de proteína de chícharo (APCH) y pululano (PUL) en ausencia y presencia de surfactante. Los resultados se expresaron como la media \pm E.E. De dos experimentos independientes. Diferentes letras mayúsculas y minúsculas indican una diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) en el valor de viscosidad y los valores de tensión superficial, respectivamente, entre las mezclas. * indica diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) en comparación con la mezcla sin surfactante.

7.2.9 Electroestirado de soluciones poliméricas APCH:PUL

La Tabla 15 resume los resultados de las soluciones poliméricas sometidas al proceso de electroestirado. Mientras que las soluciones 100% APCH bajo las condiciones de estudio no electroestiraron y solo se obtuvieron gotas, las soluciones 100% PUL produjeron fibras en todos los experimentos. Se esperaba este resultado ya que la alta conductividad y la baja viscosidad de la solución de APCH acuosa no favorecen la disposición molecular de la proteína necesaria para ser electroestirada. La formación de agregados proteicos se ha asociado a la falla del proceso de electroestirado de proteínas (Nieuwland *et al.*, 2013). Se reportaron resultados similares para las proteínas de soya y amaranto (Aceituno-Medina *et al.*, 2013b; Cho *et al.*, 2010).

La adición de pululano a las soluciones de APCH facilitó el proceso de electroestirado. En las condiciones estudiadas, en general: las soluciones APCH:Pul 80:20 no electroestiraron a pesar de la adición de surfactante, solo se observaron gotas. Solo la solución con un 20% en peso de Tween 80 a 22 kV, 0.4 ml/hr 15 cm de distancia de la punta de la jeringa a la placa produjeron segmentos cortos de fibras con muchos defectos (Figura 17A). La adición de 20% en peso de Pul a la solución de APCH no cambió significativamente los valores de conductividad y viscosidad.

La adición de 50% en peso de solución de PUL a APCH aumentó la viscosidad y los valores de tensión superficial pero disminuyó el valor de conductividad eléctrica de la solución de APCH, lo que favorece la formación de fibras con defectos. La solución APCH:PUL 50:50 que contiene 20% en peso de Tween 80 en condiciones de operación de los experimentos 1 y 2 produjo fibras, así como fibras con algunas gotas, respectivamente (Figura 17B).

Tabla 15. Resultados del proceso de electroestirado

Experimento	Voltaje (kV)	Flujo (ml/h)	Distancia (cm)	APCH:PUL 50:50 + % Tween 80						APCH:PUL 20:80 + % Tween 80		
				0	10	20	0	10	20	0	10	20
1	15	0.4	10	FD	FD	F	F	FG	F			
2	22	0.4	10	FD	FD	FG	F	FG	FG			
3	15	0.4	15	FD	FD	FG	F	F	F			
4	22	0.4	15	FD	FD	FD	F	FD	F			
5	15	1	10	FD	FD	FD	F	F	F			
6	22	1	10	FD	FD	FD	FG	FG	F			
7	15	1	15	FD	FD	FD	F	F	F			
8	22	1	15	FD	FD	FD	F	F	F			

FD: Fibras con defectos FG: fibras y gotas, F: fibras.

Los surfactantes, particularmente los tipos no iónicos, a menudo se adicionan a soluciones para prevenir y/o minimizar la agregación de proteínas, lo cual favorece el proceso de electroestirado (Ruiz-Peña *et al.*, 2010). La parte hidrófoba de los tensoactivos no iónicos se puede unir a las regiones hidrófobas de las proteínas, lo que naturalmente hace que el tensoactivo se ordene a sí mismo, de modo que se exponen más grupos hidrófilos de la proteína al disolvente. En consecuencia, el complejo tensoactivo: proteína se vuelve más hidrófilo que el agente tensoactivo o la proteína sola, y el aumento efectivo de la solubilidad compleja evita la formación de agregados de orden superior (Randolph & Jones, 2002). Todas las soluciones de APCH:PUL 20:80 fueron exitosamente electroestiradas. Esto puede deberse a la gran cantidad de pululano. La adición de tensoactivo fue perjudicial para el

proceso de electroestirado ya que se produjeron fibras y gotas. Se eligieron con fines de caracterización las fibras obtenidas en el experimento 1 para la mezcla 50:50T20 y el experimento 4 para las mezclas 80:20, 20:80, 0:100.

7.2.10 Caracterización de fibras APCH:PUL

La Figura 17a muestra la imagen SEM de APCH:PUL 80T20, el electroestirado de esta solución dio lugar a fibras con muchos defectos. Las figuras Figura 17b-c presentan las micrografías de fibras electroestiradas de las mezclas APCH-PUL dadas junto con los correspondientes histogramas de distribuciones de diámetro. Las micrografías mostraron que las fibras presentaron forma cilíndrica y que se orientaron aleatoriamente. La porosidad fraccionaria de los mats se refiere al volumen vacío continuo que rodea a las fibras, este valor se se encontró entre 0.49 y 0.51. Además, el incremento de pululano promovió la formación de fibras más lisas con mayores diámetros, los diámetros de fibra de APCH:Pul 50-50T20 (149 ± 50 nm), fueron menores que los de APCH-Pul 20-80 (170 ± 36 nm), esto puede ser debido a sus viscosidades más bajas en comparación con APCH:PUL 0-100 (**Figura 17d**) que presentó el diámetro más alto (280 ± 47 nm).

7.2.11 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (ATR-FTIR)

La espectroscopía FTIR se usó para dilucidar la presencia del aislado proteico de chícharo en las fibras electroestiradas mezcladas con pululano, así como para obtener información sobre cualquier cambio estructural de la proteína en la fibra. El espectro de FTIR es adecuado para estudiar los cambios espectrales causados por las interacciones polímero-polímero comparando las bandas de vibración de los materiales mezclados con las del componente puro. La Figura 18a muestra los espectros FTIR de polvos (a) APCH y g) pululano, además se incluyeron las mezclas físicas para verificar los cambios espectrales producidos después del electroestirado: b) MF50:50 (mezcla física APCH-PUL 50-50), d) MF20:80 Mezcla APCH- PUL 20:80).

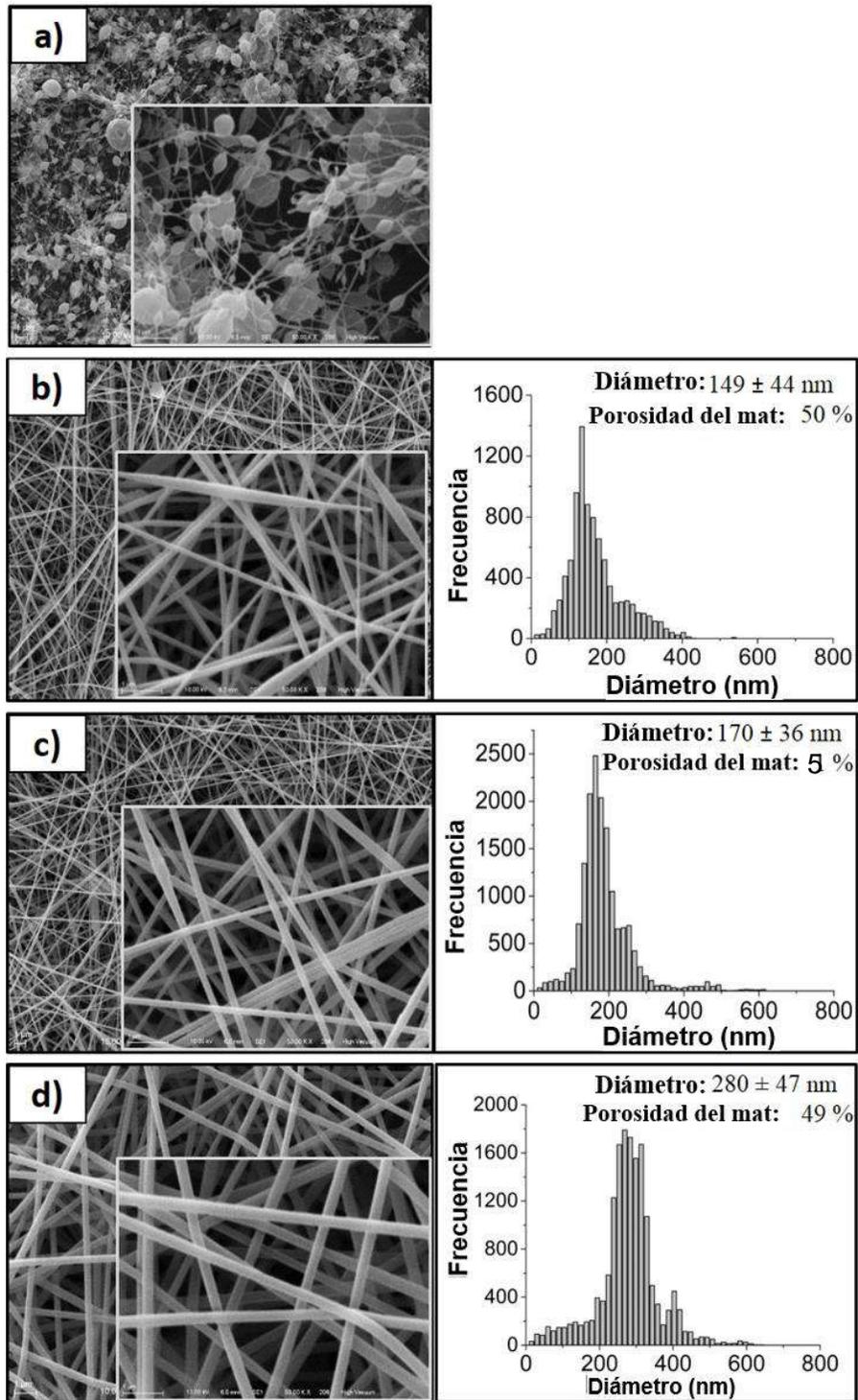


Figura 17. Micrografías electrónicas de barrido y distribución de diámetro de fibras electroestiradas APCH:PUL a) 80:20T20 b) 50:50T20, c) 20:80, d) 0:100

Los espectros de las fibras c) 50:50T20, e) 20:80 y f) 0:100. Las bandas de absorción características del aislado proteico de chícharo en polvo se presentaron en números de onda 3292 cm^{-1} (estiramiento de amida A, NH y OH), 3083 cm^{-1} (amida B, extensión de CH), 1632 cm^{-1} (amida I), 1522 cm^{-1} (amida II, curvatura y estiramiento de CN) y 1238 cm^{-1} (amida III, estiramiento CN y doblado NH).

Para el polvo de pululano, se encontraron bandas características a 924 y 1150 cm^{-1} correspondientes a enlaces glucosídicos (α -1,6) y 752 cm^{-1} correspondientes a enlace glucosídico (α -1,4), también se observó un máximo de absorción situado alrededor de 3331 cm^{-1} al estiramiento de -OH que estaba afectado por los enlaces de hidrógeno intermoleculares o intramoleculares. La banda alrededor de 2923 cm^{-1} correspondía al estiramiento C-H, mientras que la banda situada entre 1200 y 1030 cm^{-1} se asignó a la vibración de estiramiento C-O. Cuando se mezclan dos o más sustancias, las mezclas físicas frente a las interacciones químicas se reflejan mediante cambios en las bandas características.

