

**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**  
**Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado**  
**Facultad de Ingeniería Química**  
**Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado**



**Título de Tesis:**

**OBTENCIÓN DE MICRO Y NANOFIBRAS DE ALFA TOCOFEROL  
ENCAPSULADO EN GELATINA POR LA TÉCNICA DE ELECTROSPINNING.**

**presenta:**

**Lic. I.Q. Michelle P. Olguin Fuentes**

**Para obtener el grado en:**

**MAESTRÍA EN INGENIERÍA QUÍMICA**

**Directora de tesis:**

**Dra. Verónica Santacruz Vázquez**

**Codirectora de tesis:**

**Dra. Claudia Santacruz Vázquez**

**Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos:**

*A mi amado esposo Miguel Ferrer Aguilar, a mis adoradas hijas Montserrat y María José por todo el apoyo y comprensión incondicional que me han brindado siempre. Ustedes son mi motor y mi mayor motivación en la vida; Sé que juntos lograremos superar cualquier reto o adversidad que se nos presente, los amo con todo mi corazón.*

*A mis amorosos padres Martha Sara Fuentes Navarro y Faustino Olguin Jacinto, que siempre están ahí para alentarme a lograr mis metas, por guiarme ante cualquier circunstancia de la vida. Gracias por todo el cuidado que me han brindado, por mantener unida a nuestra familia y por hacerme sentir siempre amada y comprendida. A mi hermano Osvaldo Olguin Fuentes por todo lo que hemos compartido en la vida.*

*A mis amigos de la Maestría Tania Castillo Cruz, Magaly Vega Romero y Jaime González Silva por ser excelentes compañeros, confidentes y amigos. Gracias por todas las vivencias y momentos de, alegría, estrés, esfuerzo y mucho trabajo que vivimos juntos.*

*Y sobre todo le agradezco a Dios por todas las bendiciones que me ha dado en la vida, por acompañarme siempre en cada uno de mis pasos, por ayudarme a superar cada uno de mis retos, por siempre poner en mi camino a las personas correctas en el momento preciso. Gracias Dios por la maravillosa vida que me brindas y por enseñarme el camino correcto.*

*A mis profesores tanto del curso propedéutico como a mis catedráticos y compañeros de la Maestría por compartir sus conocimientos, reflexiones, ideas, conversaciones y ratos divertidos.*

### ***Agradecimientos Institucionales:***

*A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) por brindarme una formación de alto nivel académico.*

*A mi Directora de Tesis la Dra. Verónica Santacruz Vázquez, así como a mi Codirectora Claudia Santacruz Vázquez quiero agradecerles de manera muy especial por toda la ayuda que me han brindado para poder realizar este proyecto de tesis. Por su tiempo, sus exigencias y consejos. Gracias por el apoyo incondicional que siempre me han brindado, por confiar y creer en mí, por ayudarme a crecer día a día tanto a nivel profesional como personal.*

*A la Dra. Santa Toxqui López y a la Mtra. María Juana Paredes Bautista miembros del jurado que fueron parte importante en este trabajo ya que sus consejos y correcciones me ayudaron a realizar una tesis de excelente calidad.*

*A la Dra. Nancy Tepale Ochoa por todo su apoyo y disponibilidad para efectuar las pruebas reológicas necesarias para la caracterización de las emulsiones.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de la Maestría en Ingeniería Química.*

*A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrados (VIEP) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) por el apoyo económico para la culminación de este proyecto de tesis.*

*Al Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología (CUVyT) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) por el apoyo en la caracterización de las muestras obtenidas en esta tesis.*

***Productividad asociada a esta tesis de Maestría:***

- Capítulo del libro Avances en Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos. González-Silva Jaime A., Olguin Fuentes Michelle, Santacruz Vázquez Claudia, Santacruz Vázquez Verónica (2015). “Encapsulación de aceite de oliva en nanofibras de alcohol polivinílico mediante el proceso de electrospinning”. Prometeo Editores. ISBN: 978-607-8336-76.
- Solicitud de patente registrada en la Dirección de Innovación y Transferencia de Conocimiento de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (DITCo-BUAP) en el mes de Septiembre del 2016. “Mascarilla hidratante con antioxidantes elaborada a partir de nanofibras de gelatina tipo A y alfa-tocoferol”.
- Solicitud de patente registrada en la Dirección de Innovación y Transferencia de Conocimiento de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (DITCo-BUAP) en el mes de Noviembre del 2016. “Bio-películas de nanofibras de PVA y aceite de oliva para su aplicación en la industria frutícola”.
- Presentación en el XVII Congreso Internacional de Inocuidad de Alimentos, celebrado en la Riviera Nayarit-Guadalajara del 5-7 de Noviembre del 2015.

## Contenido

Justificación del proyecto .....	7
Hipótesis .....	8
Objetivo general .....	8
Objetivos específicos .....	8
1    Capítulo I: Marco Teórico. ....	9
1.1    Nanotecnología y sus beneficios .....	9
1.2    Emulsiones. ....	11
1.3    Encapsulación .....	14
1.4    Electrospinning .....	17
1.5    Nanofibras.....	23
1.6    Material encapsulante: Gelatina .....	24
1.7    Solvente: Ácido acético.....	28
1.8    Componente activo: Alfa tocoferol .....	29
2    Capítulo II: Metodología. ....	31
2.1    Materiales .....	31
2.2    Equipos.....	32
2.3    Encapsulación del alfa-tocoferol en emulsiones de gelatina. ....	34
2.4    Pruebas fisicoquímicas de las emulsiones. ....	35
2.5    Análisis reológico de las emulsiones.....	36
2.6    Proceso de electrohilado. ....	36
2.7    Determinación morfológica de las fibras por SEM. ....	39
2.8    Análisis por FTIR de las fibras.....	40

2.9	Análisis térmico de las fibras por calorimetría. ....	41
2.10	Determinación de la actividad de agua de las fibras. ....	42
2.11	Evaluación de isothermas de adsorción de las fibras. ....	42
2.12	Evaluación del perfil de disolución de las fibras. ....	43
2.13	Validación del efecto protector de la gelatina para la Vitamina E.....	44
2.14	Balance de materia para contenido de alfa-tocoferol final.....	45
2.15	Análisis de irritabilidad en base a la NOM-039-SSA1-1993. ....	47
3	Capítulo III: Resultados. ....	50
3.1	Caracterización de las emulsiones.....	50
3.1.1	Propiedades fisicoquímicas de las emulsiones.....	52
3.1.2	Viscosidad de las emulsiones.....	54
3.2	Caracterización y evaluación de las fibras.....	57
3.2.1	Morfología de las fibras.....	58
3.2.2	Comportamiento térmico de las fibras.....	72
3.2.3	Actividad de agua en las fibras.....	74
3.2.4	Isothermas de adsorción de las fibras.....	75
3.2.5	Validación del $\alpha$ -tocoferol en las fibras por FTIR.....	77
3.3	Perfil de disolución de las fibras y liberación del alfa-tocoferol.....	81
3.4	Efecto protector de la gelatina contra la oxidación de la Vitamina E. ....	83
3.5	Concentración de alfa tocoferol en las fibras de gelatina.....	86
3.6	Prueba in vivo e irritabilidad de las fibras. ....	87
3.7	Aplicación.....	88
4	Conclusiones.....	89
5	Bibliografía.....	91

## Justificación del proyecto

En la actualidad existen diversas técnicas innovadoras para la obtención de nanomateriales, que permiten encapsular micro y macronutrientes (*Loera Serna, et al., 2012*). Dentro de estas técnicas, una de las más novedosas es la denominada electrospinning o electrohilado; Técnica que ha permitido el desarrollo de fibrillas a escala micro o nanométrica con estructuras fibrosas a partir de polímeros sintéticos o de origen natural, siendo estos últimos los de mayor interés para el desarrollo de materiales aplicables en la industria de alimentos, farmacéutica, biomédica, entre otras (*Nandana & Subhas C., 2010*)

Se busca el desarrollo de micro y nanofibras de gelatina que permitan encapsular al micronutriente liposoluble Vitamina E también conocido como Alfa-tocoferol, protegiéndolo de su degradación oxidativa. Debido a que la gelatina es un biopolímero de fácil obtención, bajo costo, biocompatible, biodegradable y no tóxico, se ha utilizado ampliamente en diversas aplicaciones de la industria alimentaria, comúnmente como agente que mejora la elasticidad, la estabilidad y la consistencia de los productos alimenticios (*Cerecedo Núñez, et al., 2010*)

Se opta por la Vitamina E (alfa-tocoferol) debido a que es un antioxidante natural que protege a algunas estructuras celulares de la peroxidación lipídica, ayuda a fortalecer el sistema inmune humano frente a virus y bacterias, además de contribuir a la formación de glóbulos rojos y asimilación de la Vitamina K en el organismo (*Rojas Cortés, et al., 2008*)

Con base en lo anterior, este trabajo de investigación busca obtener información experimental acerca del proceso de obtención de micro y nanofibras de alfa tocoferol encapsulado en gelatina mediante la técnica de electrospinning para su posible uso farmacéutico, biomédico o alimentario.

## **Hipótesis**

Es posible la obtención de micro y nanofibras de alfa tocoferol encapsulado, empleando gelatina como material de recubrimiento mediante el proceso de electrospinning o electrohilado.

## **Objetivo general**

Desarrollar el proceso para la obtención de micro y nanofibras de alfa tocoferol encapsulado empleando el método de electrospinning, con gelatina como material de recubrimiento.

## **Objetivos específicos**

- Establecer las condiciones de proceso para la obtención de micro y nanofibras de alfa tocoferol encapsulado en gelatina, mediante el proceso de electrohilado.
- Determinar las características morfológicas de las micro y nanofibras de gelatina con alfa tocoferol encapsulado.
- Especificar las características fisicoquímicas de las micro y nanofibras de gelatina con alfa tocoferol encapsulado.

## 1 Capítulo I: Marco Teórico.

### 1.1 Nanotecnología y sus beneficios

En el campo de las ciencias básicas e ingeniería se desarrollan materiales a escala micro, nano e incluso inferiores con la finalidad de adquirir conocimientos, que nos permitan generar nuevas aplicaciones que den solución a las necesidades cambiantes de la humanidad.

La Nanotecnología es la ciencia que se especializa en el estudio de la materia a escala nanométrica, esta escala va de 1 nm a 1mm (Figura 1-1). Sus aplicaciones impactan en diversas actividades de la sociedad, como son el medioambiente, la medicina, la electrónica, la construcción, el sector energético, la agricultura, la industria de los alimentos, la industria química, la farmacología, la cosmética, entre otras. (Poole Charles & Owens Frank, 2007).

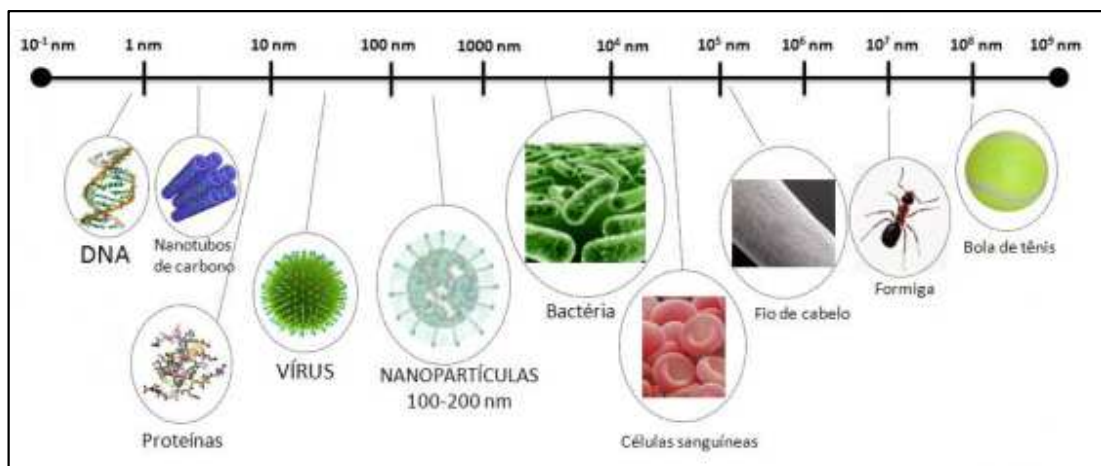


Figura 1-1 Escala nanométrica.

Fuente: <http://todotecnology.blogspot.mx/2015/05/la-nanotecnologia-y-sus-diversas.html>

Existen diferentes tipos de estructuras que se pueden obtener a escala nanométrica y varían en base al proceso de obtención y son nombradas por su geometría básica, algunos ejemplos son nanotubos, nano-hilos, nano-esferas, nano-conos, etc. Sus aplicaciones se determinan por las propiedades mecánicas y químicas que presentan, como es su elasticidad, dureza, resistencia mecánica, porosidad, entre otras. (*Diaz del Castillo Rodríguez, 2012*).

Una de las soluciones que ha proporcionado la Nanotecnología, ha sido el mejorar la biodisponibilidad e incorporación en medios acuosos de compuestos lipofílicos, como es el caso de los algunos aceites esenciales que al ser encapsulados en biopolímeros se facilita su incorporación en alimentos o químicos formulados principalmente por agua (*Sandoval Aldana, et al., 2004*).

Son diversos los trabajos en Nanotecnología efectuados para la obtención de nano-dispersiones, logrando con éxito que compuestos lipofílicos funcionales encapsulados en micro y nano-esferas queden dispersas en sistemas acuosos; En estas investigaciones se han empleado principalmente los procesos de precipitación, evaporación de disolvente dentro de medios porosos, emulsificación-liofilización, emulsificación-difusión, emulsificación-evaporación, entre otros. Pero el campo para el desarrollo de estructuras como nanotubos o nanofibras donde se logre encapsular compuestos activos es de reciente interés debido al abanico de posibles aplicaciones que estas estructuras pudieran permitir. (*Navideh, et al., 2014*).

Algunas de las aplicaciones de las nanofibras con compuestos activos encapsulados, ha sido el desarrollo de materiales de empaque para alimentos que sean biodegradables y que funcionen como barreras eficientes al oxígeno y al agua. Esto con la finalidad de contar con materiales de empaque que puedan cumplir con la función de conservar y proteger los alimentos, pero al mismo tiempo que sean amigables con el medio ambiente. Existen reportes de investigaciones en Nanotecnología donde se ha trabajado en el desarrollo de películas a base de nanofibras de zeína, queratina, albúmina de huevo, colágeno, caseína y

suero de leche, que pudieran cumplir con estos requerimientos. (*Granda-Restrepo, et al., 2014*)

De igual forma dentro de las aplicaciones en el campo de la Farmacología es la obtención de fibras de biopolímeros que encapsulen y protejan moléculas o compuestos activos utilizados de forma terapéutica en el tratamiento tópico de enfermedades, en la recuperación de lesiones cutáneas, o simplemente para el mejoramiento en las condiciones de la piel (*Gamboa, et al., 2007*). Pero existe la desventaja que la gran mayoría de estos compuestos son susceptibles al pH, la oxidación, el tratamiento térmico o químico. Actualmente son pocos los mecanismos que logran producir estos materiales de forma segura, eficiente y económica, pudiendo dar respuesta a la necesidad de suministrar estos compuestos de manera controlada en la piel.

El proceso de electrospinning ha permitido la obtención de fibras con diámetros nanométricos, que encapsulan proteínas, antibióticos, aceites esenciales, etc., prometiendo ser una respuesta viable a las necesidades antes planteadas. (*Loera Serna, et al., 2012*). Pero para lograr el desarrollo de estas nanofibras mediante el proceso de electrohilado, este se inicia con la emulsificación del compuesto activo en una solución polimérica, lo que genera la necesidad de entender la naturaleza de las emulsiones y sus principales características.

## **1.2 Emulsiones.**

Se entiende como emulsión al sistema en el cual coexisten dos fases líquidas inmiscibles, siendo la fase dispersa o discontinua aquella que se encuentra en forma de pequeñas gotas esféricas distribuidas de forma homogénea, mientras que la otra fase recibe el nombre de fase continua. Las emulsiones pueden ser clasificadas con base en las fases involucradas. Nombrándose emulsiones simples, cuando se trata de un sistema con dos fases aceite-agua y agua-aceite; Aquellas que reciben el nombre de emulsiones múltiples ocurren cuando

coexisten tres fases entremezcladas, en éstas se pueden observar gotas de aceite que contienen en su interior pequeñas gotas de agua o viceversa. (Aranberri, et al., 2006)

También pueden ser clasificadas en base al tamaño de las micelas que presenta la fase dispersa, las más conocidas son las macro-emulsiones con diámetros que oscilan entre 0.1 y 20  $\mu\text{m}$ . Seguidas por las micro-emulsiones formadas por micelas con diámetros inferiores a 0.1  $\mu\text{m}$  y finalmente las nano-emulsiones cuyos diámetros van de 50 a 500 nm. (Aranberri, et al., 2006)

Es importante obtener micelas de diámetros pequeños, ya que esto disminuye el efecto de la fuerza de gravedad y el movimiento Browniano, permitiendo una mayor estabilidad y homogeneidad durante su almacenamiento; Retrasando los defectos de inestabilidad más comunes que se presentan en una emulsión debido al desequilibrio existente entre las fuerzas de atracción y repulsión de las moléculas. En la Figura 1-2, se presenta un esquema que ejemplifica los mecanismos de inestabilidad más comunes en las emulsiones. (Hernández Jaimes, 2009)

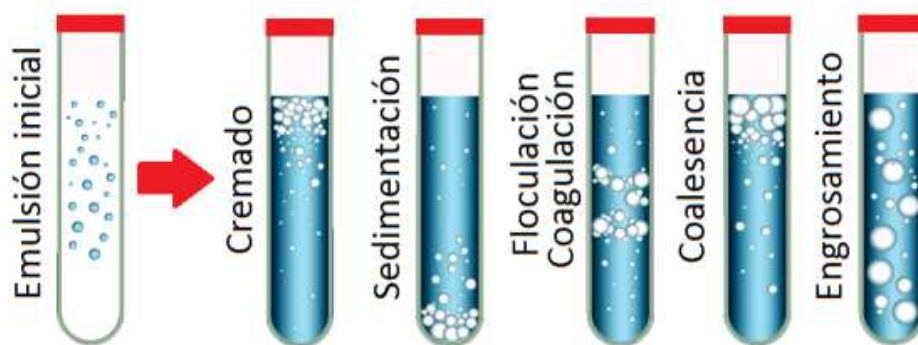


Figura 1-2 Mecanismos de inestabilidad de las emulsiones.