La banda amida I de la proteína de guisante tuvo un desplazamiento hipsocrómico (desplazamiento a un valor de frecuencia más alta), de 1633 a alrededor de 1650 cm^{-1} cuando se mezcló con pululano en fibras, la banda amida II tuvo un cambio hipsocrómico de 1525 a alrededor de 1548 cm^{-1} cuando se mezcló con pululano en fibras: APCH50, 1544 cm^{-1} , APCH50T20 1548 cm^{-1} , APCH20, 1542 cm^{-1} , resaltando que la muestra que contenía surfactante presentó el mayor cambio. Este resultado indicó que las interacciones estaban presentes entre los grupos hidroxilo de pululano y los grupos amino de la proteína de guisante y que la presencia de Tween 80 favorece estas interacciones (Wu et al., 2013).

Otro cambio importante corresponde a la banda característica del pululano situada a 989 cm^{-1} que se desplazó a 1022 cm^{-1} para la fibra APCH:PUL 50:50T20 y en el caso de las fibras APCH:PUL 50:50 y APCH:PUL 20:80 a 1020 cm^{-1} . Estos desplazamientos de los modos de flexión C-O-H pueden originarse a partir de la asociación del oxígeno en C6 de pululano con el grupo -COOH en ácido aspártico y ácido glutámico y aminas primarias -NH₂ en residuos de lisina y arginina en

proteína de guisante, esto puede ser demostrado por el desplazamiento de la banda del polvo de pululano correspondiente al enlace α -1,6 desde 927 cm^{-1} a 934 cm^{-1} y desde las fibras electrospun. Li *et al.*, (2017) encontraron resultados similares para fibras electroestiradas de pululano a partir de soluciones de sales. También se observó la reducción de la absorbancia en las bandas presentes a 927 y 752 cm^{-1} , correspondiente a las vibraciones de los enlaces glicosídicos (α -1,6 y α -1,4), lo que indica que cuando se produce la formación de la mezcla APCH:PUL la molécula de pululano está experimentando cambios en su estructura química. Es importante señalar que no hubo desplazamientos en las bandas características en las mezclas físicas.

En la región entre 3500 y 3000 cm^{-1} se observó que cuando la cantidad de pululano aumenta en las mezclas, se obtiene un máximo de absorción más amplio, que corresponde a la vibración de estiramiento de los grupos hidroxilo (-OH) resultante de la presencia de Grupos -OH del pululano y grupos -OH y -COOH en proteínas. Estos grupos son capaces de formar fuertes puentes de hidrógeno intra e intermoleculares en la proteína de guisante y pululano, así como con los grupos amino en la proteína (Lubasova *et al.*, 2015; Salas, Ago, Lucia & Rojas, 2014).

7.2.12 Difracción de rayos X y calorimetría diferencial de barrido (CDB)

La Figura 19A ilustra los patrones de DRX de las fibras APCH:PUL 50:50, 50:50T20 y 20:80, se observó en las tres mezclas un pico ancho amorfo típico en el ángulo de difracción 2θ alrededor de 18° . La adición de Tween-80 tuvo poco impacto sobre la estructura cristalina de la proteína de chícharo. Resultados similares fueron reportados en fibras basadas en zeína y gelatina (Shuiping Liu, Su, & Chen, 2011; Neo *et al.*, 2013). De acuerdo con Wu *et al.*, (2013) reportaron que el patrón de pululano presenta un pico muy débil alrededor de $2\theta = 13.4^\circ$, lo que indica que el pululano es un material amorfo. Por consiguiente, los patrones de difracción de rayos X de las fibras se presentaron como simples patrones

mixtos de proteína de guisante y pululano con la misma proporción que los de mezcla. Esto podría explicarse por la fuerte interacción entre la proteína de guisante y pululano. Los resultados de la difracción de rayos X reforzaron la existencia de una buena compatibilidad entre la proteína de guisante y pululano debido a las fuertes interacciones de enlaces de hidrógeno.

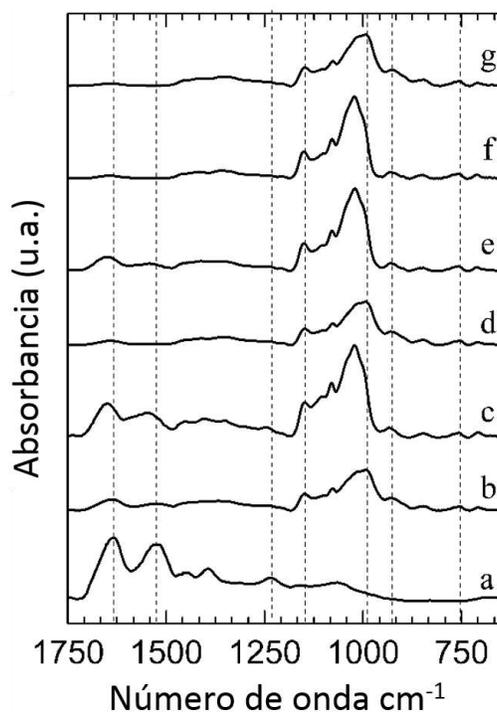


Figura 18. Espectros de absorbancia ATR-FTIR para materias primas y fibras electroestiradas APCH-Pululano a) Polvo de APCH, b) mezcla física 50, c) fibra 50:50T20, d) mezcla física 20:80, e) fibra 20:80, f) fibra 0:100 y g) pululano en polvo

La Figura 19B muestra los termogramas de calorimetría diferencial de barrido de polvos de a) proteína de chícharo y b) pululano así como de fibras electroestiradas APCH:PUL c) 20:80, d) 50:50 y e) 50:50T20. El aislado proteico de chícharo antes de ser electroestirado presentó una menor temperatura de fusión ($T_m = 92^\circ \text{C}$) que las muestras de fibras. La fibra 20:80 presentó un valor de T_m inferior que la fibra 50:50 esto puede deberse al alto contenido de pululano pues se ha reportado que las macromoléculas de pululano muestran una ligera degradación durante el

electroestirado que podría atribuirse a las interacciones entre la tensión superficial y la fuerza electrostática construida por el alto voltaje (Li et al., 2017), ocasionando así un menor valor de T_m respecto al pululano en polvo. Finalmente la fibra 50:50T20 presentó el mayor valor de T_m , este resultado indica que el tensoactivo no iónico influyó en el comportamiento térmico de las fibras. Los análisis de XRD y DSC confirmaron la estructura amorfa de las fibras, resultados similares se han reportado para fibras electroestiradas basadas en gelatina y zeína (Ki et al., 2005; Neo et al., 2013).

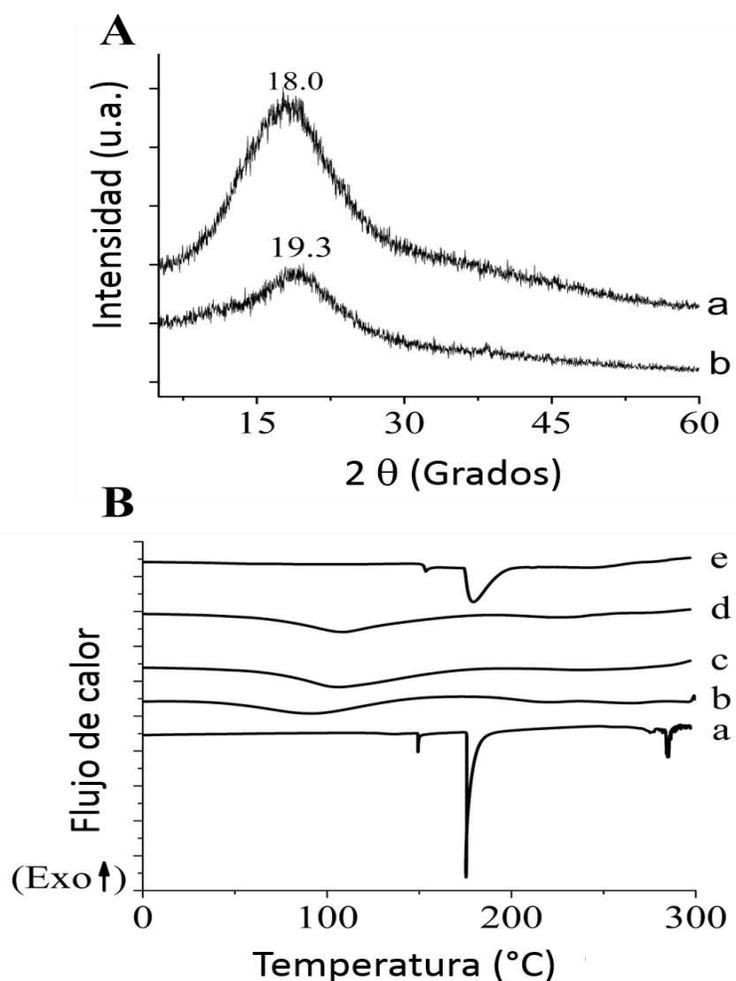


Figura 19. A) Patrones de difracción de rayos X de fibras electroestiradas APCH-PUL a) 20:80 b) 50:50T20. B) curvas DSC de materias primas (a: polvo de pululano, b: APCH polvo) y fibras electroestiradas APCH: PUL (c: 20:80, d: 50:50 y e: 50:50T20).

7.2.13 Propiedades mecánicas

La Tabla 16 resume las propiedades mecánicas de las fibras electroestiradas y la Figura 20 muestra las curvas de esfuerzo-deformación representativas. Las muestras revelaron que a medida que disminuyó el contenido de proteína y aumentó la de pululano el módulo de Young (E) y la deformación máxima al romperse (ϵ) aumentaron significativamente ($\alpha < 0,05$), el aumento de las propiedades mecánicas de las fibras se ha asociado con la orientación de macro moléculas presentes en las estructuras supramoleculares de la fase amorfa. Un comportamiento similar ha sido reportado para otras proteínas vegetales como soya mezclada con alcohol polivinílico (PVA) (Cho, Netravali, & Joo, 2012) y kafirina mezclada con ácido poliláctico (PLA) (Xiao *et al.*, 2016), sin embargo, en estos estudios la elasticidad de las fibras disminuyó conforme aumentó el contenido de proteínas.

Tabla 16. Propiedades mecánicas de fibras electroestiradas

Muestra	Grosor (mm)	Ancho (mm)	Área (mm ²)	Módulo de Young (E) (MPa)	Max. esfuerzo hasta la ruptura (σ) (MPa)	Max. deformación hasta la ruptura (ϵ) (%)
50:50T20	1.49±0.36	5.51±0.21	8.15±1.72	0.24±0.20 ^a	0.19±0.01 ^a	22.28±1.87 ^a
20:80	1.43±0.14	5.03±0.33	7.22±1.00	1.60±0.35 ^b	0.58±0.23 ^b	42.71±2.60 ^b
0:100	1.56±0.05	5.22±1.00	7.69±0.46	4.34±0.73 ^c	1.18±0.18 ^c	57.74±4.61 ^c

Resultados expresados como la media \pm D.E, de 4 especímenes. Diferentes letras en la misma columna indican diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) entre mezclas usando la prueba de Tukey.

Estos resultados son indicativos de que la fibra PP50T20 fue la más elástica y a la vez la más frágil, sin embargo, esta mezcla presentó mejores características mecánicas que fibras electroestiradas a base de soya-PVA (50:50) donde se

encontró que fue muy frágil lo cual impidió que la resistencia fuera medida (Cho *et al.*, 2012).