A continuación, se describe cada uno de los mecanismos de inestabilidad en una emulsión (Figura 1-2):

- 1) Engrosamiento: Se origina el crecimiento a micelas más grandes mediante la fusión de aquellas más pequeñas que casi desaparecen. Las micelas grandes de la fase dispersa se posicionan principalmente en la parte superior de la emulsión.
- 2) Coalescencia: Ocurre cuando las micelas se fusionan para crear unas más grandes, pero estas se quedan suspendidas en la emulsión. Eliminando parte de la interfase líquido/líquido.
- 3) Floculación/Coagulación: Aparece cuando las micelas de la fase dispersa se adhieren sin fusionarse quedando suspendidas de forma no homogénea en la fase continua, sin existir una variación en su tamaño.
- 4) Sedimentación: Es originado por la acción de la gravedad, produciendo un gradiente vertical de concentración que lleva a las micelas de la fase dispersa al fondo de la emulsión sin existir una fusión de las mismas.
- 5) Cremado: Al igual que la sedimentación se debe a la gravedad sin fusión, pero en este caso las micelas se concentran en la parte superior de la emulsión.

*(Kosegarten-Conde & Jiménez-Munguía, 2012).*

Se ha estudiado ampliamente el uso de moléculas con estructura anfifílica, es decir que posean un grupo funcional hidrofílico o polar en un extremo de su molécula el cual es soluble en agua y en el otro extremo de su estructura molecular un grupo funcional hidrófobo o no polar que rechaza el agua y es afín a medios lípidos al que se le denomina emulsionante o emulsificante. Algunos de los emulsificantes naturales más estudiados son las proteínas, como la caseína, la goma acacia, la goma xantana, la gelatina y la proteína de suero. *(Aranberri, et al., 2006)*

Para la obtención adecuada de una emulsión existen ciertos parámetros físicos y químicos a controlar. En primera instancia se encuentra el diámetro micelar, parámetro físico que se regula con el cizallamiento generado por equipos como los agitadores mecánicos

convencionales, homogenizadores de alta presión o de membrana y el ultrasonido de alta potencia. Otra variable es la temperatura, pues afectará la formación de la emulsión al tener acción directa con la miscibilidad de todos los compuestos y sus interacciones. (Aranberri, et al., 2006)

Con respecto a los parámetros químicos, el pH se encuentra fuertemente ligado a las diferentes interacciones electrostáticas del coloide en suspensión. Al modificar el pH se generan variaciones en el potencial Z que rige la estabilidad de la emulsión. Por lo tanto, al disminuir el potencial eléctrico Z en la superficie interfacial de las partículas suspendidas, éstas pueden acoplarse o aglomerarse generando una separación de fases. En cambio, si el potencial Z aumenta, las partículas suspendidas se repelerán, generando una emulsión más estable. Cuando se trabaja con dispersiones proteicas es importante considerar su punto isoeléctrico, debido a que, a cierto valor de pH el potencial Z es cero, provocando la precipitación de las macromoléculas. (Calero, et al., 2013)

En la industria las emulsiones son ampliamente utilizadas, principalmente para encapsular nutrientes, saborizantes, aromatizantes, activos químicos, fármacos, aceites esenciales, etc. Una ventaja significativa es la posibilidad de obtener micelas de tamaños micro u nanométricos, con componentes activos encapsulados por polímeros o biopolímeros, facilitando así la obtención de materiales nanotecnológicos. (Xavier M., et al., 2011)

### **1.3 Encapsulación**

La necesidad creciente en el mercado por productos de origen natural que coadyuven a mantener la salud y a retrasar los efectos del envejecimiento prematuro, lleva a la industria y a la ciencia al desarrollo constante de productos funcionales, fármacos o materiales que contribuyan a esto. Existe la problemática de que el componente activo incorporado al producto funcional, sufra daño durante el proceso de elaboración, almacenamiento y

transporte, obteniéndose un beneficio menor o casi nulo en el cuerpo humano. (*Xavier M., et al., 2011*)

La encapsulación es uno de los procesos más utilizados para conservar y proteger estos compuestos activos en numerosos productos alimenticios, farmacéuticos, químicos y cosméticos; Ésta técnica consiste en utilizar un agente acarreador o encapsulante capaz de formar una película químicamente compatible y no reactiva con el núcleo, logrando así un revestimiento resistente, impermeable o con permeabilidad controlada, que permita estabilizar al agente activo, separándolo de componentes reactivos o incompatibles. (*Sandoval Aldana, et al., 2004*)

La calidad de la encapsulación está ligada a las propiedades del material de recubrimiento, entre ellas:

- No reactivo con el agente activo.
- Soluble bajo las condiciones donde se desea liberar el material encapsulado.
- Protección efectiva del activo bajo condiciones adversas de luz, pH, presencia de oxígeno, humedad y otros que pudieran dañarlo.
- Insípido, incoloro e inodoro.
- Bajo costo

(*Sandoval Aldana, et al., 2004*)

Existe una amplia diversidad de agentes encapsulantes de origen sintético o natural, siendo estos últimos los de mayor demanda, debido a sus propiedades de biocompatibilidad y degradabilidad. En la industria de los alimentos y la farmacéutica, los más utilizados se muestran en la Figura 1-3.

Gomas	•Goma arábica, Alginato de sodio, Carragenina
Carbohidratos	•Almidón, maltodextrinas, sacarosa, jarabe de maíz, ciclodextrinas.
Celulosas	•Carboximetil celulosa, metil celulosa, etil celulosa, nitrocelulosas, acetilcelulosa.
Lípidos	•Cera, parafina, aceites y grasas.
Materiales inorganicos	•Sulfato de calcio, silicato.
Proteínas	•Gluteína, caseína, gelatina, albúmina.

Figura 1-3 Agentes encapsulantes de origen natural.

El método de encapsulación se selecciona con base en el costo del proceso, el tamaño de cápsula deseado, las propiedades físicas y químicas de los materiales a utilizar y en el mecanismo de liberación deseado. Los métodos se catalogan en físicos o fisicoquímicos, algunos de ellos se observan en la Figura 1-4. (Gibbs, et al., 1999)

Métodos físicos	Métodos fisicoquímicos
• Secado por aspersión, liofilización, extrusión, recubrimiento por lecho fluidizado, co-crsita, enfriamiento por aspersión, extrusión-fusión.	• Coalescencia, inclusión molecular, encapsulación por liposomas.

Figura 1-4 Métodos de encapsulación.

Constantemente se está en búsqueda de nuevas alternativas para la generación de nanomateriales que permitan la encapsulación de agentes activos y faciliten su incorporación en medios adversos. Uno de los procesos que recientemente se ha estudiado es el electrohilado, pues ha permitido la generación de micro y nanofibras de polímeros con encapsulación de nutrientes, aceites esenciales y componentes activos (Burger, et al.,

2006); Siendo esta técnica una alternativa viable para el desarrollo de nanomateriales con aplicaciones en productos funcionales, empaques inteligentes, fármacos, etc.

A continuación, se describirá el proceso de electrohilado y sus variables más importantes a considerar para el control y obtención de micro y nanofibras.

## 1.4 Electrospinning

Existen diversos métodos utilizados para la obtención de micro y nanofibras, pero la técnica de electrospinning o electrohilado, ha recibido una especial atención en los últimos años debido a su versatilidad, a su gran potencial de aplicación en diversos campos de la ingeniería, siendo posible la obtención de velos de fibras en forma continua, siendo escalable a nivel industrial. Las fibras de micro y nanoescala ofrecen muchas ventajas, como una mayor superficie o área de contacto por unidad de volumen, mayor porosidad y sobre todo la facilidad de manipular su composición para obtener las propiedades fisicoquímicas requeridas en base al polímero seleccionado para su formación (*Nandana & Subhas C., 2010*).

El proceso de hilatura por electrospinning consiste en la aplicación de un potencial eléctrico de alto voltaje, en los rangos de 10 a 35 KV aproximadamente entre el inyector y el colector del equipo. La emulsión polimérica contenida en el inyector, genera una gota a su salida cargada positivamente, ésta se ve afectada por el campo eléctrico desarrollado por la carga negativa del colector situado frente al inyector conectado a la carga positiva; Al superarse la tensión superficial de la gota debido a la fuerza de arrastre del campo eléctrico, ésta se deforma logrando una forma convexa llamada cono de Taylor. Cuando las fuerzas de atracción y repulsión del sistema sufren inestabilidad, el cono de Taylor se invierte dando origen a las fibras que viajan helicoidalmente hasta el colector, ver Figura 1-5. Las fibras obtenidas se clasifican como micro o nanométricas dependiendo del diámetro logrado. (*Prasanth, et al., 2012*)

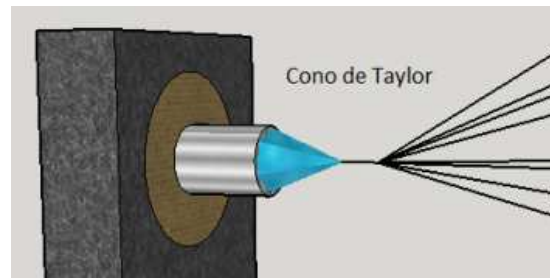


Figura 1-5 Formación de un cono de Taylor en el capilar.

El proceso de Electrospinning se encuentra gobernado por tres aspectos: Las características de la solución, las variables del proceso y el ambiente, todas estas actuando de forma conjunta, ver Figura 1-6.



Figura 1-6 Aspectos que gobiernan el proceso de electrospinning.

Cada uno de estos aspectos, tiene variables de control que generan cambios en las características de las fibras. En la Tabla 1-1, se resumen los efectos en las fibras que experimentalmente se han podido observar respecto a los cambios en las variables. (Nagihan, et al., 2014)

Tabla 1-1. Variables y parámetros que influyen en el proceso de electrospinning y sus efectos.

Fuente: (Duque Sánchez, et al., 2013)

Aspectos	Variable de control	Efecto	Variable de respuesta
Solución	Concentración	El aumento en la concentración eleva la viscosidad de la solución y por consecuencia el diámetro de la fibra. Por el contrario, si la solución es poco concentrada, ésta rompe en gotas generando una inestabilidad en el cono de Taylor impidiendo su electrohilado.	Tamaño y morfología de la fibra
	Tensión superficial	Depende del polímero y del disolvente, al ir reduciéndose se disminuye la posibilidad de formación de gotas y se favorece la formación del cono de Taylor.	Uniformidad del velo
	Conductividad	Experimentalmente se ha demostrado que al aumento de la conductividad se disminuye el diámetro de las fibras.	Diámetro de la fibra
	Efecto dieléctrico del disolvente	Cuando se cuenta con una constante dieléctrica elevada, se reduce la posibilidad de generarse gotas en las fibras y el diámetro de estas se disminuye.	Formación de la fibra
Proceso	Voltaje	Parámetro de gran importancia, debido a que un alto voltaje favorece la formación de fibras más delgadas y evita la formación de gotas.	Diámetro de fibra
	Flujo de salida	Un bajo flujo de salida permite que se genere el cono de Taylor estable en el sistema, evaporando el solvente de forma gradual, evitando la formación de defectos en la fibra. Al aumentarse el flujo de salida, el diámetro de la fibra también se eleva.	Uniformidad del velo
	Distancia Inyector vs. Colector	Está ligada a las propiedades de la solución y debe determinarse una distancia ideal, ni muy cerca o muy lejos que origine daños en la estructura o rompimiento de las fibras.	Morfología de las fibras
Ambientales	Humedad	Al aumentarse la humedad se favorece la existencia de poros circulares en la superficie de las fibras.	Uniformidad del velo

Las partes básicas que integran a un equipo de electrospinning consisten de un dosificador, inyector, dos fuentes de alto voltaje de alto voltaje y colector. Su ordenamiento o configuración da origen a dos tipos de ensamble utilizados comúnmente, el primero de ellos es el mostrado en la Figura 1-7 y recibe el nombre de electrospinning horizontal.

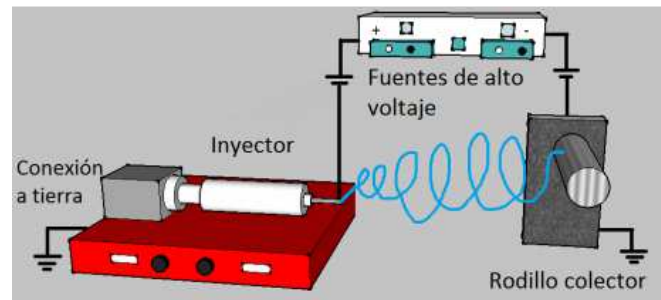


Figura 1-7 Esquema de instalación para electrospinning horizontal.

En el ensamble vertical mostrado en la Figura 1-8, el campo eléctrico se favorece por la gravedad generando fibras muy finas, pero con una distribución mayor entre sus diámetros. En cambio, en la configuración horizontal, los diámetros encontrados son un poco mayores en comparación con el esquema vertical, pero la distribución del tamaño del diámetro es menor y más uniforme. (Yang, et al., 2009)

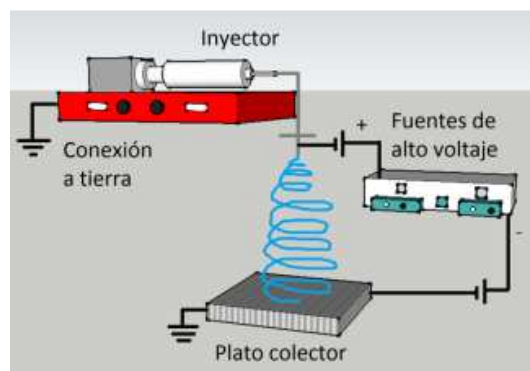


Figura 1-8 Esquema de instalación para electrospinning vertical.

El equipo de Electrospinning utilizado en este proyecto sigue la configuración horizontal que se muestra en la Figura 1-7, permitiendo enredar las micro y nanofibras hasta formar un velo.

Es fundamental considerar la física del campo eléctrico que se presenta entre el inyector y el colector del equipo de Electrospinning; Debido a que la fuerza electrostática es la que domina el proceso, el campo eléctrico que actúa sobre la gota de solución polimérica arrastra las fibras en dirección axial o tangencial según sea la configuración del equipo (Deitzel, et al., 2001)

Figura 1-9 En la Figura 1-9 se presenta la forma del campo eléctrico para los tipos de colector. Si el sistema es de aguja-rodillo colector, el campo eléctrico simulará una parábola

tridimensional bajo la cual viajará la solución polimérica del inyector hacia el colector. Si el sistema cambia a un colector de placa, el campo eléctrico se describirá como una elipse tridimensional entre el inyector y el colector. (Sahay, et al., 2011)

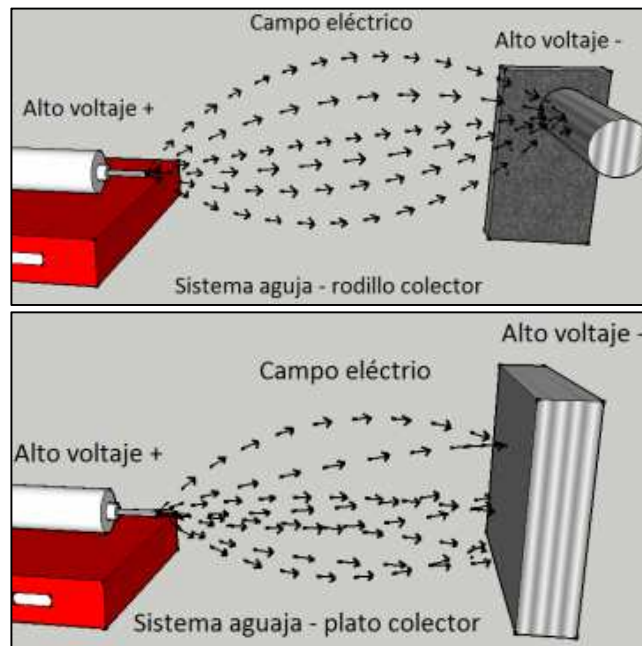


Figura 1-9 Configuración del campo eléctrico en equipos de electrospinning.

Estos campos tridimensionales deben ser considerados en el diseño del equipo; Por lo cual se debe colocar la aguja a una altura aproximadamente de 15 a 25 cm de la base en la cual esta soportada, de igual forma esto aplica para el colector cuando se diseña un equipo de electrohilado en forma horizontal; Todo esto con la finalidad de no interferir en la formación del campo eléctrico.

La técnica de Electrospinning está restringida a polímeros con propiedades físicas y químicas que permitan la formación de fibras resistentes, elásticas y duraderas. Una característica especial que presentan los polímeros es su propiedad dieléctrica, que, al ser sometidos a un campo eléctrico, sufren un arreglo de dipolos eléctricos microscópicos entre cargas positivas y negativas. (Frenot & Chronakis Ioannis, 2003)

Entre el conjunto de parámetros de la solución polimérica a hilar depende de sus características como densidad, conductividad, pH y peso molecular; Así como de las posibles combinaciones y concentraciones polímero-disolvente.

Existe una amplia variedad de polímeros utilizados en la fabricación de micro y nanofibras por Electrospinning. Pero los polímeros de origen natural presentan la ventaja de ser biocompatibles e inmunogenicidas en comparación con los sintéticos. Dentro de los polímeros de origen natural más utilizados se encuentra el colágeno, la elastina, la seda, la gelatina, etc. (Nandana & Subhas C., 2010). En la Tabla 1-2 se enlistan algunas de las investigaciones efectuadas con biopolímeros electrohilados, las cuales han servido como base para establecer las condiciones de operación de este proyecto.

Tabla 1-2 Lista de proyectos de electrospinning que utilizaron gelatina.

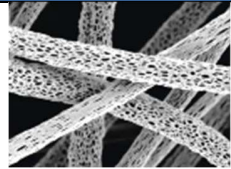
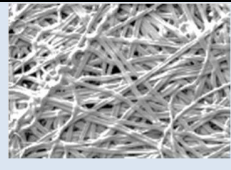
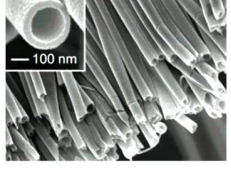
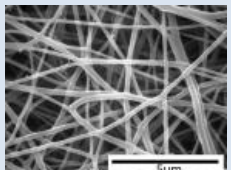
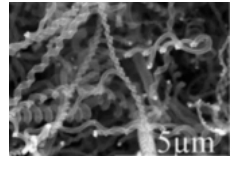
Polímeros	Uso de fibras	Condiciones de operación	Referencia bibliográfica
Gelatina y poly-caprolactone	Farmacéutico	Solución al 10% p/v Flujo de inyección de 1ml/h Voltaje aplicado de 3, 5 y 8 KV	(Yanzhong, et al., 2004)
Gelatina	Alimenticio	Solución de 7 a 20 % p/v Flujo de inyección de 0.1 y 1 ml/h Voltaje aplicado 28 y 35 KV	(Nagihan, et al., 2014)
Gelatina y alcohol poli-vinílico	Empaque	Soluciones al 10% p/v Flujo de inyección de 0.5 ml/h Voltaje aplicado 15, 20 y 25 KV	(Jia Horng, et al., 2015)
Gelatina	Biomédico	Soluciones de 2.5 a 15% p/v Flujo de inyección de 0.8 ml/h Voltaje aplicado de 10 a 16 KV	(Zheng-Ming, et al., 2003)

En este proyecto se utilizó un equipo de Electrospinning horizontal, que permitió producir de forma continua fibras con diámetros cien veces inferiores a los métodos convencionales. Dichas fibras se depositan sobre el rodillo colector formando una membrana o malla no tejida llamada velo de nanofibras.

## 1.5 Nanofibras

Las nanofibras poseen diferentes características morfológicas y por consiguiente propiedades diferenciadas. Estas diferencias se originan al modificar algunas variables en el proceso de electrohilado, generando nanofibras porosas, planas, huecas, ramificadas y helicoidales. (Burger, et al., 2006). En la Tabla 1-3 se describen los procesos para su obtención.

Tabla 1-3. Clasificación de las micro y nanofibras obtenidas por electrospinning.

Nombre	Origen	Forma
Porosa	Sus poros se generan cuando el solvente utilizado en la disolución del polímero es termodinámicamente inestable y al someterse a un campo eléctrico coexiste en dos fases con el polímero, una líquida y otra gaseosa durante su evaporación. (Lei & You-Lo, 2006)	
Planas	Se dan principalmente en los polímeros de alto peso molecular, debido a que, al impactarse la fibra en el colector, ésta se aplana. (Deng-Guang, et al., 2014)	
Huecas	Esta estructura se logra utilizando un cabezal de electrohilado coaxial del tipo tubo-coraza. El polímero se inyecta por la coraza y por el tubo interno va un compuesto inmiscible con el polímero y de fácil eliminación; Normalmente se utilizan aceites minerales. (Li, et al., 2005)	
Ramificadas	Cuando se ejerce un balance adecuado entre las fuerzas electrostáticas y la tensión superficial de la disolución del polímero, se puede lograr que a partir de los chorros primarios se formen ramificaciones antes de llegar al colector. (Zheng-Ming, et al., 2003)	
Helicoidales	Para la obtención de nanofibras en espiral, se utiliza una mezcla de al menos dos tipos de polímeros y uno de ellos deberá ser conductor. El diámetro del bucle se controlará mediante la concentración del polímero conductor en la mezcla. (Yu, et al., 2008)	

Actualmente no existen trabajos experimentales reportados, en los cuales se utiliza a la gelatina como material encapsulante de componentes activos y posteriormente se electrohila para obtener micro y nanofibras. Por lo tanto, los parámetros y las variables importantes a controlar para su electrohilado no están totalmente definidos y por ello es fundamental entender la naturaleza y las propiedades de dicho biopolímero para garantizar la formación de las fibras y obtener una morfología adecuada en el nanomaterial.

## 1.6 Material encapsulante: Gelatina

En este proyecto se trabajó empleando la gelatina como el material encapsulante y protector del alfa-tocoferol, debido a que posee propiedades de hilatura adecuadas, flexibilidad, emulsificante, biocompatibilidad y de bajo costo. La gelatina es una proteína de origen animal que se fabrica comercialmente a partir de un proceso de hidrólisis parcial del colágeno extraído de pieles, cartílagos y esqueletos de especies bovinas, porcinas y peces. (*Gelita, 2011*).

La gelatina está compuesta por tres cadenas de 18 aminoácidos diferentes, también llamados monómeros de tropocolágeno entrelazados en forma helicoidal, en la Tabla 1-4 se muestra la composición por tipo de aminoácido. La gelatina posee las características de ser incolora, insípida y translúcida. Está formada por monómeros unidos repetitivamente mediante enlaces glucosídicos.

Su peso molecular promedio oscila entre 20,00 y 100,000 g/mol dependiendo del grado de hidrolización. La naturaleza de sus monómeros y la secuencia de su cadena proteica determinan sus propiedades físicas como es solubilidad en agua o en solventes orgánicos polares, su posibilidad de formar geles a una temperatura ambiente (18 °C) y durante el calentamiento ( $T > 30^{\circ}\text{C}$ ) estar en fase líquida. (*Gelita, 2011*)

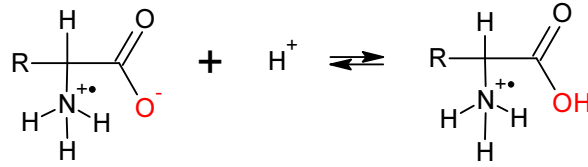
Tabla 1-4 Composición de aminoácidos por tipo de gelatina.

Aminoácido esencial	Gelatina Tipo A (Piel porcina)	Gelatina Tipo B (piel bovina)
Glicina	24%	23%
Prolina	14%	13%
Hidroxiprolina	12%	11%
Ácido glutámico	10%	9%
Alanina	8%	9%
Arginina	7%	7%
Ácido aspártico	5%	6%
Lisina	4%	4%
Serina	3%	3%
Leucina	3%	3%
Valina	2%	3%
Fenilalanina	2%	2%
Treonina	2%	2%
Isoleucina	1%	1%
Hidroxilisina	1%	1%
Histidina	1%	1%
Metionina	1%	1%
Tirosina	1%	1%
Cistina	Trazas	Trazas

La gelatina se clasifica como hidrocoloide debido a que puede coagular y gelificar, mediante la formación de redes estructuradas matricialmente entre el soluto y el solvente. Cabe mencionar que es el único biopolímero anfótero proteico, que puede reaccionar como un ácido o como una base dependiendo del pH de la solución. (García Ceja & López Malo, 2012).

Esta conducta anfótera de la gelatina es debida a la presencia de grupos funcionales, aminos y carboxilos terminales en su estructura molecular, ver Figura 1-10. En medios ácidos con altas concentraciones de iones  $H^+$ , la gelatina posee carga positiva, en cambio en medios alcalinos con presencia de iones  $OH^-$ , la gelatina tiene carga negativa, lo que define su propiedad anfótera.

### Comportamiento como base



### Comportamiento como ácido

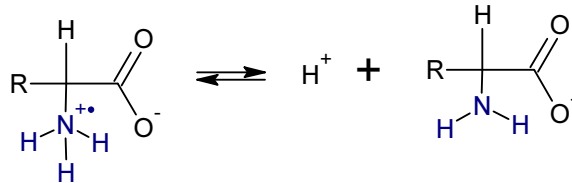


Figura 1-10 Comportamiento ácido y básico de los aminoácidos.

Los aminoácidos contenidos en la gelatina como la glicina, alanina, prolina e hidroxiprolina, con grupos aminos y carboxilos en el grupo R, proveen a la estructura molecular una característica polar y por ende su solubilidad en agua y ácido acético, ver Figura 1-11.

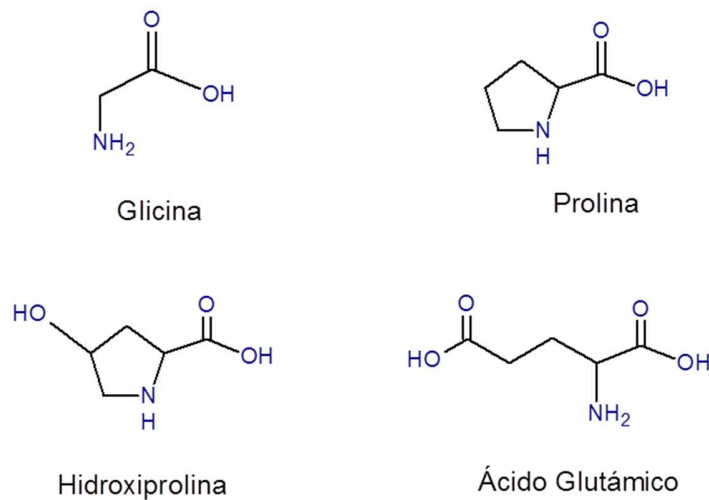


Figura 1-11 Moléculas de los principales aminoácidos presentes en la gelatina.

Mientras que aminoácidos con cadenas lineales en el grupo R, le aportan su característica apolar, permitiendo su interacción con sustancias oleosas o no polares.

La gelatina se clasifica en dos tipos, en base al tipo de tratamiento químico efectuado para su obtención:

- a) Gelatina Tipo A: Se elabora a base de piel de cerdo mediante un proceso tipo ácido y presenta un punto isoeléctrico que oscila de 6 a 9.5, esto debido a que posee de 78 a 80 millones de grupos carboxilos libres por cada 100 gramos de proteína.
- b) Gelatina Tipo B: Se fabrica a base de piel de bovino y mediante un proceso alcalino, en el cual se eliminan la mayoría de los grupos amino en su cadena, dejando de 100 a 115 millones de grupos carboxilos libres por cada 100 gr de proteína. Su punto isoeléctrico es menor, oscilando entre 4.5 y 5.6. *(Sigma-Aldrich, 2011)*

El punto isoeléctrico es una propiedad intrínseca de las proteínas, cuando las condiciones de pH de la solución permiten llegar al punto isoeléctrico, las cargas positivas de los radicales amino ( $\text{NH}_3^+$ ) igualan a las cargas negativas de los radicales carboxilo ( $\text{COO}^-$ ), generando diferentes atracciones electrostáticas en la molécula con afectaciones en sus propiedades físicas como:

- a) Valores mínimos de hidratación, viscosidad y carga eléctrica.
- b) Valores máximos en turbidez, fuerza de gel y poder de espumado.

*(García Chávez & Mendoza Martínez, 2010)*

La gelatina es considerada un coloide hidrofílico, por lo que se diluye fácilmente en el agua, sus moléculas son atraídas a las moléculas del agua mediante fuerzas de London y enlaces puente hidrógeno, lo que facilita la formación de emulsiones, suspensiones y geles. *(GMIA, 2012)*

Investigaciones enfocadas en el desarrollo de nanomateriales por electrospinning han demostrado que no es posible la fabricación de micro y nanofibras de gelatina al disolverla en agua, debido a que la viscosidad de la solución disminuye considerablemente y su tensión superficial aumenta debido a los puentes hidrogeno presentes en solución.

Generando problemas en la obtención de fibras uniformes, por lo tanto, se ha recurrido al uso de solventes orgánicos polares como el ácido acético, para formular soluciones poliméricas con menor tensión superficial y mayor viscosidad, aumentando la factibilidad para la generación de fibras micro y nanométricas. (Nagihan, et al., 2014)

## 1.7 Solvente: Ácido acético

En este trabajo de investigación se ha optado por el uso del ácido acético ( $C_2H_4O_2$ ) como solvente. Líquido incoloro, con punto de ebullición de 118 °C y punto de fusión de 16.6°C, densidad de 1.049 g/ml y constante dieléctrica moderada de 6.2 (Avantor Performance Materials, 2011). Entendiéndose como constante dieléctrica a la capacidad que tiene el solvente para reducir las fuerzas de atracción existentes entre las partículas de cargas opuestas, o en el caso contrario de reducir la repulsión entre partículas de cargas iguales, disminuyendo la tensión superficial de la solución polimérica. (Yanzhong, et al., 2004)

El ácido acético también conocido como ácido metilcarboxílico, posee un grupo carboxílico en su estructura, ver Figura 1-12. Ácido que se encuentra en el vinagre al que le proporciona las características de sabor y olor agrios.

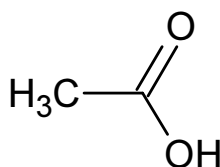


Figura 1-12 Estructura plana del ácido acético.

Es considerado un ácido débil debido a que en disolución acuosa y a un pH moderado de 4.8 condición en la cual sus moléculas han perdido el protón de su grupo carboxilo formando una base conjugada, con un pKa de 4.8 a 25°C, ver Figura 1-13.

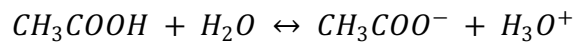


Figura 1-13 Disociación del ácido acético.

Ha sido utilizado ampliamente como aditivo regulador de la acidez, como condimento en la industria alimentaria o como agente solvente para antimicrobianos en la cosmetología. Su uso está aprobado en muchos países como Canadá, Unión Europea, Estados Unidos, Australia, Nueva Zelanda y México. (*Avantor Performance Materials, 2011*).

## 1.8 Componente activo: Alfa tocoferol

La Vitamina E también conocida como Alfa tocoferol es liposoluble, por lo tanto, es miscible en medios grasos, es sensible al calor y a la oxidación. Debido a que es una molécula no polar poco soluble en agua y muy sensible a reacciones de fotooxidación, dificulta su incorporación en alimentos o productos industrializados sin sufrir daño, requiriéndose diseñar un mecanismo que impida su degradación y facilite su incorporación en productos funcionales, productos cosmetológicos o materiales de empaque.

Recientes innovaciones en el desarrollo de nanomateriales han permitido la protección de micronutrientes como el Alfa tocoferol por técnicas de encapsulación en membranas permeables de origen orgánico, mayormente bajo estructuras esféricas a escala micro y nanométrica. (*Hernández Jaimes, 2009*).

La vitamina E se conforma dos estructuras primarias, un anillo complejo cromano y una larga cadena lateral, ver Figura 1-14. Está formada por ocho vitámeros que se dividen en 2 grupos fundamentales: 4 tocoferoles y 4 tocotrienoles que se diferencian en la saturación de la cadena lateral; los tocoferoles tienen una cadena saturada y los tocotrienoles una insaturada con 3 dobles enlaces en los carbonos 3, 7 y 11. Dentro de cada grupo, los vitámeros difieren en el número y posición de los grupos metilo en el anillo cromano, designándose como  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ . Siendo la estructura alfa la más utilizada comercialmente.

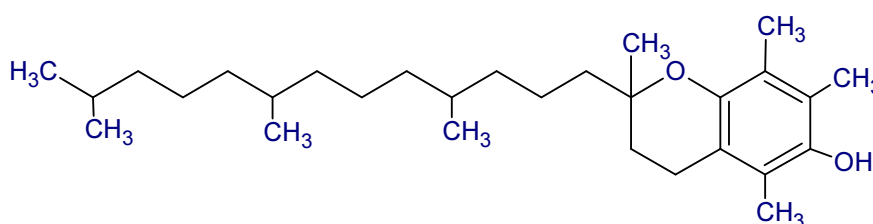


Figura 1-14 Molécula de alfa-tocoferol.

La vitamina E es un micronutriente importante para la vida, pero sus necesidades de consumo en el humano son pequeñas, por lo que su incorporación en alimentos funcionales es regulada por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, el cual establece que la ingesta diaria recomendada no debe exceder los 10 mg en adultos como consumo diario.

Nutricionalmente, el alfa tocoferol es el representante más importante del grupo de compuestos con actividad de vitamina E, ya que evita el daño celular por la inhibición de la peroxidación de lípidos, la formación de radicales libres, enfermedades cardiovasculares, mejora la circulación sanguínea, regenerar tejidos y es útil en el tratamiento de senos fibroquísticos y síndrome premenstrual. (Blé-Castillo, et al., 2008)

En base a la información mencionada con anterioridad, en este trabajo de investigación se pretende el desarrollo de fibras micro y nanométricas que posean alfa-tocoferol encapsulado en Gelatina.

## 2 Capítulo II: Metodología.

### 2.1 Materiales

Los materiales que se utilizaron para el desarrollo de este trabajo de investigación se presentan en el Tabla 2-1 con su respectiva utilidad.

Tabla 2-1 Materiales a emplear en la experimentación.

Material	Actividad
Alfa-tocoferol	Encapsulado
Ácido acético	Solvente
Agua destilada	Solvente
Gelatina tipo A y B	Encapsulante
Nitrato de Potasio	Isotermas de adsorción $a_w = 0.940$
Cloruro de Potasio	Isotermas de adsorción $a_w = 0.843$
Cloruro de Sodio	Isotermas de adsorción $a_w = 0.753$
Nitrito de Sodio	Isotermas de adsorción $a_w = 0.654$
Nitrato de Magnesio	Isotermas de adsorción $a_w = 0.529$
Carbonato de Potasio	Isotermas de adsorción $a_w = 0.432$
Cloruro de Magnesio	Isotermas de adsorción $a_w = 0.328$
Acetato de Potasio	Isotermas de adsorción $a_w = 0.225$
Papel aluminio	Material de soporte para colector
NaOH Hidróxido de Sodio	Ajustador pH
HCL Ácido sulfúrico	Ajustador pH

## 2.2 Equipos

Los equipos empleados en las tres etapas experimentales de este proyecto se presentan en la Tabla 2-2.

Tabla 2-2 Equipos utilizados para la investigación y su función.