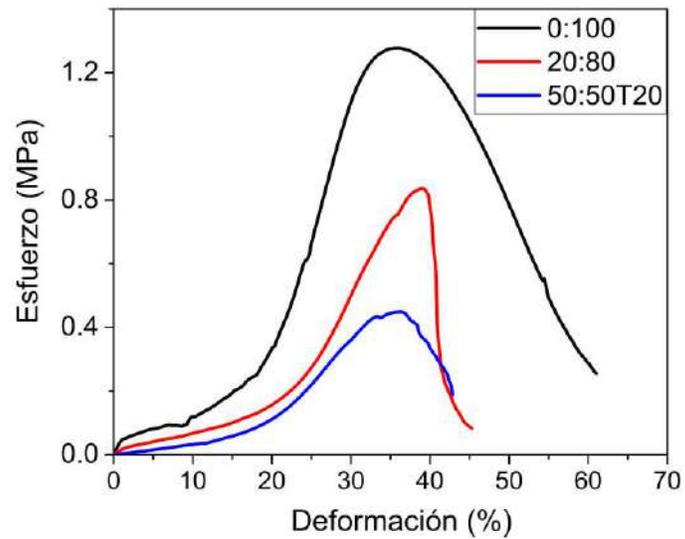


Figura 20. Curvas de esfuerzo-deformación representativas de fibras electroestiradas APCH:PUL.

7.3 Búsqueda del solvente ideal para desarrollar fibras electroestiradas a partir de los aislados proteicos de frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) y chícharo (*Pisum sativum*)

7.3.1 Solubilidad

La elección del disolvente juega un papel vital en los procesos de electroestirado ya que las propiedades de la solución (por ejemplo, concentración, viscosidad, velocidad de evaporación) afectan fuertemente a la formación de fibras, además son necesarias soluciones homogéneas y materiales completamente disueltos. En la Figura 21 se presentan las imágenes correspondientes a las soluciones, puede observarse que los colores de las soluciones cambiaron de un solvente a otro. TFA y FA fue el que presentó un color más oscuro. Los resultados de la evaluación de solubilidad se presentan en la Tabla 17, así como las propiedades de los solventes empleados.

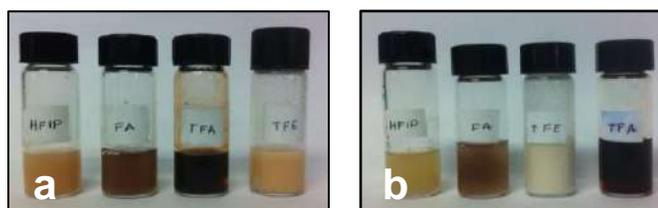


Figura 21. Soluciones proteicas de a) APCH y b) CPF en los diferentes solventes empleados

Los aislados proteicos fueron completamente disueltos en AF, HFIP, TFA, los cuales se encuentran clasificados como solventes próticos y presentan un poder ionizante fuerte y a su vez la formación de enlaces de hidrógeno fuertes (Morrison & Boyd, 1987). Empleando agua como solvente se encontró que el 95 % de los aislados proteicos se solubilizó y no se observó separación de fases, sin embargo, empleando ácido acético sí se observó ligera separación de fases, por lo que esta solución fue descartada para los consecuentes estudios. A continuación se presentan los resultados correspondientes a los solventes: agua, HFIP y TFE.

Tabla 17. Propiedades de solventes seleccionados para el electroestirado de APCH y CPF

Solvente	PM	Punto de ebullición (°C)	ϵ a 20°C	Dipolo	Conductividad eléctrica a 25 °C (S/m)	Tensión superficial a 20 °C (mN/m)	Viscosidad a 25 °C (mPa.s)	Presión de vapor atm. A 25 °C	Referencia
Ácido acético	60	118	6.2	1.7	6×10^{-7}	24.7	1.13	-----	(National Center for Biotechnology Information)
Ácido fórmico	46	100.8	58.5	1.41	6.4	37.67	1.78 (20 °C)	-----	(National Center for Biotechnology Information)
Agua	18	100	79.7	1.87	5.5×10^{-6}	72.75	0.89	-----	(Water, CID=962)
HFIP	168	58.2		2.05	-----	16.4	1.021	0.158	(National Center for Biotechnology Information. Database.)
TFE	100	78	8.55	2.52	-----	21.11	1.73	0.068	(National Center for Biotechnology Information)

TFA	114.023	72.4	8.55	2.26	-----	-----	0.93	0.128	(Database.)
-----	---------	------	------	------	-------	-------	------	-------	-------------

7.3.2 Viscosidad de soluciones de aislados proteicos en diferentes solventes

En la Figura 22 se presentan las curvas de flujo de las soluciones proteicas, éstas curvas representan efecto de la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) (s^{-1}) sobre el valor de esfuerzo de corte (τ) (Pa), se observó que todas las soluciones tuvieron un comportamiento pseudoplástico, este comportamiento se caracteriza por presentar una disminución en el valor del esfuerzo de corte conforme aumenta la velocidad de deformación. Se observó que empleando agua y TFE como solventes se observó que APCH presentó mayores valores de esfuerzo de corte que CPF, mientras que en HFIP se observó un comportamiento opuesto. En el proceso de electroestirado diversas soluciones basadas en mezclas de biopolímeros y polímeros como quitosano-PEO (Kriegel et al., 2009), acetato de celulosa-albúmina de huevo (Wongsasulak et al., 2010), aislado proteico de soya-PVA (Zhang et al., 1999), entre otras, han presentado este comportamiento.

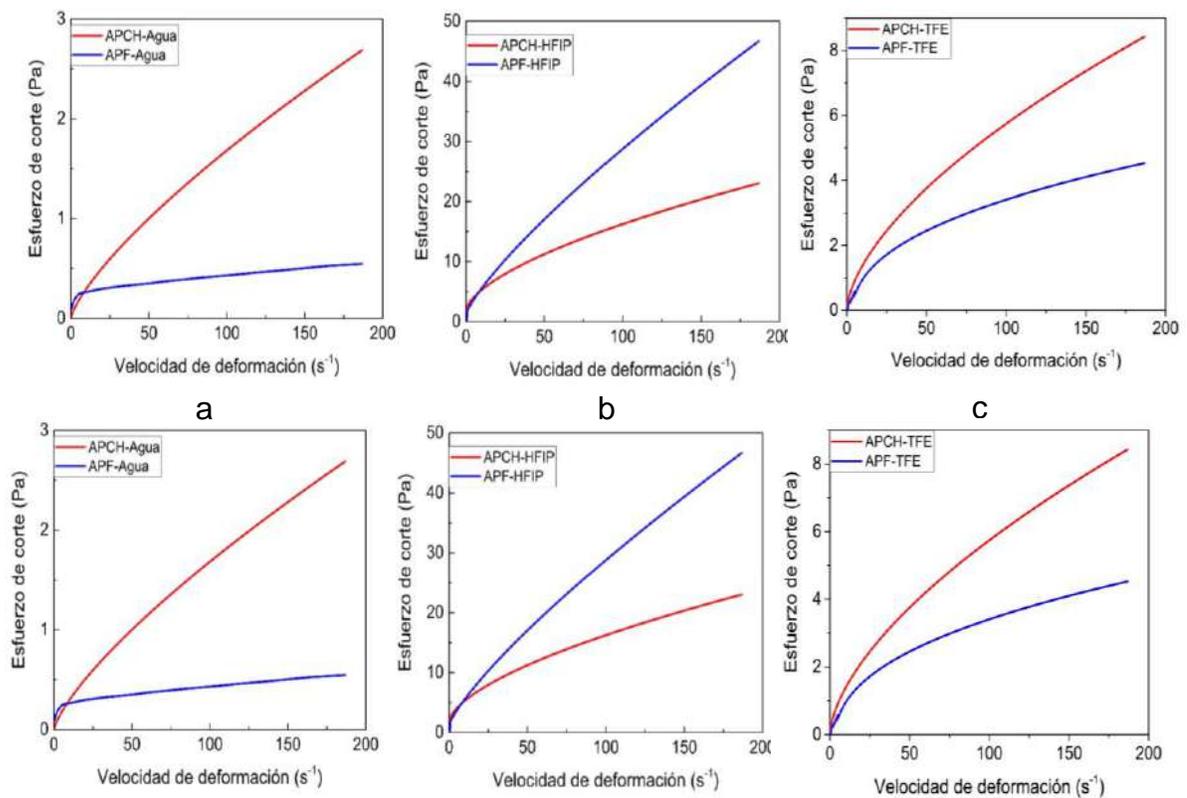


Figura 22. Curvas de flujo de APCH y CPF a) Agua, b) HFIP y c) TFE

Para el cálculo del valor de viscosidad aparente se graficó el logaritmo de la velocidad de deformación contra el logaritmo de esfuerzo de corte, y a partir de la recta obtenida se realizó una regresión lineal para conocer el valor de la pendiente, dicho resultado corresponde al valor de la viscosidad aparente (η). Los resultados se encuentran en la Tabla 18 se observó que la muestra de APCH presentó una mayor viscosidad que CPF cuando se utilizó como solvente agua y TFE, mientras que CPF presentó mayor viscosidad en HFIP.

Tabla 18. Valores de viscosidad aparente de las soluciones proteicas

Muestra	Solvente	η	R^2
		(Pa.s) ($\dot{\gamma} = 100 \text{ s}^{-1}$)	
APCH	AGUA	0.749 ± 0.000^A	0.999
CPF		$0.236 \pm 0.006^{a*}$	0.968
APCH	HFIP	0.481 ± 0.002^B	0.982
CPF		$0.716 \pm 0.002^{b*}$	0.989
APCH	TFE	0.610 ± 0.000^C	0.999
CPF		$0.594 \pm 0.003^{c*}$	0.975
APCH	FA	0.622 ± 0.016	0.959
CPF		0.840 ± 0.033	0.919

Los resultados se expresan como la media \pm E.E. De dos experimentos independientes. Diferentes letras mayúsculas y minúsculas indican diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) en el valor de viscosidad en los diferentes solventes. *indica diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) entre aislados proteicos usando la prueba de Tukey.

El modelo de Ostwald – de Waele, también conocido como ley de potencia (Ec. 7.2), es un modelo de dos parámetros K (índice de consistencia) y n (índice de comportamiento de flujo). Para $n=1$, el modelo representa el comportamiento newtoniano, con $\eta \neq K$ representa la desviación del comportamiento newtoniano. Para $n > 1$, el modelo sigue un comportamiento dilatante, mientras que $n < 1$ indica un comportamiento pseudoplástico.

$$\tau = K \dot{\gamma}^{n-1}$$

Ec. 7.2

Donde

τ : es el esfuerzo de corte (Pa)

$\dot{\gamma}$: velocidad de deformación (s^{-1})

K: coeficiente de consistencia de flujo

n: índice de comportamiento de flujo

El valor del exponente n es un indicador del grado de desviación del comportamiento de un fluido respecto al newtoniano. La solución de CPF en HFIP fue la que presentó el mayor valor de n más alto, lo que nos indica que fue la solución más cercana al comportamiento de flujo newtoniano y que CPF en agua fue la más lejana (Tabla 19). En cuanto a los valores de K, estos describen la reducción de la viscosidad con el aumento de la velocidad de deformación. Los resultados mostraron la solución de APCH en agua fue la que presentó una menor viscosidad con el incremento de la velocidad de deformación y las soluciones de aislados proteicos empleando HFIP fueron las que presentaron una mayor reducción de viscosidad con el aumento de la velocidad de deformación, esto nos indica que las moléculas de los aislados proteicos en este solvente se ordenan más fácilmente que en los otros dos solventes estudiados.

Tabla 19. Valores de K: coeficiente de consistencia del material, n: índice de comportamiento de flujo y coeficiente de determinación.

Muestra	Solvente	K (Pa.s)	n	R ²
APCH	AGUA	0.053	0.750	0.999
CPF		0.149	0.236	0.979
APCH	HFIP	1.441	0.528	0.998
CPF		0.878	0.758	0.999
APCH	TFE	0.340	0.613	0.999
CPF		0.358	0.489	0.997
APCH	AF	1.053	0.523	0.999
CPF		0.019	0.881	0.997

7.3.3 Dicroísmo circular UV lejano

El dicroísmo circular es una técnica de espectroscopía de absorción electrónica, basada en el cambio de configuración electrónica molecular de un estado fundamental a un estado excitado, debido a la absorción de radiación electromagnética polarizada. Una ventaja de la técnica de dicroísmo circular en los estudios de proteínas es que la información estructural complementaria se puede obtener de varias regiones espectrales. En las proteínas, los cromóforos de interés incluyen el enlace peptídico (absorción por debajo de 240 nm), las cadenas laterales de aminoácidos aromáticos (absorción en el intervalo de 260 a 320 nm) y los enlaces disulfuro (bandas débiles de absorción ancha centradas alrededor de 260 nm) (Douglas, 1990). En la Figura 23a se presentan los espectros de dicroísmo circular de APCH y CPF empleando agua como solvente, se observó el dominio de un pico negativo aproximadamente en 230 y 236 nm y un hombro ancho que se extiende desde 235 hasta aproximadamente 260 nm en APCH y de 238 hasta aproximadamente 262 nm en CPF, estos resultados pueden ser indicativos de que los giros β tipo 2 son los predominantes en los dos aislados proteicos.

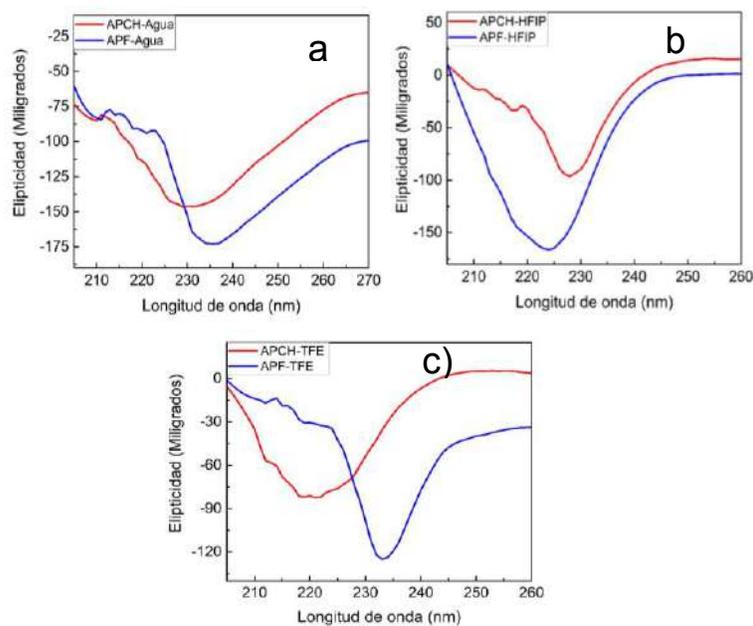


Figura 23. Dicroísmo circular de soluciones proteicas de APCH y CPF a) agua, b) HFIP y c) TFE

Cuando se empleó HFIP, APCH (Figura 23b) presentó una banda negativa en 228 nm y un hombro desde 232 hasta 241 nm, CPF presentó una banda negativa más ancha situada en 224 nm y un hombro desde cerca de 228 hasta 238 nm. Esto puede ser indicativo de que el HFIP promovió la presencia de giros β tipo I en APCH y en CPF la de hojas β (Sreerama & Woody, 2000). Empleando TFE como solvente (Figura 23c) se observó en APCH una banda negativa a 219 nm y un hombro que va desde 228 a 239 mientras que en CPF se tuvo un una banda negativa en 233 nm y un hombro que va desde 237 a 243 nm aproximadamente, estos resultados indican que en APCH se detectó la presencia de hojas β y en CPF la de giros β tipo II (Woody, 1969).

Es importante resaltar que existe un número reducido de estudios sobre dicroísmo circular de aislados proteicos, la mayoría se enfoca en el estudio de proteínas específicas. Uno de los pocos trabajos encontrados fue el realizado por Yin *et al.*, (2011) donde estudiaron el dicroísmo circular de faseolina y aislado proteico completo de frijol arriñonado empleando diferentes valores de pH, se reportó una banda negativa a 215 nm y atribuyeron que tales características del espectro fueron indicadores suficientes de una estructura altamente ordenada, que incluye α -hélices y los giros β (Zirwer *et al.*, 1985).

7.3.4 Dicroísmo circular UV cercano

Las conformaciones terciaria y cuaternaria del aislado proteico se analizaron mediante la técnica espectroscópica de dicroísmo circular UV-cercano (Figura 24). Los espectros de dicroísmo circular en la región 250-320 nm surgen de los aminoácidos aromáticos. Triptófano (Trp) muestra una banda positiva en 290 nm con una estructura fina entre 290 y 305 nm; tirosina (Tyr) una banda positiva entre 275 y 282 nm, con un hombro en longitudes de onda más largas; fenilalanina (Phe) muestra bandas más débiles pero más nítidas con una estructura fina entre 255 y 270 nm (Kelly *et al.*, 2005). La forma y la magnitud reales del espectro de dicroísmo circular UV-cercano dependerán del número de cada tipo de aminoácido

aromático, su movilidad, la naturaleza de su entorno (enlaces H, grupos polares y polarizabilidad), así como su disposición espacial en la proteína (Douglas, 1990).

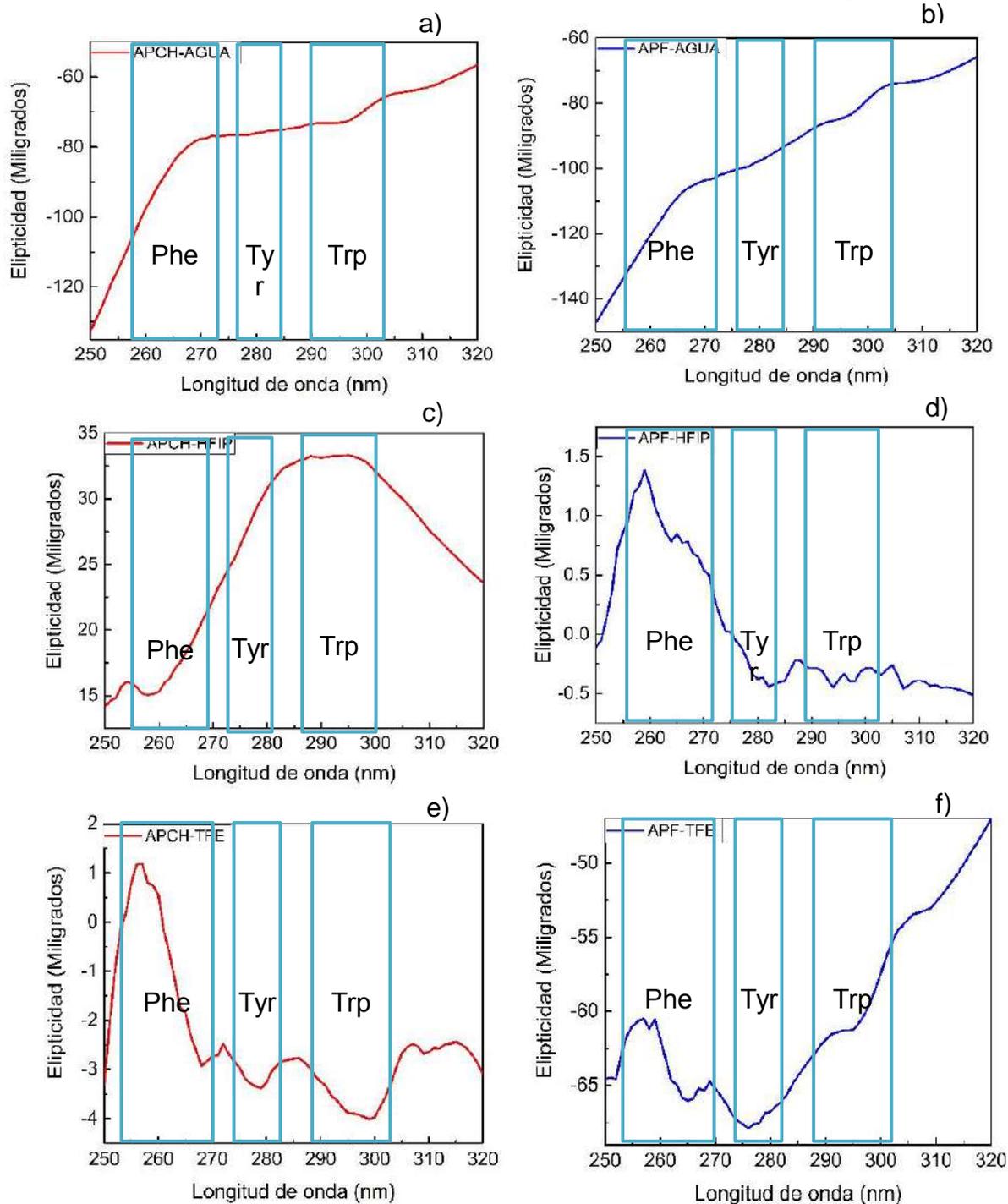


Figura 24. Espectros de dicroísmo circular UV-cercano de los aislados proteicos en los diferentes solventes: a) APCH-Agua, b) CPF-Agua, C) APCH-HFIP, D) CPF-HFIP, e) APCH-TFE y f) APCH-TFE.

Los espectros de dicroísmo circular UV-cercano de APCH y CPF en agua presentaron gran similitud (Figura 24), consistieron en una banda dicroica positiva prominente con la presencia de pequeños hombros situados aproximadamente en 268 y 270 nm, respectivamente, claramente atribuidas a residuos de fenilalanina, otro pequeño hombro se encontró aproximadamente en 298 nm que puede ser atribuido a triptófano.

Los espectros de DC de APCH y CPF usando HFIP (Figura 7.20c-d) como solvente, fueron muy diferentes entre sí, APCH presentó un banda pequeña situada en 255 nm atribuida a Phe y una banda muy prominente desde 260 hasta más allá de 320 nm, teniendo un máximo en 290 nm, mientras que CPF presentó una banda prominente en 262 nm correspondiente a Phe, también se observó un mínimo de absorción en la región correspondiente a Tyr y una pequeña banda situada en la región de Trp.

Cuando se empleó TFE se observó que los espectros de DC de APCH y CPF también presentaron diferencias entre sí. El espectro de APCH consistió en una banda prominente situada en 258 nm, seguida de una banda de menor intensidad en la región de Tyr (285 nm), también se observó la presencia de un hombro situado en 305 nm correspondiente a Trp. En el caso de CPF se observó la presencia de una banda situada en 257 nm correspondiente a Phe y la presencia de un hombro en la región de 295 a 303 nm correspondiente a Trp. Los aislados proteicos presentaron diferentes espectros de dicroísmo circular entre sí, así como en los diferentes solventes empleados, estas diferencias nos indican que existieron diferencias sustanciales en la disposición/proximidad y exposición de aminoácidos aromáticos en las superficies de las proteínas.