Equipo	Función
Balanza analítica	Peso de ingredientes
Batidora de inmersión	Homogenización de la emulsión
Medidor portátil de pH, conductividad y temperatura	Caracterización de emulsiones
Reómetro	Análisis reológico de las emulsiones
Electrospinning	Obtención de micro y nanofibras
Microscopio Electrónico de Barrido	Determinación de morfología en las fibras
Calorímetro	Caracterización térmica de fibras
Higrómetro	Valoración de la actividad de agua en las fibras
Micro-balanza	Peso de las muestras
Espectrofotómetro de infrarrojo	Identificación de grupos funcionales en fibras
Sonicador	Rompimiento y activación de fibras
Estufas	Isotermas de adsorción
Cámara de UVC	Radiación de luz UV sobre las fibras
Espectrofotómetro	Determinación de color en fibras

El trabajo experimental se desarrolló de acuerdo al diagrama de flujo (Figura 2-1). Posteriormente se describirá con mayor detalle el trabajo experimental realizado en cada etapa.

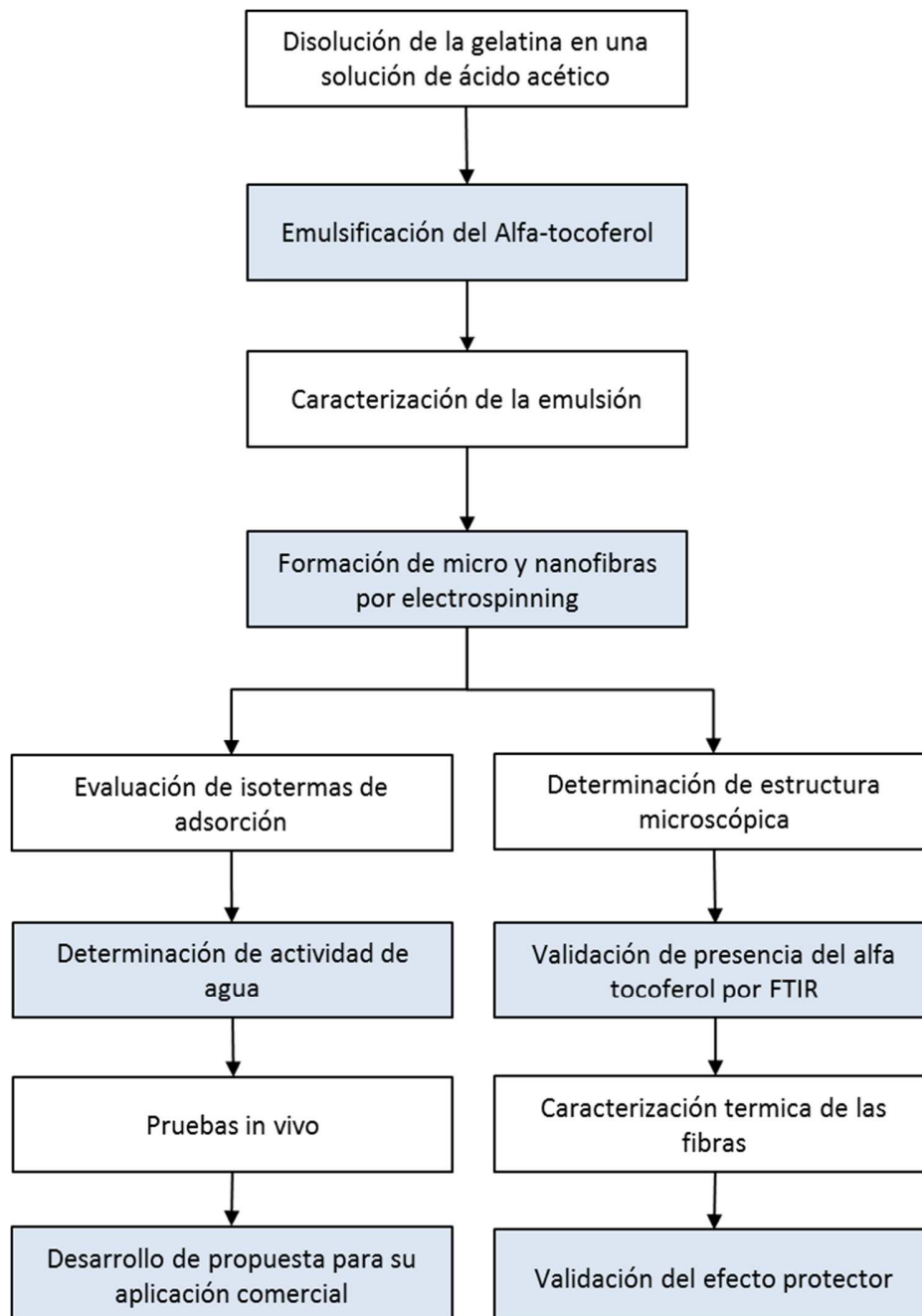


Figura 2-1 Metodología experimental de esta tesis.

### 2.3 Encapsulación del alfa-tocoferol en emulsiones de gelatina.

Para los ensayos de encapsulación se usó Alfa-tocoferol (Sigma-Aldrich, T3251-25G, E.U.A.) y como materiales encapsulantes se emplearon la Gelatina Tipo A (Sigma-Aldrich, G1890-100G, E.U.A.) y la Gelatina Tipo B (Sigma-Aldrich, G9391-100G, E.U.A.) ambas en grado reactivo. Como solvente se utilizó ácido acético glacial (Meyer, 0040-500ml, México) y agua destilada (Domarco del Valle de Puebla, México). Para la obtención de las micro y nanofibras se prepararon emulsiones compuestas por alfa-tocoferol, gelatina (Tipo A o B), ácido acético y agua destilada cuya composición se estableció empleando el siguiente diseño experimental:

Tabla 2-3 Distribución de emulsiones para el diseño experimental.

Objetivo	Código	Gelatina Tipo A (g)	Gelatina Tipo B (g)	Alfa-tocoferol (% v/v)	Ácido acético (%v/v)	Agua destilada (%v/v)
Etapa 1:  Selección de Gelatina	A1	20		5	20	55
	A2	22		5	20	53
	A3	24		5	20	51
	B1		20	5	20	55
	B2		22	5	20	53
	B3		24	5	20	51
Etapa 2:  Efecto de % Gelatina % Solvente	A1-15	18		5	20	57
	A2-15	20		5	20	55
	A3-15	22		5	20	53
	A4-15	18		5	30	47
	A5-15	20		5	30	45
	A6-15	22		5	30	43
Etapa 3: % Alfa-tocoferol	A7-15	22		7.5	30	41
	A8-15	22		10	30	38

Las soluciones se prepararon dispersando la gelatina en una solución de ácido acético y agua destilada, con un agitador de hélice a 600 rpm y a una temperatura de  $90 \pm 1^\circ\text{C}$ , durante 1 hora. Posteriormente cuando la temperatura descendió a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  se incorporó el alfa-tocoferol emulsificandose por agitación mecánica con una batidora de inmersión de 250 watts durante 5 minutos hasta lograr la homogenización.

## 2.4 Pruebas fisicoquímicas de las emulsiones.

A las emulsiones se les determinaron los siguientes parámetros:

- Potencial de hidrógeno (pH)
- Conductividad (mS)
- Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )

Estas evaluaciones se llevaron a cabo por triplicado y se usó el equipo Conductronic modelo PC18 (México).



Figura 2-2 Conductronic modelo PC18.

## 2.5 Análisis reológico de las emulsiones.

La viscosidad de las emulsiones es un parámetro relevante, ya que define la posibilidad de formación de las micro y nanofibras, éste parámetro fue evaluado mediante un Reómetro de Anton Paar modelo RheolabQC (EUA) (Figura 2-3), a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , utilizando la configuración de cilindros concéntricos DG24 y el software Star Rheoplus (EUA). Con la finalidad de determinar el comportamiento reológico de las emulsiones, se analizaron las muestras a velocidad de corte constante de  $2.99 \text{ 1/s}$  en un tiempo de 10 a 100 s. La viscosidad se determinó con el promedio ponderado del valor obtenido para un rango 0.09 a 10 (1/s) de la velocidad de corte, siguiendo a la metodología recomendada en la literatura. (Nagihan, et al., 2014).



Figura 2-3 Equipo RheolabQC Anton Paar.

## 2.6 Proceso de electrohilado.

Las soluciones se vertieron en el depósito de inyección del equipo de electrospinning a una temperatura ambiente de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ . Las condiciones en el equipo fueron, voltaje de  $15 \pm 1 \text{ KV}$  en cada una de las fuentes de alto voltaje, una velocidad de alimentación de  $0.1 \text{ ml/h}$  por 30 minutos, velocidad del colector a  $200 \pm 10 \text{ RPM}$  y se usó una distancia de  $12 \pm 1 \text{ cm}$  entre el inyector y el colector. (Nagihan, et al., 2014).

El equipo de electrospinning utilizado en este experimento (Figura 2-4), fue desarrollado por un proveedor mexicano llamado PRENDO y cumpliendo las indicaciones de diseño del equipo de Maestría Santacruz que permitieran:

- Versatilidad para el uso de polímeros.
- Control de las variables más significativas en el proceso.
- Seguridad



**Figura 2-4** Equipo de Electrospinning PRENDO

Las fuentes de alto voltaje del equipo (Figura 2-5) se pueden regular de forma independiente, tanto la carga positiva (A), como para la negativa (B) en un rango de 0 a 30 KV cada una. Como se encuentran conectadas en serie, sus voltajes se suman y por lo tanto el campo de alto voltaje bajo el cual se puede operar el equipo de electrohilado va de 0 a 60 KV.



Figura 2-5 Fuentes de alto voltaje del equipo electrospinning PRENDO

Además, la base del inyector es movable, las distancias que pueden emplearse son 4, 8, 12, 16 y 20 cm del inyector al colector, de acuerdo a la necesidad del experimento.

En la parte baja del equipo (Figura 2-6) se encuentran los controladores de encendido/apagado general (A), uno para la velocidad de giro del colector (B) el cual tiene un rango de 0 a 100 RPM y el regulador de velocidad para el movimiento horizontal del inyector (C), pudiéndose variar de 0 a 100 RPM.



Figura 2-6 Controladores inferiores del equipo electrospinning PRENDO.

## 2.7 Determinación morfológica de las fibras por SEM.

La estructura de las micro y nanofibras se determinó mediante Microscopía Electrónica de Barrido. El microscopio que se empleó para la caracterización es un MEB de bajo vacío, modelo JSM-5300 (EUA) con una diferencia de potencial de 10KV, detectando electrones retro-dispersados y con ampliificaciones de 5,000, 10,000 y 20,000X. (Figura 2-7).

Debido a que la muestra que se analiza por MEB debe estar seca y ser conductora; La humedad no es problema para los velos de nanofibras, pues durante el electrohilado todo el solvente se evapora, pero debido a su origen orgánico éstas no son conductoras. Por lo tanto, fueron sometida a un recubrimiento de oro en bajo vacío llamado “sputtering “que confiere la propiedad requerida.



Figura 2-7 Microscopio Electrónico de Barrido (SEM).

Para determinar los diámetros de las fibras obtenidas, las imágenes MEB fueron analizadas mediante el software ImageJ (Versión 1, EUA). Esto con la finalidad de determinar el efecto de la concentración de la gelatina y ácido acético de las emulsiones, genera en el diámetro de las fibras obtenidas.

## 2.8 Análisis por FTIR de las fibras.

Con la finalidad de confirmar la presencia del alfa tocoferol en las fibras electrohiladas de Gelatina, se utilizó la técnica de Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier. El análisis FTIR permite identificar los grupos funcionales presentes en la muestra; Dado que la energía de radiación infrarroja es absorbida por las moléculas orgánicas, para posteriormente ser transformada en energía de vibración y rotación de forma muy característica para cada compuesto orgánico.

El espectro generado por cada molécula se caracteriza mediante bandas con intensidades clasificadas en fuertes, moderadas o débiles para la Absorbancia (A) o Transmitancia (T), así como la longitud de onda en la cual se generó; Estas señales del espectro son dependientes de las masas relativas de los átomos, las constantes de fuerza de enlace y la geometría de cada molécula.

El análisis FTIR se efectuó mediante un espectrofotómetro marca Bruker (Vertex 70, EUA); Bajo un rango espectral de 370 a 5,000  $\text{cm}^{-1}$  a temperatura de 24°C, permitiendo la generación de 60 espectros por segundo a una resolución de 16  $\text{cm}^{-1}$ . Este equipo se encuentra en el Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología de la BUAP. Se utilizó el software Origin 8 (EUA) para el análisis de resultados.



Figura 2-8 Espectrofotómetro de infrarrojo (FTIR) Vertex 70.

## 2.9 Análisis térmico de las fibras por calorimetría.

Mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido por sus siglas en inglés (DSC) se determinaron las temperaturas de transición vítrea ( $T_g$ ), cristalización ( $T_c$ ) y fusión ( $T_m$ ) de las fibras obtenidas.

Las muestras fueron depositadas en cápsulas de aluminio considerando pesos cercanos a  $0.7 \pm 0.1$  mg. Éstas capsulas no fueron selladas, pero se utilizó una tapa de cuarzo para impedir problemas de contaminación del pocillo, si es que la muestra fuera proyectada fuera de la capsula durante el proceso. Además, se empleó un flujo de gas de nitrógeno de alta pureza (99.99%) de 70 ml/min, para purgar el horno y prevenir la oxidación de la muestra. (Skoog Douglas, et al., 2008)

Dado que la finalidad de esta técnica es obtener información de la estabilidad térmica de un material, se registra la diferencia en el cambio de entalpía y flujos de calor que tiene lugar entre la muestra y la referencia (capsula vacía), ambas fueron calentadas mediante resistencias independientes, se empleó una rampa de calentamiento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  con temperatura inicial y final de 20 y  $500^\circ\text{C}$  respectivamente. El equipo DSC empleado es un equipo TA Q500 (TA Instruments, EUA). La señal es procesada mediante el software Thermal Advantage que controla el equipo. (Figura 2-9).



Figura 2-9 Calorímetro TA Q500 de TA Instruments.

## 2.10 Determinación de la actividad de agua de las fibras.

La actividad de agua de las fibras se determinó a temperatura ambiente con un higrómetro marca AQUA LAB (modelo PRE, EUA), este equipo posee una exactitud de  $\pm 0.001 a_w$  y fue previamente calibrado. Se recortaron fibras de aproximadamente  $1 \text{ cm}^2$  y se colocaron en el porta-muestra dentro del equipo. La evaluación se efectuó por triplicado.



Figura 2-10 Higrómetro marca AquaLab.

## 2.11 Evaluación de isothermas de adsorción de las fibras.

Los velos de las fibras se recortaron en rectángulos de 2 cm de largo por 1 cm de alto, siendo pesados mediante en una micro-balanza analítica marca Thermo Cahn (C-33, EUA) antes de colocarse en las atmósferas controladas, para determinar su peso inicial y al término de cada periodo de exposición, su peso final. (Figura 2-11).



Figura 2-11 Micro-balanza GAHN modelo C-33.

Posteriormente las fibras se introdujeron en atmósferas controladas con sales minerales de valores de actividad de agua  $a_w$  conocida y establecida en la Tabla 2-1 de esta tesis. Las muestras se depositaron por triplicado dentro de contenedores de vidrio sellados herméticamente (Figura 2-12) y sostenidas en estructuras perforadas que permitieron el contacto con la atmósfera de las muestras. Los periodos de medición fueron 3, 5 y 10 días hasta que se obtuvo el equilibrio y peso constante.



Figura 2-12 Atmósferas controladas para isotermas de adsorción.

## 2.12 Evaluación del perfil de disolución de las fibras.

Para determinar el perfil de disolución de las fibras, estas fueron hidratadas a temperatura ambiente en una solución buffer con pH de 7 similar al de la piel humana y sometidas a un proceso de agitación mediante ultrasonido en el equipo Sonicador marca Cole Parmer (modelo 8891, EUA), simulando el proceso de frotación en el tejido cutáneo.



Figura 2-13 Sonicador Cole Parmer modelo 8891.

Posteriormente se realizó la prueba sobre la piel humana para ver si el mecanismo de liberación funciona de igual forma, para ello se probó el material en 20 individuos siguiendo la NOM-039-SSA1.

### 2.13 Validación del efecto protector de la gelatina para la Vitamina E.

Con la finalidad de evaluar el efecto protector de la Gelatina tipo A al encapsular la vitamina E, se recortaron rectángulos de 1x2 cm de las muestras A6-15, A7-15 y A8.15, las tres muestras se colocaron en una caja Petri para posteriormente se irradiadas en la Cámara de UVC marca Prendo (CLUV-01, México) a una potencia de  $7.89 \times 10^{-4} \text{ J/s cm}^2$ .

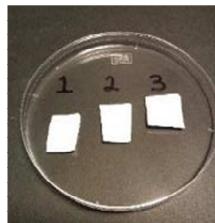


Figura 2-14 Porta muestras para radiación de UV.

Se expusieron a la radiación de luz ultravioleta durante periodos de 30, 60 y 180 min.



Figura 2-15 Cámara de UVC marca Prendo modelo CLUV-01.

Para posteriormente evaluar el cambio de color a través de un espectrofotómetro marca HunterLab (ColorFlex CD 1932, EUA) y de esta forma indirecta conocer la oxidación del alfa-tocoferol encapsulado en las fibras. El equipo fue calibrado con anticipación.



Figura 2-16 Espectrofotómetro ColorFlex CD1932 marca HunterLab.

### 2.14 Balance de materia para contenido de alfa-tocoferol final

La eficiencia de la encapsulación del alfa-tocoferol en las fibras se determinó mediante un balance de materia a partir de las concentraciones iniciales y la identificación de la pérdida de humedad durante el proceso de electrohilado de la fibra. En la Figura 2-17 se define el sistema a estudiar para determinar el porcentaje final de Vitamina E encapsulado en las fibras.