7.3.5 Electroestirado

En la Tabla 20 se presentan los resultados del diseño de experimentos empleado para el estudio del efecto de las variables del proceso en la formación de fibras. El electroestirado de soluciones acuosas resultó sólo en la llegada de gotas. Cuando se utilizó HFIP como solvente de APCH y CPF se observó que el electroestirado

de la solución produjo en la mayoría de los experimentos cápsulas, fibras cortas y fibras defectuosas, estos resultados pueden ser atribuidos tanto a la conformación proteica en solución como a la viscosidad, debido a que posiblemente las conformaciones de giros β y hojas β presentes en las soluciones de APCH y CPF, respectivamente, estén disminuyendo la flexibilidad necesaria de las cadenas proteicas para poder ser electroestiradas, además el alto valor de viscosidad es indicativo de que hay un alto entrelazamiento entre las cadenas proteicas (Figura 25a-b). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Nuansing et al., (2013), donde se menciona que el electroestirado de albúmina no fue posible debido a que en HFIP se tuvo una mezcla entre hélices α y hojas β .

Tabla 20. Resultados de electroestirado

Exp.	Flujo (ml/h)	Distancia (cm)	Voltaje (kV)	Agua		HFIP		TFE	
				APCH	CPF	APCH	CPF	APCH	CPF
1	0.2	10	15	G	G	C+F	C	C	C
2	0.2	10	22	G	G	C+FC	C	C	C
3	0.4	10	15	G	G	C+FC	C+FC	C+G	C
4	0.4	10	22	G	G	C+FC	C+FC	C+G	C+G
5	0.2	15	15	G	G	C+F	C	C	C
6	0.2	15	22	G	G	C+FC	C+F	C+F	C
7	0.4	15	15	G	G	C+FD	C	C	C
8	0.4	15	22	G	G	C+FC	C+FC	C	C

C: cápsulas, F: fibras, FC: fibras cortas, FD: fibras defectuosas

El electroestirado de las soluciones empleando TFE produjo en su mayoría cápsulas en los dos aislados proteicos, lo anterior puede ser atribuido a la presencia de conformación de hojas β en APCH y giros β en CPF (Figura 25c-d). Por otra parte, no se observó un efecto muy claro de las variables del proceso de electroestirado en la formación de fibras.

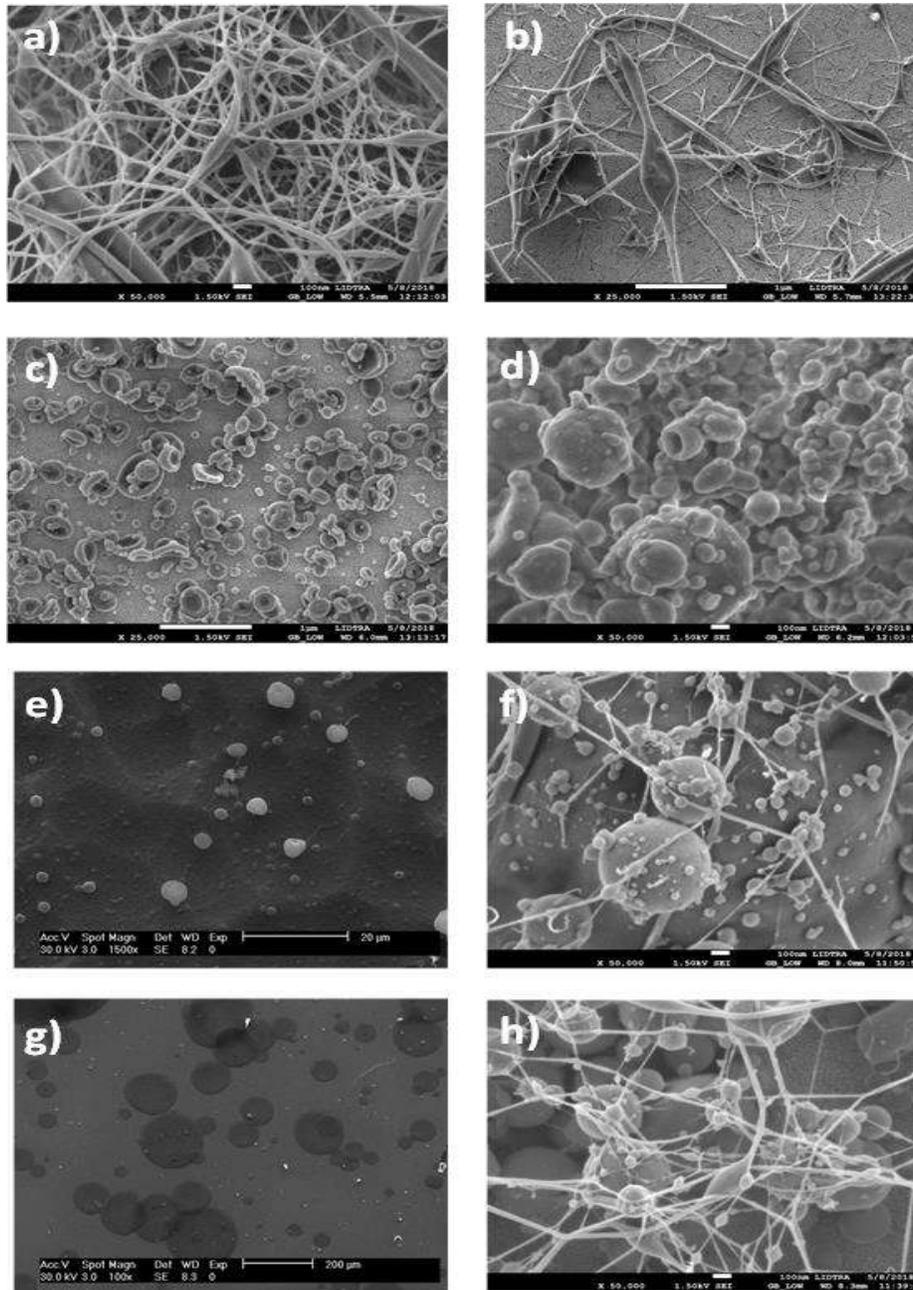


Figura 25. Imágenes SEM de muestras electroestiradas. a) APCH HFIP (0.4 mL / h, 15 kV y 15 cm de distancia), b) CPF HFIP (0.4 mL / h, 15 kV, 10 cm), c) APCH TFE (0.4 mL / h) , 15 kV, 15 cm), d) CPF TFE (0.4 ml / h, 15 kV, 10 cm), e) APCH TFA (0,4 ml / h, 22 kV, 10 cm), f) CPF TFA (0.4 ml / h, 15 kV, 15 cm), g) APCH FA (0.2 ml / h, 22 kV, 10 cm) y h) CPF FA (0.4 ml / h, 22 kV, 15 cm).

7.4 Obtención y caracterización de geles a partir de concentrado proteico de frijol

7.4.1 Obtención de geles

La gelificación es una de las propiedades funcionales más importantes de las proteínas ya que aporta textura y soporte en los alimentos. Un hecho importante del efecto térmico en las dispersiones de proteínas es que el calentamiento aumenta las interacciones proteína-proteína a una concentración relativamente alta y esto resultó en un aumento de la solidez. Estas interacciones entre las moléculas de proteínas conducen a la agregación, la coagulación o la gelificación, otras fuerzas responsables de estas interacciones incluyen enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, enlaces iónicos, enlaces covalentes y asociaciones hidrofóbicas. Si las interacciones entre las moléculas incluyen pocos enlaces cruzados, los agregados aumentarán en su hidratación y formarán dispersiones fluidas o viscosas. En nuestro caso, los resultados obtenidos a partir del diseño de experimentos 2^3 (Tabla 20) mostraron que tanto el pH como la concentración afectaron el grado de gelificación de CPF (**Tabla 21**), sin embargo, en las condiciones estudiadas a una baja concentración de proteína no hubo la formación de geles, mientras que en una alta sólo fue observada gelificación moderada. La presencia de CaCl_2 no mejoró en gran medida la gelificación.

Tabla 21. Resultados del diseño 2^3 sobre la obtención de geles de CPF

Concentración (%)	pH	Contenido CaCl_2 (mM)	Gelificación
9	2	0	+
9	2	20	+
9	7	0	-
9	7	20	-
14	2	0	+
14	2	20	++
14	7	0	++
14	7	20	++

-: no hubo gelificación, +: Ligera gelificación, ++: moderada gelificación

7.4.2 Medición de propiedades mecánicas

Establecer relaciones entre las propiedades físicas y sensoriales de los alimentos semisólidos es esencial para desarrollar productos personalizados. Las propiedades de deformación a gran escala (relajación de tensión y capacidad de untabilidad) de las muestras se midieron mediante la prueba de capacidad de untabilidad. En la Figura

Figura 26 se presenta una curva típica de untabilidad donde el área bajo la curva positiva (A1) representa la cantidad total de fuerza requerida para realizar el proceso de cizallamiento, los valores más pequeños en esta área indican una capacidad de untabilidad más fácil. La fuerza (N) del pico máximo negativo indica la adhesión de la muestra mientras que el área negativa máxima (A2, N.s) representa el trabajo de adhesión.

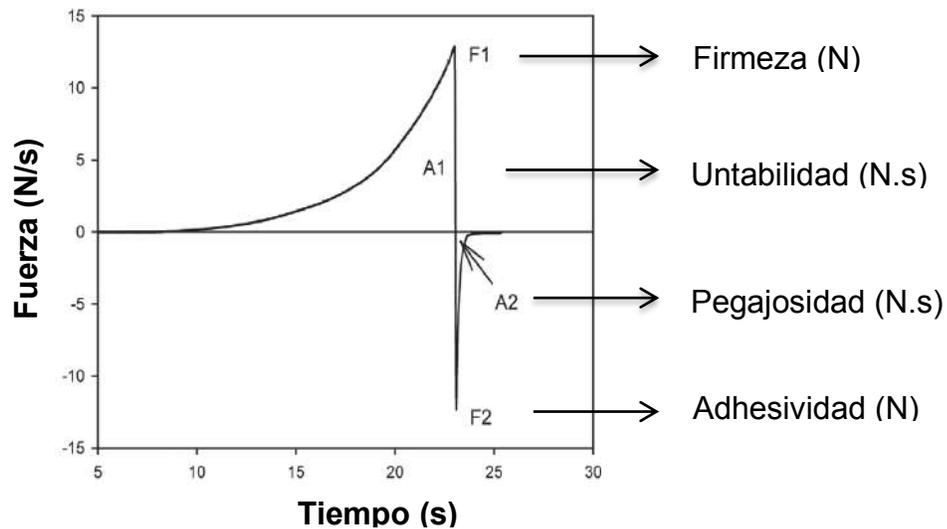


Figura 26. Curva típica de untabilidad (Bayarri et al., 2012)

En la **Tabla 22** se presentan los resultados correspondientes al diseño 2³, se observó que los factores pH y concentración causaron diferencias estadísticamente significativas ($\alpha=0.05$). Cuando se utilizó una baja concentración de proteína (9%) se obtuvieron los valores más bajos de firmeza, untabilidad, adhesividad y pegajosidad, mientras que a una alta concentración se obtuvieron los valores más altos. La adición de CaCl_2 no ocasionó cambios significativos. Los resultados obtenidos mostraron que el gel obtenido con una alta concentración (14 %) y a pH 2 presenta valores similares a lo reportado para quesos untables

comerciales, en cuanto al valor de firmeza han sido reportados valores de 13 N (Bayarri et al., 2012), mientras que nuestro valor obtenido fue de 16.92 ± 0.36 N. El valor de untabilidad de nuestro gel se situó en 17.19 ± 0.24 N/s, mientras que lo reportado es 27.3 y 43 N/s para quesos bajos y altos en grasa, respectivamente, lo cual indica que la untabilidad del gel es más fácil en comparación con el queso. El valor de adhesividad en el gel fue 13.19 ± 1.34 , el cual es muy cercano a lo reportado para quesos altos en grasa (13 N), sin embargo en el valor de pegajosidad (1.58 ± 0.45 N/s) el gel presentó valores menores a lo reportado para quesos altos y bajos en grasa (2-3.6 N/s, respectivamente).