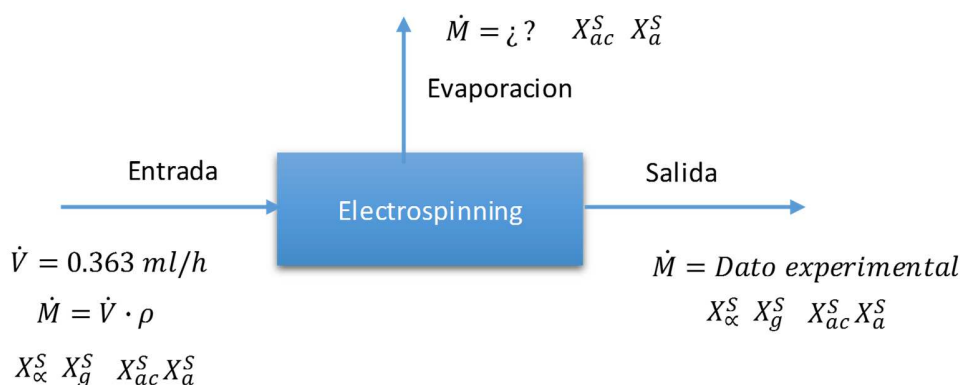


Figura 2-17 Esquema del sistema a estudiar para el balance de materia

En las ecuaciones a emplear se consideró flujos y fracciones másicas:

Balance General:

$$\text{Entrada} = \text{Evaporación} + \text{Salida}$$

Balance por componentes:

- Gelatina Tipo A  $X_g^E(\text{Entrada}) = X_g^{Ev}(\text{Evaporación}) + X_g^S(\text{Salida})$
- Alfa-tocoferol  $X_a^E(\text{Entrada}) = X_a^{Ev}(\text{Evaporación}) + X_a^S(\text{Salida})$

donde se considera que  $X_g^{Ev}$  y  $X_a^{Ev}$  son iguales a cero.

- Ácido acético  $X_{ac}^E(\text{Entrada}) = X_{ac}^{Ev}(\text{Evaporación}) + X_{ac}^S(\text{Salida})$
- Agua  $X_a^E(\text{Entrada}) = X_a^{Ev}(\text{Evaporación}) + X_a^S(\text{Salida})$

Para determinar el flujo másico experimental a la salida, primero se determinó el área total de superficie electrohilada durante 60 minutos, posteriormente se tomaron 4 muestras con un área de 3 cm<sup>2</sup> en promedio de forma aleatoria, se pesaron en una micro-balanza analítica marca Thermo Cahn (C-33, EUA) y se obtuvo un promedio de los gramos de fibra de Gelatina y alfa-tocoferol por cm<sup>2</sup> (Figura 2-18). Con este valor, se determinó experimentalmente el flujo másico total (g/h) a la salida del sistema.



Figura 2-18 Determinación de peso de fibras electrohiladas.

## 2.15 Análisis de irritabilidad en base a la NOM-039-SSA1-1993.

Debido a que una posible aplicación para los velos de nanofibras de gelatina con Vitamina E encapsulada será cosmetológica, se efectúa la prueba de sensibilización en piel humana basada en la NOM-039-SSA1-1993. Para el desarrollo de este estudio se requirió la participación de 20 voluntarios.

La aplicación de los velos de nanofibras se efectuó en parches de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup>, los cuales pesaron en promedio 0.3 g. Los parches con el material se aplicaron en la piel lateral del brazo entre el codo y la mano.

Antes de la colocación del parche, el área del brazo a tratar se limpió con agua y jabón para remover grasa superficial de la piel, eliminándose el exceso de humedad con papel. Cada voluntario participante recibió las instrucciones de mantener los parches tan secos como fuera posible y remover o desechar los parches después de 3 horas.

Una vez retirado el material fibroso del área de la piel expuesta, ésta fue evaluada a las 24, 48 y 72 hrs después de la aplicación. Para la evaluación de los sitios de prueba, éstos fueron iluminados por una fuente de luz artificial con una potencia de 100 watts. Valorándose el daño cutáneo de acuerdo con las siguientes criterios y escalas, ver Tabla 2-4 y Tabla 2-5.

### A. Evaluación de eritema:

Tabla 2-4. Escalas de evaluación para eritemas cutáneos.

Calificación	Observación
0	No Eritema
1	Eritema
2	Eritema bien definido
3	Eritema moderado a severo
4	Eritema severo (rojo betabel)
Calificación máxima posible del eritema: 4	

B. Evaluación de edema:

Tabla 2-5. Escalas de evaluación para edemas cutáneos.

Calificación	Observación
0	No Edema
1	Edema muy ligero apenas perceptible
2	Edema ligero con bordes sobresalientes con elevación definida
3	Edema moderado, con una elevación máxima de 1 mm aproximadamente
4	Edema severo, elevación mayor de 1 mm extendiéndose más allá del sitio de aplicación
Calificación máxima posible del edema: 4	

Una vez determinada la presencia de eritema y edema en la zona de la piel probada de los 20 voluntarios, se promediaron las calificaciones de cada evaluación. A partir de estos promedios, se calculó el índice de irritación primaria como la siguiente ecuación:

$$\% \text{Irritación} = \bar{X}\text{Eritema} + \bar{X}\text{Edema}$$

Con base en el Índice de Irritación obtenido, el producto podrá ubicarse en alguna de las siguientes categorías:

Tabla 2-6 Clasificación de los productos en base a su irritabilidad dérmica.

Valoración	Categoría
0 - 1	No irritante
1.1 - 2	Ligeramente irritante
2.1 - 5	Moderadamente irritante
5.1 - 6	Irritante moderado o severo
6.1 - 8	Irritante severo

Los criterios de aceptación empleados se basaron en la NOM-039-SSA1-1993. Todos los productos para uso en bebés deberán tener un índice de irritación primaria no mayor de 2. El producto que tenga un índice de irritación primaria no mayor de 5 será aceptado como un producto apto para uso en adultos. Cuando un producto obtenga una calificación entre 5.1 y 6 deberá optar por cualquiera de las tres alternativas siguientes:

- a) Ostentar la leyenda "Precaución, este producto es irritante".
- b) Repetir la prueba y si el índice de irritación primaria obtenido en la segunda prueba tiene un valor aceptable, el producto será considerado apto para uso humano.

*Nota: Los productos que tengan una calificación mayor de 6 no serán aceptados para su uso en humanos.*

### 3 Capítulo III: Resultados.

#### 3.1 Caracterización de las emulsiones

Se formaron emulsiones del material encapsulante (Gelatina Tipo A y Tipo B), solvente (Ácido acético/agua) y componente activo encapsulado (Vitamina E) siguiendo el diseño experimental establecido en la Tabla 2-3. Con el objetivo de determinar el efecto de diferentes factores físicos como composición, posibilidad de formar emulsiones y sus propiedades físicas como paso inicial para su posterior electrohilado.

La determinación de la cantidad de alfa tocoferol que fue posible emulsificar y la concentración del tensoactivo para la formación de la emulsión, se determinó de forma experimental. Los resultados de las composiciones para la formación de las emulsiones se reportan en el diagrama de fases ternario en %P/P [Figura 3-1]. Reportando que en el eje del solvente (Ácido acético/Agua) composiciones del 20 y 30%, en el eje de los sólidos emulsificantes (Gelatina) va de 18- 24% y en el eje del orgánico ( $\alpha$ -tocoferol) que va de 5 - 10%.

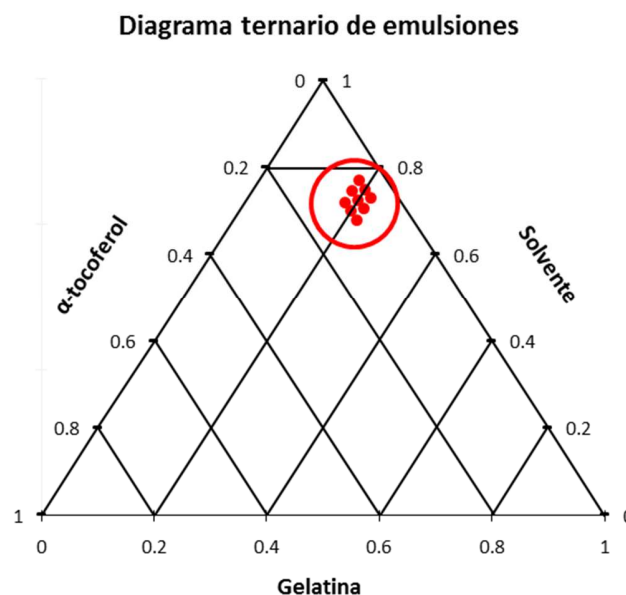
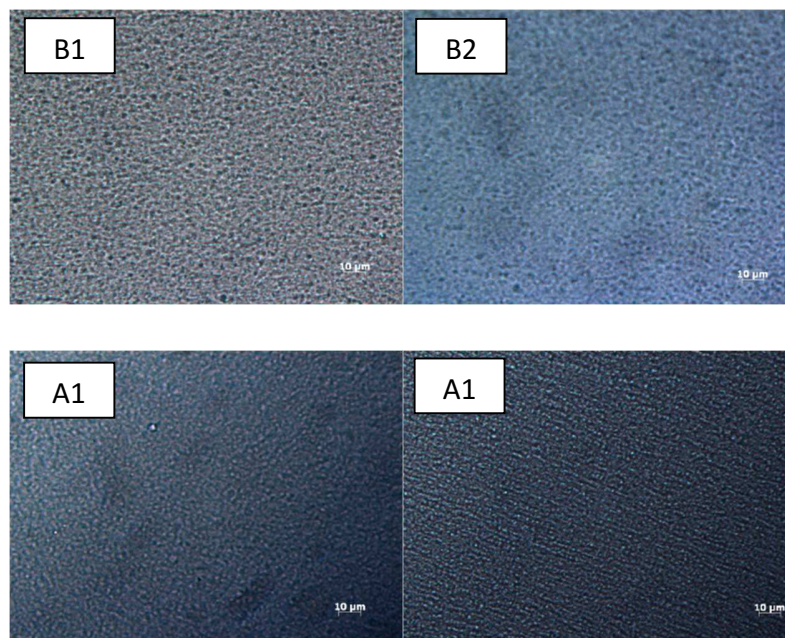


Figura 3-1 Diagrama ternario de las emulsiones estudiadas.

Es importante mencionar que todas las emulsiones preparadas fueron muy estables, pues transcurridos 6 meses de la emulsificación aún presentaban homogeneidad, sin que existiera una separación de fases o algún defecto de inestabilidad mencionado en la sección 1.2 de esta tesis. Con la finalidad de identificar el tamaño aproximado de las miscelas logradas en la emulsificación por agitación, éstas fueron analizadas por microscopio óptico. A continuación, se muestran imágenes de emulsiones probadas de gelatina tipo A, B y alfa-tocoferol, en las cuales se puede visualizar que el diámetro de las miscelas logrado cae en la escala micrométrica.



**Figura 3-2** Microscopia óptica de emulsiones con solvente al 20% de ac. Acético y 5% de alfa-tocoferol encapsulado, variando el tipo y la concentración de la gelatina:

**B1 (Tipo B, 20 g), B2 (Tipo B, 22 g), A1 (Tipo A, 20 g) y A2 (Tipo A 22 g).**

Dado que este sistema ternario se introdujo al equipo de electrohilado fue necesario determinar sus propiedades físicas y el comportamiento reológico de las emulsiones obtenidas previo a su proceso de electrohilado. Para el caso de la emulsión A1, el tamaño promedio de las micelas presentes fue de  $2 \pm 0.1 \mu\text{m}$ , para A2 fue de  $2.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$ , para B1 fue de  $3.1 \pm 0.8 \mu\text{m}$  y para B2 fue de  $3.2 \pm 0.5 \mu\text{m}$ .

### 3.1.1 Propiedades fisicoquímicas de las emulsiones

Tabla 3-1 Propiedades fisicoquímicas de las emulsiones preparadas en las tres etapas experimentales.

Etapa	Gelatina	Clave	Gelatina (gr)	Ac. Acético (%v/v)	pH	Conductividad (mS)
Etapa 1: Selección tipo de Gelatina	Tipo A	A1	20	20	3.09	3.54
		A2	22	20	3.54	2.92
		A3	24	20	3.67	2.45
	Tipo B	B1	20	20	3.25	3.14
		B2	22	20	3.66	3.05
		B3	24	20	3.49	3.01
Etapa 2: % Gelatina % Solvente	Tipo A	A1-15	18	20	3.05	3.39
		A2-15	20	20	3.09	3.54
		A3-15	22	20	3.54	2.92
		A4-15	18	30	2.66	2.63
		A5-15	20	30	2.76	2.73
		A6-15	22	30	2.85	2.89
Etapa 3: % Alfa-tocoferol	Tipo A	A7-1	22	30	2.53	1.99
		A8-15	22	30	2.44	1.88

Analizando los valores obtenidos para el pH de las emulsiones probadas (ver, Tabla 3-1) y citando la literatura referente se observó que el pH es una variable significativa para el proceso de formación de emulsiones y electrohilado.

El pH es una medida de la concentración de iones dispersos presentes en la estructura química de los componentes de la emulsión. Para el caso de proteínas éste controla sus propiedades funcionales entre ellas la formación de emulsiones, siendo cuidadosos al aproximarse al punto isoeletrico (valor de pH en el cual las cargas de los aminoácidos se neutralizan).

Para el caso de la Gelatina Tipo A, ésta posee un punto isoeletrico de 6 a 9.5, mientras que los pH de las emulsiones fueron de 2.44 a 3.67, por lo tanto, se encuentran alejados del punto isoeletrico de la proteína y con ello no se altera su poder encapsulante, viscosidad y fuerza de gel, de la proteína Tipo A.

Para el caso de la Gelatina Tipo B los valores de pH de las emulsiones fueron 3.25 a 3.49, cerca de su punto isoeléctrico el cual está en un rango de 4.5 a 5.6. En la literatura se establece que a estos valores de pH para la Gelatina Tipo B se presentan valores bajos en viscosidad y los más altos en fuerza de gel y espumados (Ju-Ha, et al., 2008).

Con respecto a la conductividad, su comportamiento difiere debido a la estructura de Gelatina Tipo A y Tipo B, dado que la Gelatina Tipo A se caracteriza por tener una mayor cantidad de monómeros residuales cargados positivamente por el radical  $NH_3^+$ , que imparte una naturaleza más polar la cual se ve reflejada en la conductividad de la muestra. A diferencia de la Gelatina Tipo B dado que en su estructura se encuentran menos moléculas residuales cargadas de  $NH_3^+$ , y por lo tanto, la conductividad de la emulsión no se ve afectada significativamente, al aumenta su concentración de Gelatina Tipo B, ( Figura 3-3).

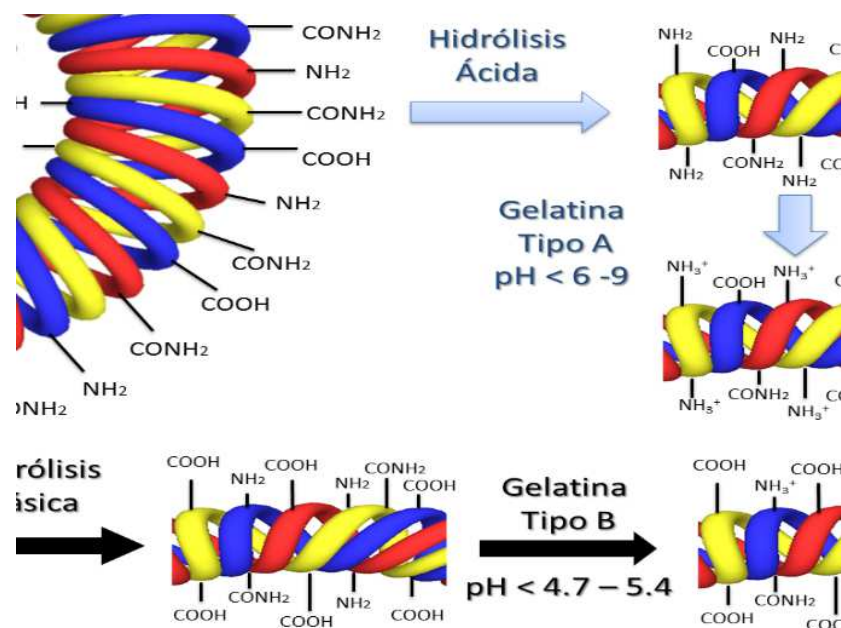


Figura 3-3 Estructura química de las moléculas de gelatina por tipo de tratamiento.

### 3.1.2 Viscosidad de las emulsiones

Para determinar la velocidad de corte máxima a la cual se somete la emulsión durante el proceso de electrohilado, ésta se determina mediante la ecuación de la Ley de Potencia en geometrías tubulares.

$$\dot{\gamma}_{max} = \left( \frac{3n + 1}{4n} \right) \frac{4Q}{\pi R^3}$$

Para los cálculos de la velocidad de corte máxima, se consideró lo siguiente:

- La emulsión es inyectada con un flujo volumétrico promedio ( $Q$ ) de 0.363 ml/h.
- El inyector posee un radio interno de 0.35 mm
- Las emulsiones presentaron un comportamiento ideal de fluido newtoniano con valores de  $n = 1$ . **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**

El valor calculado de la velocidad de corte máxima a la cual se someten las emulsiones dentro del inyector en el proceso de Electrospinning es de 2.99 1/s (*Nagihan, et al., 2014*).

En base a lo indicado en la sección 1.4 de esta tesis, con respecto a las variables que controlan el proceso de electrohilado, la viscosidad de la emulsión es un parámetro relevante que define la posibilidad de formación de fibras durante el proceso de electrohilado; Por lo cual, se determinó la naturaleza del fluido aplicando la ecuación de la ley de potencia, los datos obtenidos de este análisis se muestran en la Tabla 3-2.

Tabla 3-2 Valores de K y n de las emulsiones en el rango del esfuerzo cortante establecido.

Código	Viscosidad [Pa·s]	Desviación estándar ( $\gamma$ )	K	$\eta$
A1	0.8791	0.0114	0.8837	0.9765
A2	1.1360	0.0217	1.0703	0.9635
A3	1.16	0.0217	0.4628	1.0224
B1	0.3153	0.0103	0.3292	0.9956
B2	0.5223	0.0067	0.5093	0.9812
B3	0.6836	0.0157	0.6274	0.9939
A4-15	0.2802	0.0101	0.2387	1.0187
A5-15	0.4466	0.0165	0.3854	0.9934
A6-15	0.5051	0.0318	0.3510	1.0243
A7-15	0.5389	0.0158	0.5018	1.0166
A8-15	0.6012	0.0112	0.5419	1.0230

La viscosidad de las emulsiones se determinó mediante un promedio ponderado de los valores obtenidos para un rango 0.09 a 10 (1/s) en la velocidad de corte. Rango definido en base a la velocidad de corte máxima estimada durante la inyección (2.99 1/s) y siguiendo la metodología recomendada por la literatura (Nagihan, Pinar, & Filiz, 2014).

Con la finalidad de validar el comportamiento reológico que las emulsiones, se analizaron a velocidad de corte constante de (2.99 1/s) respecto al tiempo en un rango de 10 a 100 s. Mediante el gráfico de la Figura 3-4, se observó que el comportamiento de la viscosidad se mantiene casi constante en todo el rango del tiempo establecido, con una desviación estándar promedio en los datos de 0.016 para los valores de viscosidad reportados, por lo tanto, se concluye que las emulsiones a electrohilarse poseen un comportamiento newtoniano. Los valores de viscosidad reportados entre 0.4 y 0.63 para las emulsiones A6-15, A7-15 y A8-15, presentando un valor mayor la emulsión A8-15 debido a su mayor concentración de gelatina Tipo A (22 g).

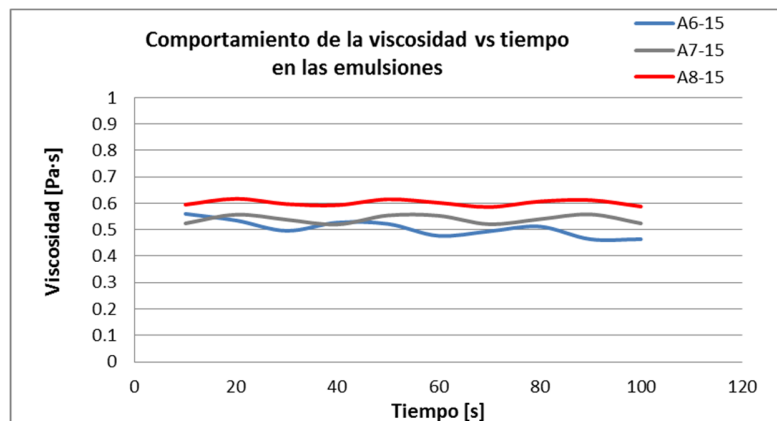


Figura 3-4 Comportamiento de la viscosidad vs tiempo de las emulsiones a 2.99 1/s.

El comportamiento como fluido newtoniano de las emulsiones se atribuye a la baja concentración de sólidos y la alta concentración del solvente (ácido acético/agua).

Adicionalmente se efectuó un análisis del comportamiento de la viscosidad a diversos valores del esfuerzo de corte en un rango de 0.1 a 10 Pa, con la finalidad de determinar si la viscosidad de las emulsiones pudiera verse afectada durante el proceso de electrohilado, al ser sometidas a esfuerzos mayores al máximo calculado (2.99 1/s); En base al comportamiento de la viscosidad mostrado en la Figura 3-5 podemos concluir que la viscosidad de las emulsiones no se alteró al incrementar el esfuerzo cortante, por lo tanto se conserva el comportamiento newtoniano de las emulsiones, consideración correcta durante el cálculo de la velocidad de corte máxima.

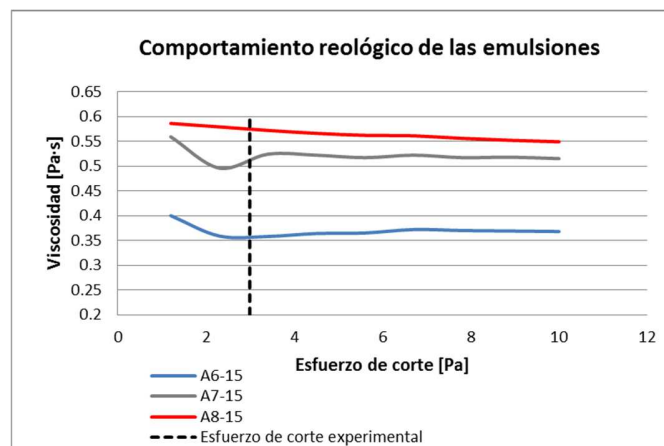


Figura 3-5 Comportamiento de la viscosidad vs esfuerzo de corte de las emulsiones.

En base a los estudios de viscosidad citados anteriormente, se concluye que ésta no será modificada durante la inyección de la solución polimérica y por lo tanto los cambios que pudiera mostrar la morfología obtenida en una muestra electrohilada, no pueden atribuirse a cambios en la viscosidad de las emulsiones durante su inyección.

### 3.2 Caracterización y evaluación de las fibras

Este estudio se realizó en tres etapas (Tabla 2-3), para definir cuál es la composición ideal de la emulsión para obtener fibras homogéneas con la encapsulación adecuada de la Vitamina E en la Gelatina. Por lo tanto, las fibras se evaluaron con diversas técnicas que nos permitieron validar la encapsulación y establecer las mejores condiciones de obtención.



Figura 3-6 Velos de micro y nanofibras obtenidas sobre el soporte de papel aluminio.

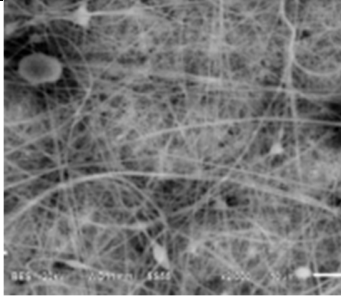
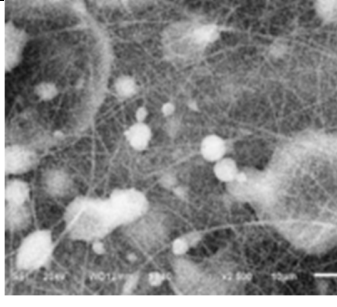
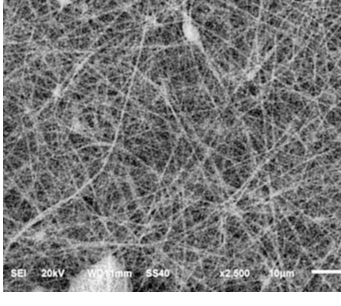
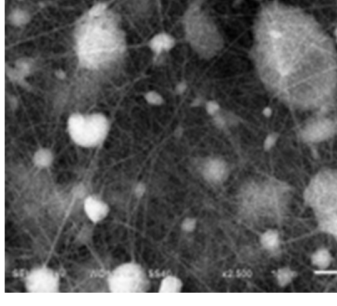
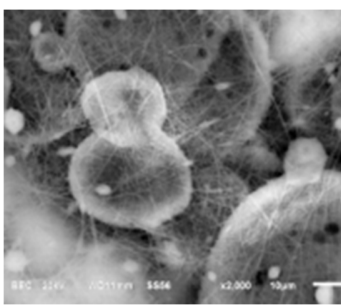
Cabe mencionar que las condiciones de operación del equipo de Electrospinning se mantuvieron constante para las tres etapas de la investigación, siendo 15 KV de carga en el polo positivo y 15KV en el polo negativo para las fuentes de alto voltaje, una velocidad de inyección promedio de 0.363 ml/h, 12 cm de distancia entre inyector-colector y una velocidad rotativa del rodillo colector de  $200 \pm 5$  rpm. El electrohilado se llevó a cabo a una temperatura ambiente de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ; Estas condiciones fueron establecidas experimentalmente, dado que solamente en la literatura se encuentran condiciones de electrohilado para soluciones de gelatina sin encapsulación. (Nagihan, et al., 2014)

### 3.2.1 Morfología de las fibras

#### 3.2.1.1 Etapa 1 (MEB)

Durante la etapa 1 de la parte experimental se buscó definir qué tipo de Gelatina permite la encapsulación del alfa tocoferol y la formación de fibras.

Tabla 3-3 Imágenes SEM de las fibras obtenidas en la Etapa 1.

Descripción	Imagen SEM	Descripción	Imagen SEM
<p>A1</p> <p>Gelatina tipo A 20 g</p> <p>Ac. Acético 20%</p> <p><math>\alpha</math> tocoferol 5%</p>		<p>B2</p> <p>Gelatina tipo B 22 g</p> <p>Ac. Acético 20%</p> <p><math>\alpha</math> tocoferol 5%</p>	
<p>A2</p> <p>Gelatina tipo A 22 g</p> <p>Ac. Acético 20%</p> <p><math>\alpha</math> tocoferol 5%</p>		<p>B3</p> <p>Gelatina tipo B 24 g</p> <p>Ac. Acético 20%</p> <p><math>\alpha</math> tocoferol 5%</p>	
<p>B1</p> <p>Gelatina tipo B 20 g</p> <p>Ac. Acético 20%</p> <p><math>\alpha</math> tocoferol 5%</p>		<p>Nota: No se cuenta con imágenes MEB para las pruebas (A3) con concentración de 24 g de Gelatina Tipo A y 20% de ácido acético, pues presentaron serios problemas de taponamiento durante la inyección de la emulsión y no pudieron electrohilarse.</p>	

Las micrografías de las muestras B1, B2 y B3, permiten establecer que, no fue posible un electrohilado correcto, generando una encapsulación ineficiente, ya que se presentan grandes cúmulos de material en el velo. Caso contrario muestran las imágenes (A1 y A2) donde se utilizó la Gelatina Tipo A, pues en ellas se puede observar que en su mayoría el material se encuentra electrohilado y los cúmulos son mucho menores que los presentados para la Gelatina B, (Tabla 3-3).

De acuerdo a los resultados encontrados, la Gelatina Tipo A es la que presenta mejores resultados para la formación de las fibras de Gelatina/Alfa-tocoferol, este comportamiento se cree es atribuible a la concentración de aminoácidos con carga residuales  $NH_3^+$  presentes en la Gelatina Tipo A, como resultado de la hidrólisis ácida aplicada para su obtención, la diferencia es significativamente mayor respecto a la Gelatina Tipo B.

Desde el punto de vista de la composición en aminoácidos la Gelatina Tipo A y Tipo B no presentan grandes diferencias, no obstante la Gelatina Tipo B fue obtenida a través de un proceso de hidrólisis básica, proceso que elimino la mayoría de las cargas residuales  $NH_3^+$  presentes en su estructura, aunado a esto hay que considerar que el pH bajo el cual se trabaja la emulsión se encuentra cerca del punto isoeléctrico de la molécula, al cual se le infiere una neutralización de carga molecular ; Estos dos fenómenos no favorecen el proceso de electrohilado, pues disminuyen la carga positiva de la molécula necesaria para la atracción de la fibras al colector de carga negativa y la correcta evaporación del solvente en su trayecto durante el proceso de electrohilado.

En la Figura 3-7 se presenta una representación del proceso de electrohilado y la importancia de las cargas residuales en la molécula para la formación de las fibras.

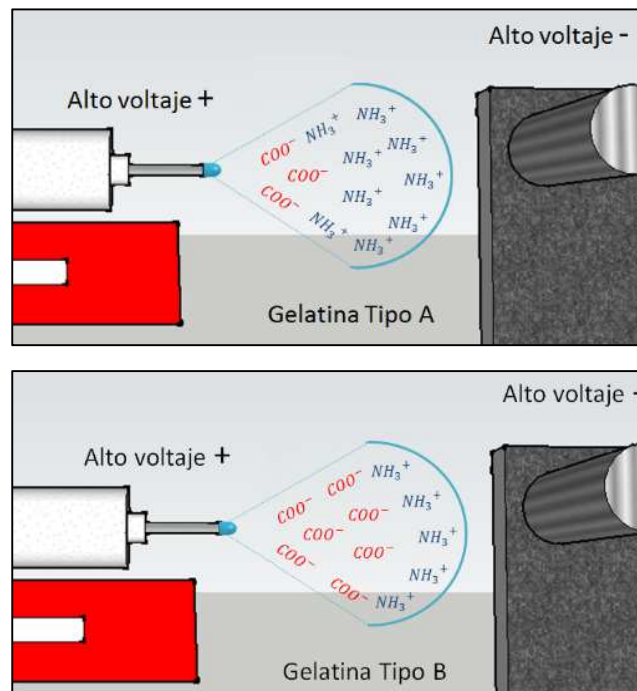


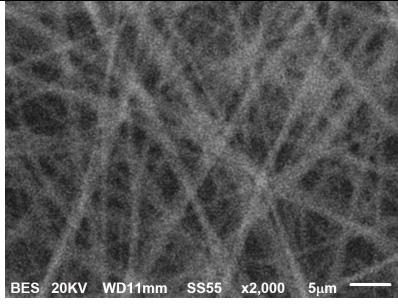
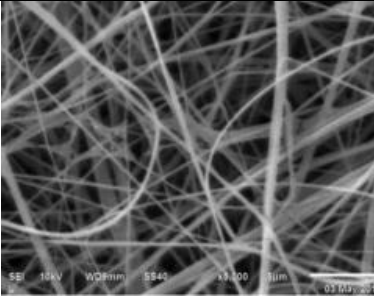
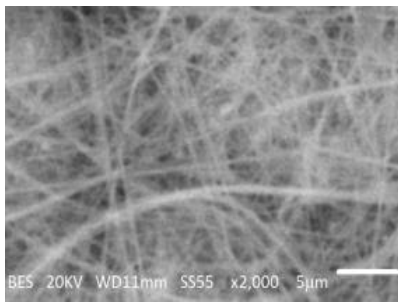
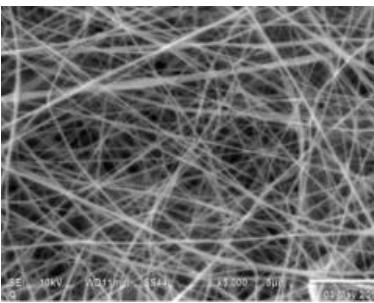
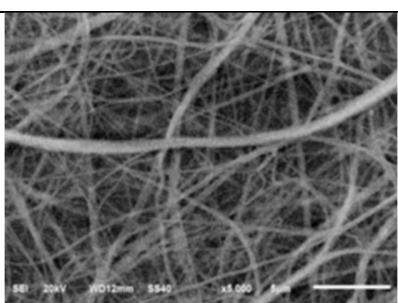
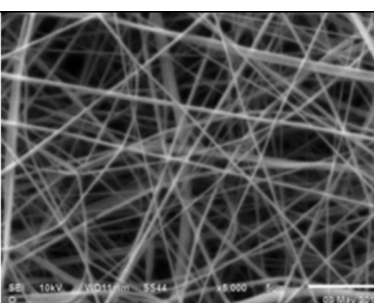
Figura 3-7 Distribución de cargas en las emulsiones al someterse al campo eléctrico del electrospinning.

De acuerdo a los resultados experimentales se puede concluir que para llevar a cabo el proceso de electrohilado es necesario identificar los tipos de cargas residuales de la molécula polimérica y su concentración.

### 3.2.1.2 Etapa 2 MEB

Una vez seleccionado el tipo de Gelatina más adecuado, se procedió a llevar a cabo la Etapa 2 en la cual se determinó la concentración adecuada de Gelatina Tipo A y solvente para lograr una formación de fibras más uniforme, esto en base a los resultados obtenidos en la etapa anterior. (Ju-Ha, et al., 2008).

Tabla 3-4 Imágenes MEB de las fibras obtenidas en la Etapa 2.

Descripción	Imagen SEM	Descripción	Imagen SEM
<p>A1-15 Gelatina tipo A 18 g Ac. Acético 20% <math>\alpha</math> tocoferol 5%</p>		<p>A4-15 Gelatina tipo A 18 g Ac. Acético 30% <math>\alpha</math> tocoferol 5%</p>	
<p>A2-15 Gelatina tipo A 20 g Ac. Acético 20% <math>\alpha</math> tocoferol 5%</p>		<p>A5-15 Gelatina tipo A 20 g Ac. Acético 30% <math>\alpha</math> tocoferol 5%</p>	
<p>A3-15 Gelatina tipo A 22 g Ac. Acético 20% <math>\alpha</math> tocoferol 5%</p>		<p>A6-15 Gelatina tipo A 22 g Ac. Acético 30% <math>\alpha</math> tocoferol 5%</p>	

En la Tabla 3-4 se observa las diferentes micrografías de las fibras obtenidas en la Etapa 2, en las cuales se observa fibras con una superficie de forma regular, lisa no contraída y sin pliegues. La superficie lisa de las fibras de Gelatina A se debe probablemente a las propiedades plásticas predominantes sobre las propiedades vítreas del material, dado que durante el proceso de electrohilado se produjeron estiramiento y contracciones del material formado. Es importante observar que no se presenta irregularidad como resultado el proceso de deshidratación durante la formación de la fibra.

Para conocer los diámetros de las fibras electrohiladas, las imágenes MEB se analizaron mediante el software ImageJ (EUA). En la Tabla 3-5 se muestran los diámetros promedio obtenidos para cada uno de las fibras, así como la desviación estándar que existió entre los datos analizados. Con respecto al uso de la Gelatina Tipo A, se observa que el aumento en su concentración, conlleva a una formación más homogénea en los diámetros de las nanofibras, pues la desviación estándar entre los datos disminuye.

**Tabla 3-5 Promedio y desviación estándar de los diámetros obtenidos para las muestras A1-15, A2-15, A3-15, A4-15, A5-15 y A6-15, todas con un 5% de alfa tocoferol encapsulado.**

Clave	Composición	Diámetro de fibra ( $\mu\text{m}$ )	
		Promedio	Desviación estándar
A1-15	Gelatina tipo A 18 g Ac. Acético 20%	0.770	0.916
A2-15	Gelatina tipo A 20 g Ac. Acético 20%	0.555	0.922
A3-15	Gelatina tipo A 22 g Ac. Acético 20%	0.363	0.174
A4-15	Gelatina tipo A 18 g Ac. Acético 30%	0.299	0.180
A5-15	Gelatina tipo A 20 g Ac. Acético 30%	0.156	0.115
A6-15	Gelatina tipo A 22 g Ac. Acético 30%	0.221	0.081

En cuanto al solvente, al revisar los datos de la Tabla 3-5 se observa que al incrementar su concentración de 20 a 30%, los diámetros de las fibras disminuyen para todas las composiciones de Gelatina. Las fibras de Gelatina Tipo A no presentaron un aplastamiento resultado del choque al ser depositadas en el colector y mantuvieron su forma cilíndrica. Estableciendo que la concentración de solvente fue adecuada, ya que permitió su evaporación durante la trayectoria de la fibra del inyector al colector. El valor del diámetro de las fibras obtenidas, establece que el uso de una mayor concentración del solvente permite obtener fibras en la escala nanométrica (A5-15 y A6-15). Mientras que una concentración menor, sólo se obtienen fibras con diámetros en la escala micrométrica (A1-15 a A4-15).