Tabla 22. Resultados de propiedades mecánicas de geles

Concentración (%)	pH	Contenido CaCl ₂ (mM)	Firmeza (N)	Untabilidad (N/s)	Adhesividad (N)	Pegajosidad (N/s)
9	2	0	1.80 ± 0.77	1.75 ± 0.81	1.4 ± 0.69	0.39 ± 0.17
9	2	20	3.99 ± 1.93	3.86 ± 2.17	3.63 ± 2	0.70 ± 0.31
9	7	0	----	----	----	----
9	7	20	2.72 ± 1.04	2.30 ± 0.58	2.64 ± 0.93	0.67 ± 0.14
14	2	0	16.92 ± 0.36	17.19 ± 0.24	13.19 ± 1.34	1.58 ± 0.45
14	2	20	14.37 ± 1.28	15.63 ± 0.18	10.38 ± 0.42	1.26 ± 0.12
14	7	0	7.23 ± 1.86	5.86 ± 1.59	6.73 ± 0.95	1.66 ± 0.28
14	7	20	4.85 ± 0.04	4.08 ± 0.23	4.83 ± 0.13	1.20 ± 0.04

VIII. Conclusiones

Los resultados mostraron que la técnica de aislamiento por punto isoelectrico permitió la obtención de un concentrado proteico de frijol (CPF) con un máximo de 71 % de pureza y éste presentó distribución de pesos moleculares de 18 a 97 kDa. Mediante dicroísmo circular se observó que la conformación predominante fue la de hojas β y que a pH 8 ocurre la desnaturalización de las proteínas presentes en CPF. El CD UV lejano, los análisis de DSC indicaron que las condiciones de pH altamente ácido y alcalino indujeron la pérdida de la conformación secundaria y terciaria del concentrado proteico de frijol común.

En cuanto a la obtención de fibras a partir del aislado proteico de chícharo (APCH) los resultados mostraron que no se obtuvieron fibras a partir de la solución acuosa de APCH debido a la alta conductividad (10.2 mS/cm), así como el bajo valor de viscosidad (0.045 Pa.s). Fue necesaria la adición de pululano como biopolímero acarreador y fueron obtenidas fibras electroestiradas sin defectos conteniendo un 50 % de proteína de chícharo y un 20 % de Tween 80. Se encontró que las interacciones entre los grupos funcionales de la proteína de chícharo (-OH, -CN, -COOH) y pululano (-OH) favorecieron el proceso de electroestirado y estas aumentaron en la presencia de surfactante en una alta concentración (20% p/p).

Los resultados obtenidos a partir del estudio de la formación de fibras a partir del aislado proteico de chícharo y frijol mediante la ruta del uso del solvente ideal, mostraron mediante Dicroísmo Circular que en los solventes estudiados (AF, TFA, TFE, HFIP) no se obtuvo una conformación al azar de las proteínas de APCH ni de CPF. Las soluciones de los dos aislados proteicos en los distintos solventes mostraron un comportamiento pseudoplástico y al ser sometidas al proceso de electroestirado, la morfología de las estructuras resultantes fue diferente para APCH y CPF y para cada solvente utilizado. Usando CPF en HFIP se obtuvieron fibras, sin embargo, el uso de solventes como TFA, FA, TFE y agua, no permitió la obtención de éstas, esto puede atribuirse a la falta de conformación al azar de la

proteína, el comportamiento reológico de las soluciones junto con la amplia heterogeneidad de los sistemas biopoliméricos como APCH y CPF.

La aplicación del concentrado proteico de frijol en la obtención de hidrogeles mostró que no fue posible la obtención de geles firmes a partir de CPF mediante la técnica de gelificación en frío, aún con la adición de CaCl_2 . Los resultados mostraron que los factores que afectaron las propiedades mecánicas de los geles fueron la concentración proteica y el pH. La medición de las propiedades mecánicas mostró que el gel obtenido con una concentración al 14 % y pH 2 tiene potencial para ser utilizado en la obtención de alimentos untables.

En este trabajo se usaron por primera vez las proteínas de frijol común y de chícharo como bases biopoliméricas para la obtención de fibras mediante la técnica de electroestirado, se encontró que su aplicación es compleja debido a sus estructuras secundaria y terciaria, sin embargo, en el caso del APCH se obtuvieron fibras con el uso de un biopolímero acarreador y en el caso de CPF se obtuvieron fibras con el uso de HFIP. En cuanto al uso de CPF en la obtención de hidrogeles se exploró la técnica de gelificación en frío, no obteniendo la formación de geles firmes, sin embargo, se sugiere aumentar su pureza, debido a que un mayor contenido de componentes distintos a las proteínas hace más complejo el sistema.

IX. Bibliografía

- Abaee, A., M. Mohammadian, and S. Mahdi. 2017. Trends in Food Science & Technology Whey and soy protein-based hydrogels and nano-hydrogels as bioactive delivery systems. *Trends Food Sci. Technol.* 70:69–81. doi:10.1016/j.tifs.2017.10.011. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.011>
- Aberkane, L., G. Roudaut, and R. Saurel. 2014. Encapsulation and Oxidative Stability of PUFA-Rich Oil Microencapsulated by Spray Drying Using Pea Protein and Pectin. *Food Bioprocess Technol.* 7:1505–1517. doi:10.1007/s11947-013-1202-9.
- Aceituno-Medina, M., A. Lopez-Rubio, S. Mendoza, and J. M. Lagaron. 2013a. Development of novel ultrathin structures based in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolate through electrospinning. *Food Hydrocoll.* 31:289–298. doi:10.1016/j.foodhyd.2012.11.009. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.009>
- Aceituno-Medina, M., S. Mendoza, J. M. Lagaron, and A. López-Rubio. 2013b. Development and characterization of food-grade electrospun fibers from amaranth protein and pullulan blends. *Food Res. Int.* 54:667–674. doi:10.1016/j.foodres.2013.07.055. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.055>
- Aceituno-Medina, M., S. Mendoza, J. M. Lagaron, and A. López-Rubio. 2015a. Photoprotection of folic acid upon encapsulation in food-grade amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) protein isolate – Pullulan electrospun fibers. *LWT - Food Sci. Technol.* 62:970–975. doi:10.1016/j.lwt.2015.02.025. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643815001280>
- Aceituno-Medina, M., S. Mendoza, B. a. Rodríguez, J. M. Lagaron, and A. López-Rubio. 2015b. Improved antioxidant capacity of quercetin and ferulic acid during in-vitro digestion through encapsulation within food-grade electrospun fibers. *J. Funct. Foods.* 12:332–341. doi:10.1016/j.jff.2014.11.028. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464614003788>
- Aceituno Medina, M. 2011. Desarrollo y caracterización de nanofibras electroestiradas basadas en proteína aislada de amaranto como vehículos para la encapsulación de compuestos antioxidantes. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Adebiyi, A. P., and R. E. Aluko. 2011. Functional properties of protein fractions obtained from commercial yellow field pea (*Pisum sativum* L.) seed protein isolate. *Food Chem.* 128:902–908. doi:10.1016/j.foodchem.2011.03.116. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.116>
- Agarwal, S., A. Greiner, and J. H. Wendorff. 2013. Functional materials by electrospinning of polymers. *Prog. Polym. Sci.* 38:963–991. doi:10.1016/j.progpolymsci.2013.02.001. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.02.001>

- Aghanouri, A., C. F. Shoemaker, and G. Sun. 2015. Characterization of Conformational Structures of Plant Proteins in Solutions. *Ind. Eng. Chem. Res.* 54:188–197. doi:10.1021/ie5032502. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie5032502>
- Aguilar-Vázquez, G., G. Loarca-Piña, J. D. Figueroa-Cárdenas, and S. Mendoza. 2018. Electrospun fibers from blends of pea (*Pisum sativum*) protein and pullulan. *Food Hydrocoll.* 83:173–181. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.04.051.
- Ali, A., and S. Ahmed. 2018. Development of hydrogels from edible polymers.
- Altan, A., Z. Aytac, and T. Uyar. 2018. Carvacrol loaded electrospun fibrous films from zein and poly(lactic acid) for active food packaging. *Food Hydrocoll.* 81:48–59. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.02.028. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.028>
- Anandharamakrishnan, C. 2014. Techniques for Nanoencapsulation of Food Ingredients. (U. Richard W. Hartel (University of Wisconsin—Madison, Associate), J. Peter Clark, and J. W. Finley, editors.). Springer.
- Aryee, A. N. A., D. Agyei, and C. C. Udenigwe. 2018. Impact of processing on the chemistry and functionality of food proteins. Second Edi. Elsevier Ltd. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00003-6>
- Bayarri, S., I. Carbonell, and E. Costell. 2012. Viscoelasticity and texture of spreadable cheeses with different fat contents at refrigeration and room temperatures. *J. Dairy Sci.* 95:6926–6936. doi:10.3168/jds.2012-5711. Available from: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5711>
- Beldarraín, A. 2001. Aplicaciones de la calorimetría diferencial de barrido al estudio de la estabilidad de las proteínas. *Biotechnol. Apl.* 2001;1810-16. 18:10–16.
- Bhardwaj, N., and S. C. Kundu. 2010. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol. Adv.* 28:325–347. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.01.004.
- Blanco-Padilla, A., A. López-Rubio, G. Loarca-Piña, L. G. Gómez-Mascaraque, and S. Mendoza. 2015. Characterization, release and antioxidant activity of curcumin-loaded amaranth-pullulan electrospun fibers. *LWT - Food Sci. Technol.* 1–8. doi:10.1016/j.lwt.2015.03.081. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643815002340>
- Blanco-Padilla, A., K. M. Soto, M. Hernández Iturriaga, and S. Mendoza. 2014. Food antimicrobials nanocarriers. *Sci. World J.* 2014. doi:10.1155/2014/837215.
- Boye, J., F. Zare, and A. Pletch. 2010. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Res. Int.* 43:414–431. doi:10.1016/j.foodres.2009.09.003. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.003>
- Chen, L., G. E. Remondetto, and M. Subirade. 2006. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends Food Sci. Technol.* 17:272–283. doi:10.1016/j.tifs.2005.12.011.

Chiu, M. H., N. S. Berezowski, and E. J. Prenner. 2013. DSC applications: macromolecules. Woodhead Publishing Limited. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781907568053500072>

Cho, D., O. Nnadi, A. Netravali, and Y. L. Joo. 2010. Electrospun Hybrid Soy Protein / PVA Fibers. *Macromol. Mater. Eng.* 763–773. doi:10.1002/mame.201000161.

Condés, M. C., M. C. Añón, and A. N. Mauri. 2013. Amaranth protein films from thermally treated proteins. *J. Food Eng.* 119:573–579. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.06.006.

Costa, a. M. M., J. C. Nunes, B. N. . Lima, C. Pedrosa, V. Calado, a. G. Torres, and a. P. T. R. Pierucci. 2015. Effective stabilization of CLA by microencapsulation in pea protein. *Food Chem.* 168:157–166. doi:10.1016/j.foodchem.2014.07.016. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614010486>

Database., N. C. for B. I. P. Trifluoroacetic acid, CID=6422. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/377010573>

Demerlis, C. C., and D. Schoneker. 2003. Review of the Oral Toxicity of Polyvinyl Alcohol (PVA). 6915. doi:10.1016/S0278-6915(02)00258-2.