### 3.2.1.3 Análisis ANOVA de la Etapa 2.

Con la finalidad de evaluar la influencia de los cambios en la concentración de la Gelatina Tipo A (18, 20 y 22 g) y la concentración del Ácido Acético (20 y 30%) como solvente de la emulsión en el diámetro de las fibras electrohiladas, se decidió efectuar un análisis ANOVA al diseño factorial 3x2. Los experimentos se efectuaron en un diseño completamente al azar. Considerando que no existe ningún otro factor que afecte significativamente a la variable de interés que es el diámetro de la fibra. El diseño experimental y la codificación de variables se muestra en la Tabla 3-6.

Tabla 3-6 Codificación de valores y variables del diseño factorial

Factor	Unidades Originales			Unidades codificadas			Unidades en variables		
	Bajo	Medio	Alto	Bajo	Medio	Alto	Bajo	Medio	Alto
Gelatina Tipo A (g)	18	20	22	-1	0	1	G1	G2	G3
Ácido Acético (%)	20		30	-1		1	A1		A3

Utilizando las unidades codificadas de la Tabla 3-6 se desarrolla la representación gráfica del diseño experimental 3X2 elegido para el análisis de los datos obtenido., ver Figura 3-8.

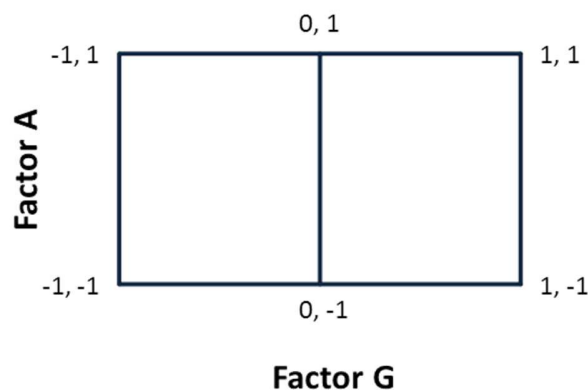


Figura 3-8 Representación gráfica del diseño factorial 3X2.

En este diseño se consideran tres factores de interés: Los factores principales son los cambios en la concentración de la Gelatina Tipo A (A) y del ácido acético (G), adicionalmente el efecto de su interacción (AG), cada experimento se efectuó n=4 veces por lo tanto el total de datos para el ANOVA es k=24.

Para determinar la media de los diámetros de las fibras, se utilizaron las imágenes del MEB de cada prueba y se analizaron mediante el software Imagen J, obteniendo 20 datos de diámetros al azar por cada imagen. El resumen del diámetro promedio obtenido para cada experimento se muestra en la Tabla 3-7 en las columnas azul claro.

Tabla 3-7 Datos del diámetro promedio experimental.

	A1		A2		Y i..
G1	1.000	3.082	0.202	0.970	4.051
	0.788		0.271		
	0.616		0.221		
	0.678		0.277		
G2	0.558	2.293	0.132	0.569	2.862
	0.508		0.140		
	0.549		0.135		
	0.679		0.162		
G3	0.314	1.313	0.206	0.764	2.077
	0.327		0.173		
	0.353		0.209		
	0.320		0.177		
Total Y .j.		6.688		2.303	
			Total Y ...		8.990

El modelo estadístico para evaluar los efectos de este diseño, está dado por:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$$i = 1, 2, 3 \dots a$$

$$j = 1, 2, 3 \dots b$$

$$k = 1, 2, 3 \dots n$$

Donde  $\mu$  es la media general,  $\alpha_i$  es el efecto debido al  $i$ -ésimo nivel del factor A,  $\beta_j$  es el efecto del  $j$ -ésimo nivel del factor G,  $(\alpha\beta)_{ij}$  representa el efecto de la interacción en la combinación  $ij$  y  $\varepsilon_{ijk}$  es el error aleatorio en el cual se supone una distribución F (Fisher-Snedecor).

A continuación, se muestra en la Tabla 3-8 la información sintetizada de los cálculos a utilizar para el análisis ANOVA.

Tabla 3-8 Análisis ANOVA del diseño factorial 2x3.

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F <sub>0</sub>	F <sub><math>\alpha, k-1, N-k</math></sub>
Efecto A	SC <sub>A</sub>	a-1	CM <sub>A</sub>	CM <sub>A</sub> / CM <sub>E</sub>	P(F>F <sup>A</sup> <sub>0</sub> )
Efecto G	SC <sub>G</sub>	b-1	CM <sub>G</sub>	CM <sub>G</sub> / CM <sub>E</sub>	P(F>F <sup>G</sup> <sub>0</sub> )
Efecto AG	SC <sub>AG</sub>	(a-1)(b-1)	CM <sub>AG</sub>	CM <sub>AG</sub> / CM <sub>E</sub>	P(F>F <sup>AG</sup> <sub>0</sub> )
Error	SC <sub>E</sub>	ab(n-1)	CM <sub>E</sub>		
Total	SC <sub>T</sub>	abn-1			

Las hipótesis planteadas para el modelo con los tres efectos antes mencionados son:

$$H_0 = \text{Efecto de concentración de Gelatina (G)} = 0$$

$$H_G = \text{Efecto de concentración de Gelatina (G)} \neq 0$$

$$H_0 = \text{Efecto de concentración del Solvente (A)} = 0$$

$$H_A = \text{Efecto de concentración del Solvente (A)} \neq 0$$

$$H_0 = \text{Efecto de concentración Gelatina – Solvente (GA)} = 0$$

$$H_{GA} = \text{Efecto e concentración Gelatina – Solvente (GA)} \neq 0$$

Estas hipótesis se prueban mediante la técnica de análisis de varianza, que para nuestro diseño factorial 3 x 2 con 4 réplicas resulta de descomponer la varianza total en:

$$SC_T = SC_E + SC_A + SC_G + SC_{AG}$$

Donde los respectivos grados de libertad de cada una de ellas son:

$$nab - 1 = (a - 1) + (b - 1) + (a - 1)(b - 1) + ab(n - 1)$$

Utilizando la notación de puntos se simplifican las fórmulas para el análisis y se representa de manera abreviada las cantidades numéricas que se pueden calcular a partir de los datos experimentales, por lo tanto:

$$Y_{...} = \text{Suma de todas las observaciones}$$

$$Y_{i..} = \text{Total en el nivel } i \text{ del factor } A$$

$$Y_{.j.} = \text{Total en el nivel } j \text{ del factor } G$$

Con esta notación la suma de cuadrados totales es:

$$SC_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n Y_{ijk}^2 - \frac{Y_{...}^2}{N}$$

Donde  $a=2$ ,  $b=3$ ,  $n=4$  y  $N=24$  es el total de observaciones en el experimento.

Las sumas de cuadrados de los tres efectos se calculan:

$$SC_A = \sum_{i=1}^a \frac{Y_{i..}^2}{bn} - \frac{Y_{...}^2}{N} \quad SC_G = \sum_{j=1}^b \frac{Y_{.j.}^2}{an} - \frac{Y_{...}^2}{N} \quad SC_{AG} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \frac{Y_{ij.}^2}{n} - \frac{Y_{...}^2}{N} - SC_A - SC_B$$

Y al final, se restan todas a  $SC_T$  obteniéndose la suma de cuadrados del error con:

$$SC_E = SC_T - SC_A - SC_G - SC_{AG}$$

Para determinar los cuadrados medios de cada efecto se divide las sumas de cuadrados entre sus correspondientes grados de libertad.

$$CM_A = \frac{SC_A}{a - 1} \quad CM_G = \frac{SC_G}{b - 1} \quad CM_{AG} = \frac{SC_{AG}}{(a - 1)(b - 1)} \quad CM_E = \frac{SC_E}{ab(-1)}$$

Para validar las  $H_0$ , se establece que:

$$F_0 = \frac{CM_{Efecto}}{CM_E} < F_{\alpha, k-1, N-k}$$

De lo contrario si  $F_0 > F_{\alpha, k-1, N-k}$  las  $H_0$  se rechazarán, considerándose que, si hay efecto significativo en la variable de respuesta, que para este caso de estudio es el diámetro de las fibras obtenidas. Los valores de  $F_{\alpha, k-1, N-k}$  se obtienen del Apéndice A, Tabla A4 en el libro (Gutiérrez Pulido & De la Vara Salazar, 2012) donde  $\alpha$  se fija con un valor de 5%, debido a que los datos presentan una distribución F (Fisher-Snedecor).

A continuación, se muestra la Tabla 3-9 con los cálculos ANOVA utilizando todas las formulas antes mencionadas.

Tabla 3-9 Resumen de los cálculos efectuados para el ANOVA.

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	$F_0$	$F_{\alpha, k-1, N-k}$
Efecto G	-0.958	1	0.958	9.474	4.30
Efecto A	2.886	2	1.443	14.270	3.47
Efecto AG	1.214	2	0.607	6.003	2.77
Error	-1.820	18	0.101		
Total	1.322	23			

Analizando los datos de la Tabla 3-9, se concluye que para los tres efectos la  $H_0$  se rechaza y por lo tanto los efectos principales que son los cambios en la concentración de la Gelatina y del solvente, así como su interacción presentan un efecto en el diámetro de las fibras. Además, se observa que la variación total en los 24 datos de este experimento fue de 1.322 debido a los signos negativos en el efecto G y el error. El efecto A que se relaciona a la concentración del solvente en la emulsión, es el valor más alto de la variación siendo de 2.886, lo que nos da indicios, de que al incrementar la concentración del ácido acético de 20 a 30%, se generan los mayores cambios en los valores del diámetro en las fibras, siendo estos diámetros inferiores en el uso de una concentración más alta del solvente.

Dado que el efecto de un factor sobre la variable de respuesta se visualiza y entiende de una forma más rápida mediante su representación gráfica, a continuación, se analizarán los gráficos de los efectos principales y su interacción

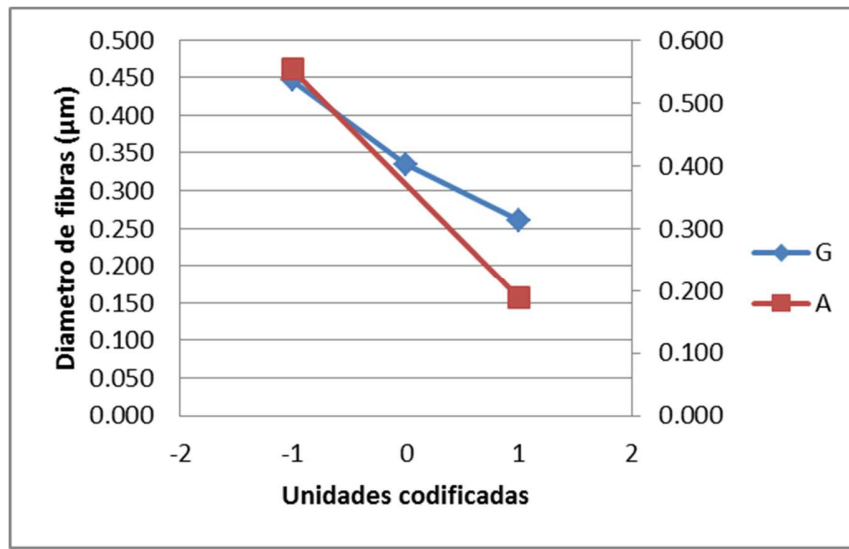


Figura 3-9 Efecto de los factores sobre la variable de respuesta, (G) concentración de gelatina y (A) concentración del solvente.

Mediante la Figura 3-9 se puede visualizar que el efecto A (Concentración del solvente) posee una pendiente mayor en el cambio de los diámetros con respecto al efecto G (Concentración de gelatina tipo A) lo que refuerza lo mencionado anteriormente, por lo tanto, si buscamos disminuir el diámetro de nuestras fibras, es conveniente trabajar a concentraciones del 30% en ácido acético como solvente en nuestras emulsiones.

Para visualizar el efecto de la interacción de los dos factores, se gráfica primero la interacción AG y posteriormente la interacción GA.

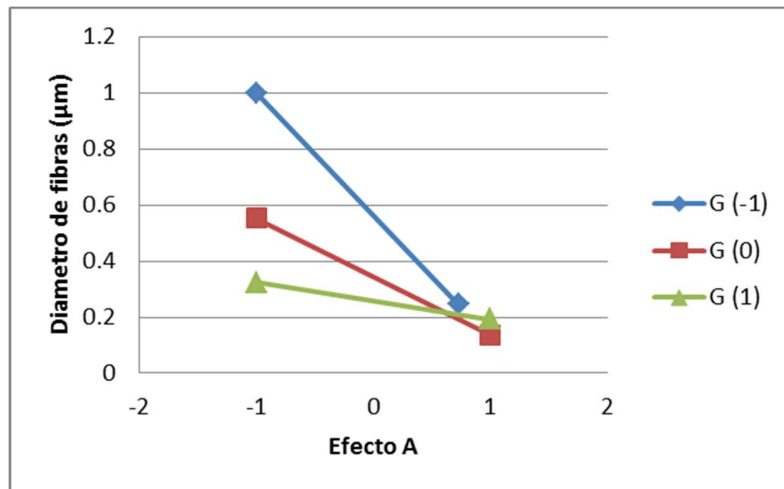


Figura 3-10 Efecto de la interacción de los dos factores GA, (G) concentración de gelatina y (A) concentración del solvente.

La Figura 3-10 que observa que las líneas poseen pendientes con comportamiento muy similares y por lo tanto la interacción entre ambos efectos es baja.

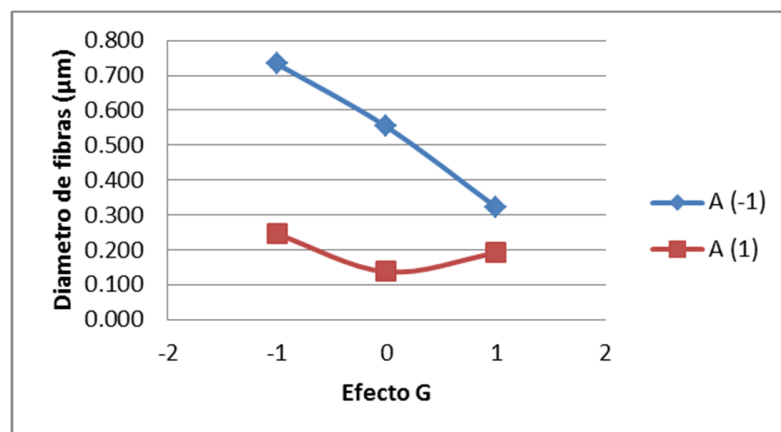


Figura 3-11 Efecto de la interacción de los dos factores AG.

La Figura 3-11 se permite visualizar el efecto de la interacción GA, donde se reitera nuevamente que al trabajar en concentraciones más elevadas del solvente (30%) para todas

las concentraciones de gelatina del experimento obtenemos diámetros de fibra inferiores a los mostrados en los experimentos donde se trabajó con la concentración (20%) del solvente.

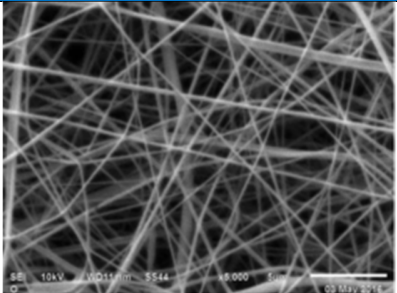
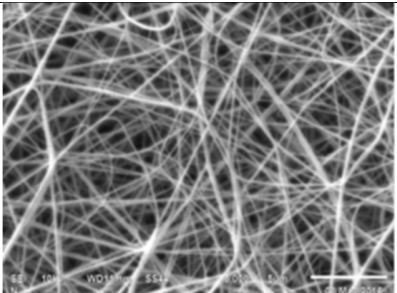
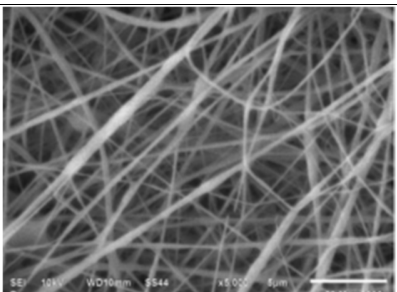
Concluyéndose así, que el efecto A que representa la concentración del solvente en la emulsión para este experimento, es el factor que más afecta el diámetro de las fibras obtenidas por electrohilado, y que al trabajarse a mayores concentraciones se obtiene fibras con diámetros menores.

En base al análisis ANOVA y al comportamiento del diámetro de las fibras, se concluye que la concentración de ácido acético al 30% y el uso de 22 g de Gelatina Tipo A, es la combinación más adecuada para obtener fibras uniformes con diámetros de (0.06 a 0.8  $\mu\text{m}$ ). Por lo tanto, esta combinación entre el solvente y el material encapsulante fue la mejor opción para la etapa 3.

#### **3.2.1.4 Etapa 3 (MEB)**

Una vez seleccionada las variables de concentración de solvente (30%) y los gramos apropiado para la Gelatina Tipo A (22 g), se procedió con la Etapa 3 en la cual se determinó la concentración máxima del componente activo que pudo encapsular la matriz polimérica de la Gelatina Tipo A, sin que se haya alterado significativamente la morfología de las fibras. Este análisis se efectuó de igual forma mediante un Microscopio electrónico de barrido.

Tabla 3-10 Imágenes MEB de las fibras obtenidas en la Etapa 3.