Dong, B., O. Arnoult, M. E. Smith, and G. E. Wnek. 2009. Electrospinning of collagen nanofiber scaffolds from benign solvents. *Macromol. Rapid Commun.* 30:539–542. doi:10.1002/marc.200800634.

Douglas, J. 1990. An Introduction to Circular Dichroism. *Biochem. Proteins Anal. Biochem.* @BULLET Gehrman JBC Protein Sci. 7:205–4108.

Dror, Y., T. Ziv, V. Makarov, H. Wolf, A. Admon, and E. Zussman. 2008. Nanofibers made of globular proteins. *Biomacromolecules.* 9:2749–2754. doi:10.1021/bm8005243.

Ebnesajjad, S. 2013. Hanbook of biopolymers and biodegradable plastics properties, processing, and applications. (E. Sina, editor.). Elsevier.

Efsa. 2005. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives , Flavourings , Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to the use of polyvinyl alcohol as a coating agent for food supplements Question number EFSA-Q-20. *EFSA J.* 1–15. doi:10.2903/j.efsa.2007.428.

Esqueda Coronado, M. 2009. Experiencias en la utilizacion de de frijol de desecho en la alimentacion de ovinos.pdf.

FAO. 2004. Polyvinyl Alcohol (Pva). *Int. J. Toxicol.* 1:3–5. doi:10.1016/j.jvir.2010.09.018. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21247805>

Fathi, M., Á. Martín, and D. J. McClements. 2014. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends Food Sci. Technol.* 39:18–39. doi:10.1016/j.tifs.2014.06.007.

Fernandez, A., S. Torres-Giner, and J. M. Lagaron. 2009. Novel route to stabilization of bioactive antioxidants by encapsulation in electrospun fibers of zein prolamine. *Food Hydrocoll.* 23:1427–1432. doi:10.1016/j.foodhyd.2008.10.011. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.10.011>

FIRA. 2016. Panorama Agroalimentario| Frijol 2016.

Fuhrmeister, H., and F. Meuser. 2003. Impact of processing on functional properties of protein products from wrinkled peas. *J. Food Eng.* 56:119–129. doi:10.1016/S0260-8774(02)00241-8.

Fukushima, D. 2011. 8 Soy proteins. Woodhead Publishing Limited.

De Graaf, L. A. 2000. Denaturation of proteins from a non-food perspective. *J. Biotechnol.* 79:299–306. doi:10.1016/S0168-1656(00)00245-5.

Hernández Casas, I. G. 2012. Aprovechamiento de los desechos del cribado del frijol en la zonade los llanos. Instituto Politécnico Nacional.

Hotaling, N. A., K. Bharti, H. Kriel, and C. G. Simon. 2015. DiameterJ: A validated open source nanofiber diameter measurement tool. *Biomaterials.* 61:327–338. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.05.015. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.05.015>

Kayaci, F., and T. Uyar. 2012. Encapsulation of vanillin/cyclodextrin inclusion complex in electrospun polyvinyl alcohol (PVA) nanowebs: Prolonged shelf-life and high temperature stability of vanillin. *Food Chem.* 133:641–649. doi:10.1016/j.foodchem.2012.01.040. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.040>

Kelly, S. M., T. J. Jess, and N. C. Price. 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 1751:119–139. doi:10.1016/j.bbapap.2005.06.005.

Khansari, S., S. Sinha-Ray, A. L. Yarin, and B. Pourdeyhimi. 2013. Biopolymer-based nanofiber mats and their mechanical characterization. *Ind. Eng. Chem. Res.* 52:15104–15113. doi:10.1021/ie402246x.

Kong, L., and G. R. Ziegler. 2014. Food Hydrocolloids Rheological aspects in fabricating pullulan fibers by electro-wet-spinning. *Food Hydrocoll.* 38:220–226. doi:10.1016/j.foodhyd.2013.12.016. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.12.016>

Kowalczyk, D., W. Gustaw, M. Świeca, and B. Baraniak. 2014. A study on the mechanical properties of pea protein isolate films. *J. Food Process. Preserv.* 38:1726–1736. doi:10.1111/jfpp.12135.

Kriegel, C., K. M. Kit, D. J. McClements, and J. Weiss. 2009. Electrospinning of chitosan – poly (ethylene oxide) blend nanofibers in the presence of micellar surfactant solutions. *Polymer (Guildf).* 50:189–200. doi:10.1016/j.polymer.2008.09.041. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2008.09.041>

Kuhn, K. R., Â. L. F. Cavallieri, and R. L. da Cunha. 2010. Cold-set whey protein gels induced by calcium or sodium salt addition. *Int. J. Food Sci. Technol.* 45:348–357. doi:10.1111/j.1365-2621.2009.02145.x. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2009.02145.x>

L. Andradý, A. 2008. *Science and technology of polymer nanofibers*. John Wiley & Sons, Inc.

Leidy, R., and M. X. Quintanilla Carvajal. 2019. Use of electrospinning technique to produce nanofibres for food industries: A perspective from regulations to characterisations. *Trends Food Sci. Technol.* 85:92–106. doi:10.1016/j.tifs.2019.01.006. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.01.006>

Liang, H. N., and C. H. Tang. 2013. PH-dependent emulsifying properties of pea [*Pisum sativum* (L.)] proteins. *Food Hydrocoll.* 33:309–319. doi:10.1016/j.foodhyd.2013.04.005. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.04.005>

Lubasova, D., J. Mullerova, and A. N. Netravali. 2015. Water-resistant plant protein - based nanofiber membranes. *J. Appl. Polym. Sci.* 132:n/a-n/a. doi:10.1002/app.41852. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.41852>

Luo, C. J., E. Stride, and M. Edirisinghe. 2012. Mapping the influence of solubility and dielectric constant on electrospinning polycaprolactone solutions. *Macromolecules.* 45:4669–4680. doi:10.1021/ma300656u.

Maltais, A., G. E. Remondetto, and M. Subirade. 2009. Food Hydrocolloids Soy protein cold-set hydrogels as controlled delivery devices for nutraceutical compounds. *Food Hydrocoll.* 23:1647–1653. doi:10.1016/j.foodhyd.2008.12.006. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.12.006>

Martínez, E. N., and M. C. Añón. 1996. Composition and Structural Characterization of Amaranth Protein Isolates. An Electrophoretic and Calorimetric Study. *J. Agric. Food Chem.* 44:2523–2530. doi:10.1021/jf960169p. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf960169p>

Meli, L., J. Miao, J. S. Dordick, and R. J. Linhardt. 2010. Electrospinning from room temperature ionic liquids for biopolymer fiber formation. *Green Chem.* 12:1883. doi:10.1039/c0gc00283f.

Minato, K., K. Ohkawa, and H. Yamamoto. 2006. Chain Conformations of Poly (g - benzyl- L - glutamate) Pre and Post an Electrospinning Process. *Macromol. Biosci.* 487–495. doi:10.1002/mabi.200600066.

Mirjalili, M., and S. Zohoori. 2016. Review for application of electrospinning and electrospun nanofibers technology in textile industry. *J. Nanostructure Chem.* 6:207–213. doi:10.1007/s40097-016-0189-y.

Mojica, L., and E. G. de Mejía. 2015. Characterization and Comparison of Protein and Peptide Profiles and their Biological Activities of Improved Common Bean Cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mexico and Brazil. *Plant Foods Hum. Nutr.*

105–112. doi:10.1007/s11130-015-0477-6. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s11130-015-0477-6>

Moomand, K., and L. T. Lim. 2014. Oxidative stability of encapsulated fish oil in electrospun zein fibres. *Food Res. Int.* 62:523–532. doi:10.1016/j.foodres.2014.03.054. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.054>

Mundi, S., and R. E. Aluko. 2012. Physicochemical and functional properties of kidney bean albumin and globulin protein fractions. *Food Res. Int.* 48:299–306. doi:10.1016/j.foodres.2012.04.006. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.04.006>

National Center for Biotechnology Information. Database., P. 1_1_1_3_3_3-Hexafluoro-2-propanol CID=13529,. Available from:
https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_1_1_3_3_3-Hexafluoro-2-propanol

National Center for Biotechnology Information, P. Acetic acid, CID=176,. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetic-acid>

National Center for Biotechnology Information, P. Formic acid, CID=284,. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Formic-acid>

National Center for Biotechnology Information, P. 2,2,2-Trifluoroethanol, CID=6409. Available from:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/trifluoroethanol>

Naveen, J., D. Gajanan P., and R. R. Menon. 2019. Dynamic Light Scattering: Advantages and Applications. 3:50–52.

Neo, Y. P., S. Ray, J. Jin, M. Gizdavic-Nikolaidis, M. K. Nieuwoudt, D. Liu, and S. Y. Quek. 2013a. Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: A physicochemical study based on zein-gallic acid system. *Food Chem.* 136:1013–1021. doi:10.1016/j.foodchem.2012.09.010. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.010>

Neo, Y. P., S. Ray, and C. O. Perera. 2018. Fabrication of Functional Electrospun Nanostructures for Food Applications. In: A. M. Grumezescu and A. M. Holban, editors. *Role of Materials Science in Food Bioengineering, Handbook of Food Bioengineering.* Elsevier Inc. p. Pages 109-146. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-811448-3/00004-8>

Neo, Y. P., S. Swift, S. Ray, M. Gizdavic-Nikolaidis, J. Jin, and C. O. Perera. 2013b. Evaluation of gallic acid loaded zein sub-micron electrospun fibre mats as novel active packaging materials. *Food Chem.* 141:3192–3200. doi:10.1016/j.foodchem.2013.06.018. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.018>

Ni, N., D. Zhang, and M. J. Dumont. 2018. Synthesis and characterization of zein-based superabsorbent hydrogels and their potential as heavy metal ion chelators. *Polym. Bull.* 75:31–45. doi:10.1007/s00289-017-2017-z.

Nieuwland, M., P. Geerdink, P. Brier, P. van den Eijnden, J. T. M. M. Henket, M. L.

P. Langelaan, N. Stroeks, H. C. van Deventer, and A. H. Martin. 2014. Reprint of "Food-grade electrospinning of proteins." *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 24:138–144. doi:10.1016/j.ifset.2014.07.006. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1466856414001167>

Nieuwland, M., P. Geerdink, P. Brier, P. Van Den Eijnden, J. T. M. M. Henket, M. L. P. Langelaan, N. Stroeks, H. C. Van Deventer, and A. H. Martin. 2013. Food-grade electrospinning of proteins. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 20:269–275. doi:10.1016/j.ifset.2013.09.004. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.09.004>

NMX-FF-038-SCFI-2002. 2002. Productos alimenticios no industrializados para consumo humano-Fabáceas-Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) -Especificaciones y métodos de prueba.

Nuansing, W. 2014. *Electrospinning of Biomolecules*. Universidad del país Vasco.

Nuansing, W., D. Frauchiger, F. Huth, A. Rebollo, R. Hillenbrand, and A. M. Bittner. 2013. Electrospinning of peptide and protein fibres: approaching the molecular scale. *Faraday Discuss.* 166:209–221. doi:10.1039/c3fd00069a. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3fd00069a>

Obatolu, V. A., S. B. Fasoyiro, and L. Ogunsunmi. 2006. Processing and functional properties of yam beans (. 31:240–249.

Perczel, A., and M. Hollósi. 1996. *Turns*. (G. D. Fasman, editor.). Springer Science+Business Media, LLC. Available from: <http://ebooks.cambridge.org/ref/id/CBO9781107415324A009%5Cnhttp://link.springer.com/10.1007/978-1-4757-2508-7>

Pierucci, A. P. T. R., L. R. Andrade, E. B. Baptista, N. M. Volpato, and M. H. M. Rocha-Leão. 2006. New microencapsulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as coat protector. *J. Microencapsul.* 23:654–662. doi:10.1080/02652040600776523.

Pierucci, A. P. T. R., L. R. Andrade, M. Farina, C. Pedrosa, and M. H. M. Rocha-Leão. 2007. Comparison of alpha-tocopherol microparticles produced with different wall materials: pea protein a new interesting alternative. *J. Microencapsul.* 24:201–213. doi:10.1080/02652040701281167.

Praepanitchai, O. A., A. Noomhorm, A. K. Anal, and M. E. Potes. 2019. Survival and Behavior of Encapsulated Probiotics (*Lactobacillus plantarum*) in Calcium-Alginate-Soy Protein Isolate-Based Hydrogel Beads in Different Processing Conditions (pH and Temperature) and in Pasteurized Mango Juice. *Biomed Res. Int.* 2019. doi:10.1155/2019/9768152.

Ramakriishna, S., K. Fujihara, W.-E. Teo, T.-C. Lim, and Z. Ma. 2005. *Electrospinning and Nanofibers*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Toh Tuck Link, Singapore.

Randolph, T. W., and L. S. Jones. 2002. Surfactant-protein interactions. In: J. F. Carpenter and M. C. Manning, editors. *Rational design of stable protein*

formulations. First edit. Springer Science+Business Media, LLC, New York. p. 159–171.

Rastogi, A., and S. Shukla. 2013. Amaranth: A New Millennium Crop of Nutraceutical Values. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53:109–125. doi:10.1080/10408398.2010.517876.

Reddy, N., and Y. Yang. 2011. Potential of plant proteins for medical applications. *Trends Biotechnol.* 29:490–498. doi:10.1016/j.tibtech.2011.05.003. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.003>

Regev, O., R. Khalfin, E. Zussman, and Y. Cohen. 2010. About the albumin structure in solution and related electro-spinnability issues. *Int. J. Biol. Macromol.* 47:261–265. doi:10.1016/j.ijbiomac.2010.04.012.

Rezaei, A., A. Nasirpour, and M. Fathi. 2015. Application of Cellulosic Nanofibers in Food Science Using Electrospinning and Its Potential Risk. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 14:269–284. doi:10.1111/1541-4337.12128. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/1541-4337.12128>

Rubio, L. A., A. Perez, R. Ruiz, M. A. Guzman, I. Aranda-Olmedo, and A. Clemente. 2014. Characterization of pea (*Pisum sativum*) seed protein fractions. *J Sci Food Agric.* 94:280–287. doi:10.1002/jsfa.6250. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23744804>

Ruiz-Peña, M., R. Oropesa-Nuñez, T. Pons, S. R. W. Louro, and A. Pérez-Gramatges. 2010. Physico-chemical studies of molecular interactions between non-ionic surfactants and bovine serum albumin. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 75:282–289. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.08.046.

Sasaki, T., M. Kobayashi, and H. Kise. 1997. Active conformation of α -chymotrypsin in organic solvents as studied by circular dichroism. *Biotechnol. Tech.* 11:387–390. doi:10.1023/A:1018456420407.

Shevkani, K., N. Singh, A. Kaur, and J. C. Rana. 2014. Structural and functional characterization of kidney bean and field pea protein isolates: A comparative study. *Food Hydrocoll.* 43:679–689. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.07.024. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.07.024>

Silva, J. A. L. Da. 2012. Functional Nanofibers and their Applications. In: J. Zhang, T. Lin, and X. Wang, editors. *Functional Nanofibers and their Applications*. Woodhead Publishing Limited. p. 55–70. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780857090690500045>

Šimko, M., J. Erhart, and D. Lukáš. 2014. A mathematical model of external electrostatic field of a special collector for electrospinning of nanofibers. *J. Electrostat.* 72:161–165. doi:10.1016/j.elstat.2014.01.003.

Singh, R. S., G. K. Saini, and J. F. Kennedy. 2008. Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydr. Polym.* 73:515–531. doi:10.1016/j.carbpol.2008.01.003.

Soto, K. M., M. Hernández-Iturriaga, G. Loarca-Piña, G. Luna-Bárceñas, and S.

Mendoza. 2019. Antimicrobial effect of nisin electrospun amaranth: pullulan nanofibers in apple juice and fresh cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 295:25–32. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.001.

Soto, K. M., G. Loarca-Pina, C. Gómez-Aldapa, S. Mendoza-Díaz, and G. Luna-Bárcenas. 2016. Stable nisin food-grade electrospun fibers. *J Food Sci Technol.* doi:10.1007/s13197-016-2365-y.

Sreerama, N., S. Y. Venyaminov, and R. W. Woody. 2000. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Inclusion of Denatured Proteins with Native Proteins in the Analysis. *Anal. Biochem.* 287:243–251. doi:10.1006/abio.2000.4879. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269700948796>

Sullivan, S. T., C. Tang, A. Kennedy, S. Talwar, and S. A. Khan. 2014. Electrospinning and heat treatment of whey protein nanofibers. *Food Hydrocoll.* 35:36–50. doi:10.1016/j.foodhyd.2013.07.023. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X13002257>

Tang, C. H., and X. Sun. 2011. A comparative study of physicochemical and conformational properties in three vicilins from *Phaseolus* legumes: Implications for the structure-function relationship. *Food Hydrocoll.* 25:315–324. doi:10.1016/j.foodhyd.2010.06.009. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.06.009>

Toews, R., and N. Wang. 2013. Physicochemical and functional properties of protein concentrates from pulses. *Food Res. Int.* 52:445–451. doi:10.1016/j.foodres.2012.12.009. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.009>

Vega-Lugo, A. C., and L. T. Lim. 2009. Controlled release of allyl isothiocyanate using soy protein and poly(lactic acid) electrospun fibers. *Food Res. Int.* 42:933–940. doi:10.1016/j.foodres.2009.05.005. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.05.005>

Wang, S., M. F. Marcone, S. Barbut, and L. T. Lim. 2013. Electrospun soy protein isolate-based fiber fortified with anthocyanin-rich red raspberry (*Rubus strigosus*) extracts. *Food Res. Int.* 52:467–472. doi:10.1016/j.foodres.2012.12.036. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.036>

Wang, Y., and L. Chen. 2012. Electrospinning of prolamin proteins in acetic acid: The effects of protein conformation and aggregation in solution. *Macromol. Mater. Eng.* 297:902–913. doi:10.1002/mame.201100410.

Water, CID=962. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Water>

Weder, J. K. P., and B. H.D. 2003. Functional properties. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*. p. 4835–4841. Available from: <https://www.gelita.com/en/functions/functional-properties>

Wei, Q., D. Tao, and Y. Xu. 2012. Nanofibers: principles and manufacture. *Funct.*

Nanofibers their Appl. 3–21. doi:10.1533/9780857095640.1.1. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978085709069050001X>

Wei, Q., and a. Wei. 2012. Functional nanofibers for drug delivery applications. Woodhead Publishing Limited. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780857090690500082>

Weiss, Jochen; Kanjanapongkul, Kobsak; Wongsaulak, Saowakon; Yoovidhya, T. 2012. Electrospun fibers: fabrication, functionalities and potential food industry applications. Woodhead Publishing Limited. Available from: <http://dx.doi.org/10.1533/9780857095657.2.362>

Withana-Gamage, T. S., J. P. Wanasundara, Z. Pietrasik, and P. J. Shand. 2011. Physicochemical, thermal and functional characterisation of protein isolates from Kabuli and Desi chickpea (*Cicer arietinum* L.): A comparative study with soy (*Glycine max*) and pea (*Pisum sativum* L.). *J. Sci. Food Agric.* 91:1022–1031. doi:10.1002/jsfa.4277.

Wongsasulak, S., M. Patapeejumruswong, J. Weiss, P. Supaphol, and T. Yoovidhya. 2010. Electrospinning of food-grade nanofibers from cellulose acetate and egg albumen blends. *J. Food Eng.* 98:370–376. doi:10.1016/j.jfoodeng.2010.01.014. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.014>

Wongsasulak, S., S. Pathumban, and T. Yoovidhya. 2014. Effect of entrapped α -tocopherol on mucoadhesivity and evaluation of the release, degradation, and swelling characteristics of zein-chitosan composite electrospun fibers. *J. Food Eng.* 120:110–117. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.07.028. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.07.028>

Woody, R. W. 1969. Optical properties of polypeptides in the beta-conformation. *Biopolymers.* 8:669–683.

Wu, J., F. Zhong, Y. Li, C. F. Shoemaker, and W. Xia. 2013. Preparation and characterization of pullulan e chitosan and pullulan e carboxymethyl chitosan blended films. *Food Hydrocoll.* 30:82–91. doi:10.1016/j.foodhyd.2012.04.002. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.04.002>

Wu, N., and Q. Wei. 2012. Inorganic functional nanofibers: processing and applications. *Funct. Nanofibers their Appl.* 71–91. doi:10.1533/9780857095640.1.71. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780857090690500057>

Xu, M., and M. J. Dumont. 2015. Evaluation of the stability of pea and canola protein-based hydrogels in simulated gastrointestinal fluids. *J. Food Eng.* 165:52–59. doi:10.1016/j.jfoodeng.2015.04.033. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.04.033>

Yin, S.-W., C.-H. Tang, Q.-B. Wen, and X.-Q. Yang. 2011. Surface charge and conformational properties of phaseolin, the major globulin in red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L): effect of pH. *Int. J. Food Sci. Technol.* 91:94–9. doi:10.1002/jsfa.4155. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20815040>

Yin, S. W., J. C. Chen, S. De Sun, C. H. Tang, X. Q. Yang, Q. B. Wen, and J. R. Qi. 2011. Physicochemical and structural characterisation of protein isolate, globulin and albumin from soapnut seeds (*Sapindus mukorossi* Gaertn.). *Food Chem.* 128:420–426. doi:10.1016/j.foodchem.2011.03.046. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.046>

Yin, S. W., C. H. Tang, Q. B. Wen, and X. Q. Yang. 2010. Conformational and thermal properties of phaseolin, the major storage protein of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Sci. Food Agric.* 91:94–99. doi:10.1002/jsfa.4155.

Zayas, J. F. 1997. Water Holding Capacity of Proteins 2.1 Introduction. In: *Functionality of Proteins in Food*. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 76–133. Available from: https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-3-642-59116-7_3.pdf

Zhang, Y., S. Ghasemzadeh, M. Kotliar, S. Kumar, S. Presnell, and L. Williams. 1999. Fibers from soybean protein and poly (vinyl alcohol). *J. Appl. Polym. Sci.* 71:11–19. doi:10.1002/(SICI)1097-4628(19990103)71:1<11::AID-APP3>3.0.CO;2-1. Available from: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19990103\)71:1%3C11::AID-APP3%3E3.0.CO;2-1/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-4628(19990103)71:1%3C11::AID-APP3%3E3.0.CO;2-1/full)

Zhang, Y. H., C. H. Tang, Q. B. Wen, X. Q. Yang, L. Li, and W. L. Deng. 2010. Thermal aggregation and gelation of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate at pH 2.0: Influence of ionic strength. *Food Hydrocoll.* 24:266–274. doi:10.1016/j.foodhyd.2009.10.002. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.002>

Zirwer, D., K. Gast, H. Welfle, B. Schlesier, and K. Dieter Schwenke. 1985. Secondary structure of globulins from plant seeds: a re-evaluation from circular dichroism measurements. *Int. J. Biol. Macromol.* 7:105–108. doi:10.1016/0141-8130(85)90039-X.