Descripción	Imagen SEM
<p>A6-15 Gelatina tipo B 22 g Ac. Acético 30% <math>\alpha</math> tocoferol 5%</p>	
<p>A7-15 Gelatina tipo A 22 g Ac. Acético 30 % <math>\alpha</math> tocoferol 7.5%</p>	
<p>A8-15 Gelatina tipo A 22 g Ac. Acético 30 % <math>\alpha</math> tocoferol 10%</p>	

En base a las imágenes de microscopía de la Tabla 3-10 de la etapa 3 se infiere que el aumento en la encapsulación del alfa-tocoferol como material oleoso en la matriz polimérica genera un aumento en los diámetros de las fibras, este efecto se visualiza con mayor claridad en la muestra A8-15 en donde podemos observar la formación de cúmulos en la red de las fibras. Siendo la combinación A7-15 la más eficiente en la encapsulación y uniformidad de las fibrillas. Los diámetros obtenidos para A6-15  $0.221 \pm 0.081 \mu\text{m}$ , para A7-15  $0.231 \pm 0.066 \mu\text{m}$  y para A8-15  $0.2367 \pm 0.1326 \mu\text{m}$ , mostrando un incremento de los diámetros en función de la cantidad o concentración de activo encapsulado.

### 3.2.2 Comportamiento térmico de las fibras

El análisis de Calorimetría diferencial de barrido (DCS) nos permite conocer de una forma confiable, rápida y fácil, la cantidad de calor que un material puede absorber o liberar durante sus transiciones termodinámicas, al ser sometido a un flujo de calor constante bajo un intervalo de temperaturas establecido. Por lo tanto, las fibras de gelatina con alfa-tocoferol encapsulado fueron sometidas a éste análisis, con la finalidad de conocer la influencia que tiene el incremento de temperatura en la estructura de la fibra, estabilidad térmica y caracterizar sus transiciones. Y así, determinar las temperaturas adecuadas para su manejo y almacenamiento que permita conservarlas en óptimas condiciones para su uso.

En la Figura 3-12 se muestran las curvas calorimétricas de las fibras de gelatina tipo A de 22 g y las fibras de gelatina tipo A de 22 gr con diferentes concentraciones de alfa-tocoferol encapsulado (A6-15 5%) (A7-15 7.5%) (A8-15 10%).

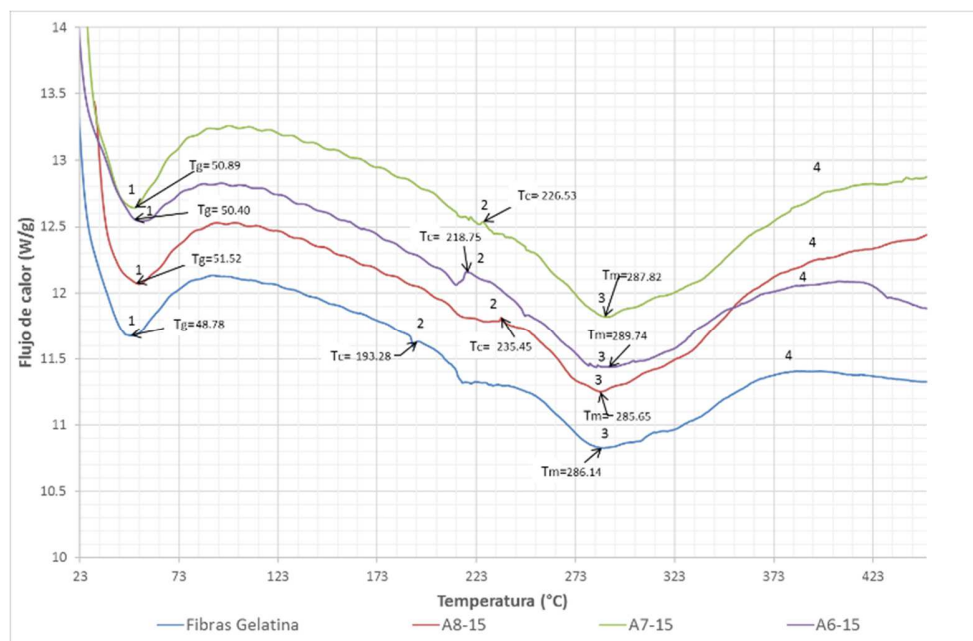


Figura 3-12 Curvas calorimétricas de fibras de Gelatina Tipo A al 22 g; Fibras de Gelatina Tipo A al 22 g con Alfa tocoferol encapsulado (A6-15 5%) (A7-15 7.5%) (A8-15 10%).

En las tres curvas calorimétricas observamos que las fibras sufren dos transiciones endotérmicas y una exotérmica. Comenzando por una transición vítrea en la cual se absorbe calor pero sin cambio de fase [1] cerca de los  $50 \pm 2^\circ\text{C}$  ( $T_g$ ), propia de los polímeros amorfos donde el ordenamiento de sus cadenas es bajo. En esta transición el material pasó de ser blando y flexible pero aún en fase sólida; Dado que la gelatina es un polímero principalmente amorfo, pero que fue sometido a un proceso de estiramiento nanométrico al ser electrohilado, se atribuye al proceso de obtención de los velos la formación de regiones llamadas “cristales fibrilares” en la estructura del biopolímero, donde sus cadenas se doblaron en zig zag bajo cierto ordenamiento (Odián, 2004), provocando la cristalinización [2] de la estructura de la Gelatina cerca de los  $218 \pm 20^\circ\text{C}$ . ( $T_c$ ) al absorber calor.

A continuación se presenta el proceso endotérmico de fusión [3], precisamente de esta fase cristalina alrededor de los  $287 \pm 2^\circ\text{C}$ . ( $T_m$ ) presentándose un cambio de fase de sólido a líquido de las regiones cristalinas. Y se finaliza con la calcinación [4] de la matriz polimérica por arriba de los  $375^\circ\text{C}$ . El análisis DSC fue también efectuado para el alfa-tocoferol puro, con la finalidad de conocer la temperatura de oxidación de la vitamina E, la cual en base curva calorimétrica de la Figura 3-13 se encuentra cerca de los  $321^\circ\text{C}$ .

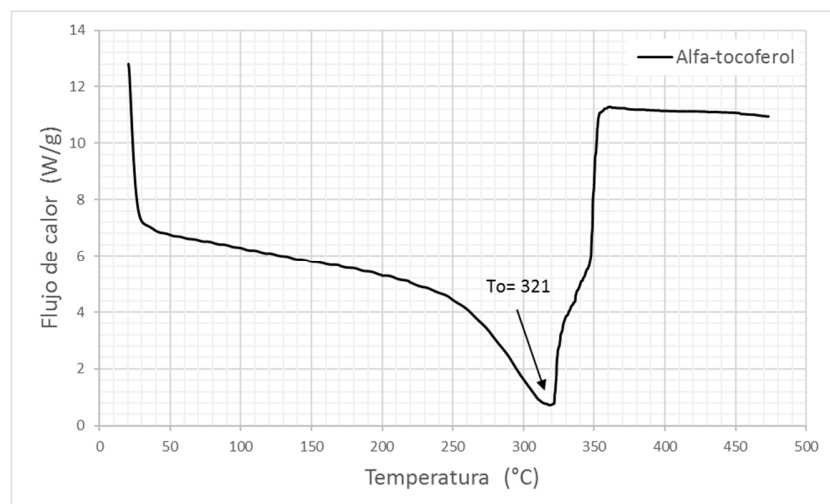


Figura 3-13 Curva calorimétrica del alfa-tocoferol puro.

Tabla 3-11. Temperaturas de transiciones térmicas del análisis de calorimetría DSC.

Muestras	Trans. Vítrea	Cristalinización	Fusión
	°C		
Fibras de Gelatina	48.78	193.28	286.14
A6-15	50.40	218.75	289.74
A7-15	50.89	226.53	287.82
A8-15	51.52	235.45	285.65

En base a los datos mostrados en la Tabla 3-11, se puede inferir que la presencia del alfa-tocoferol encapsulado en la matriz de fibras de gelatina, afectó algunos valores de temperatura en la cual se presentan las transiciones térmicas. Para la transición vítrea [1] el efecto fue bajo alrededor de 1.8% en promedio; En cambio para la cristalización [2] el aumento de la temperatura donde se lleva a cabo ésta transición aumenta un 13% respecto a las fibras donde no hay presencia de Vitamina E, e incrementa un 3% a medida que la encapsulación aumenta un 2.5%.

Esto se atribuye a que alfa-tocoferol encapsulado en las fibras, aumenta su flexibilidad impidiendo un ordenamiento de las cadenas del biopolímero. Para la fusión [3] el efecto se considera casi nulo, debido a que solo valores se encuentran cerca de la temperatura de oxidación de la Vitamina E.

### 3.2.3 Actividad de agua en las fibras

Dado que este parámetro indica la disponibilidad de agua de la matriz, la cual está ligada a las reacciones químicas, bioquímicas, enzimáticas y de desarrollo microbiano. El valor de actividad de agua de un material nos da una idea de la cantidad de agua disponible en el substrato para actividades metabólicas.

Por lo tanto, se determinó la actividad de agua de los velos de micro y nanofibras formulados con una composición de 22 g de Gelatina Tipo A, disuelta en una solución al 30% de ácido acético y con variaciones en el porcentaje de encapsulación del alfa-tocoferol. Se aprecia que los valores de  $a_w$  no presentan diferencias significativas en función de la composición de las fibras.

**Tabla 3-12 Actividad de agua de los velos de fibras electrohiladas.**

Muestras	Contenido de $\alpha$ -Tocoferol	$a_w$ Promedio	$\pm\sigma$	Temperatura (°C)
A6-15	5%	0.337	0.011	24.37
A7-15	7.5%	0.327	0.003	24.73
A8-15	10%	0.326	0.002	24.37

Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 3-12, es fácil apreciar que los valores promedio de las actividades de agua de las fibras son muy bajos. Considerando que la mayoría de los microorganismos requieren valores de actividad de agua muy altos para poder crecer: Bacterias  $a_w > 0.90$ , levaduras  $a_w < 0.85$ , hongos filamentosos  $a_w > 0.80$ . El riesgo de desarrollar microorganismos en el material es casi despreciable, permitiendo una larga vida de anaquel, al seleccionar un adecuado empaque que sea impermeable a la humedad ambiente.

### 3.2.4 Isotermas de adsorción de las fibras

Se evaluó el contenido de humedad original de los velos de micro y nanofibras formulados con una composición de 22 g de Gelatina Tipo A y disuelta en una solución al 30% de Ácido acético, cabe mencionar que esta composición fue seleccionada como la ideal para obtener fibras con diámetros inferiores en base a los resultados visualizados por MEB y especificados en la sección 3.2.1 de esta tesis. El único parámetro variado fue el contenido de Vitamina E encapsulada, ver Tabla 3-13.

Tabla 3-13 Contenidos de humedad inicial presente en velos de micro y nanofibras.

Clave de muestra	Contenido de $\alpha$ -Tocoferol	Contenido de humedad inicial
A6-15	5%	0.06%
A7-15	7.5%	0.20%
A8-15	10%	0.14%

El contenido de humedad de las fibras es muy bajo, estableciendo que las fibras son muy estables, ver Tabla 3-13.

Con la finalidad de estimar la vida útil de nuestros velos de micro y nanofibras, así como las condiciones idóneas de empaque, se determinaron las isotermas de adsorción a temperatura ambiente, al someter los velos a medios controlados de humedad con sales de actividad de agua ( $a_w$ ) diferentes.

Entendemos por actividad de agua, a la relación que existe en el equilibrio termodinámico entre la presión de vapor de agua del substrato ( $P$ ) y la presión de vapor de agua del medio que lo rodea ( $P_o$ ):

$$a_w = \frac{P}{P_o}$$

La actividad de agua se encuentra relacionada a la humedad relativa mediante la siguiente formula:

$$H.R. = a_w \times 100$$

Gráficamente las isotermas relacionan el contenido de humedad del material con la actividad de agua del medio, el comportamiento mostrado por las fibras presenta pequeñas alteraciones en su humedad en un rango de 0 a 0.8 %, lo que nos indica que el contenido de humedad es muy bajo sin importar la actividad de agua del medio, siendo altamente estables para su conservación en seco.

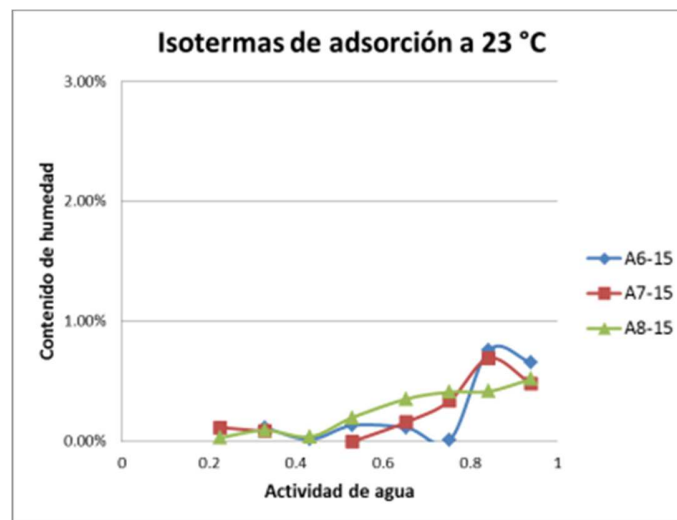
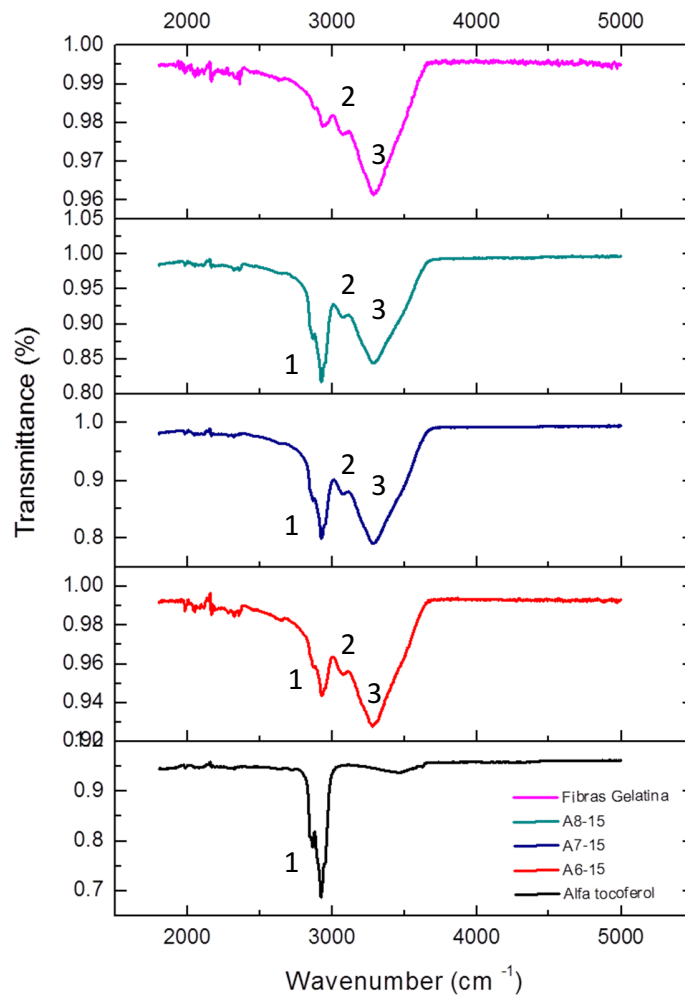


Figura 3-14 Isotermas de adsorción a 23 °C de velos de micro y nanofibras.

### 3.2.5 Validación del $\alpha$ -tocoferol en las fibras por FTIR

Con la finalidad de corroborar la presencia e incorporación del alfa-tocoferol en la estructura de las nanofibras, se utilizó la Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourie; Técnica que nos permitió identificar los grupos funcionales más representativos de cada una de las moléculas que conforman las fibras obtenidas. Se efectúa una comparación de los espectros obtenidos con las sustancias puras correspondientes, para determinar si existe la presencia de las señales de los componentes que integran la fibra.



1	Enlaces (C-H) de Grupos Metilo en el Alfa-tocoferol ( $2800 - 2950 \text{ cm}^{-1}$ )
2	Grupo Carboxilo (COOH) de la Gelatina ( $2400 - 3400 \text{ cm}^{-1}$ )
3	Grupo Amino ( $\text{NH}_2$ ) de la Gelatina ( $3300 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ )

Figura 3-15. Espectro FTIR de fibras de Gelatina Tipo A al 22 g; Fibras de Gelatina Tipo A al 22 g con Alfa tocoferol encapsulado (A6-15 5%) (A7-15 7.5%) (A8-15 10%); Alfa tocoferol puro.

Los espectros se analizaron principalmente en la región de los grupos funcionales ( $4000 - 1300 \text{ cm}^{-1}$ ).

El primer espectro de la Figura 3-15, corresponde a fibras de Gelatina Tipo A con 22 g electrohiladas sin encapsulación, se observa claramente la presencia de los grupos aminos ( $\text{NH}_2$ ) con una banda de moderada intensidad entre  $3300 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a la vibración del enlace N-H. Recordemos lo mencionado en la sección 1.6 de esta tesis; En base al tipo de tratamiento bajo el cual se fabrica la Gelatina Tipo A, los grupos amino se encuentran en mayor proporción dentro de la estructura molecular de la Gelatina y por lo tanto esta señal es la más intensa que podemos observar en su espectro. Por el contrario, los grupos carboxilo ( $\text{COOH}$ ) se encuentran en menor proporción y los podemos identificar por una señal débil entre  $2400 - 3400 \text{ cm}^{-1}$ , correspondiente al alargamiento del enlace O-H. Ambas señales se presentan en los espectros de las fibras A6-15, A7-15 y A8-15. (Silverstein Robert, et al., 1981).

Para el caso del espectro del Alfa tocoferol puro, se observa una señal fuerte y doble, representativa de los enlaces  $\text{CH}_2\text{-C}$  y  $\text{CH}_3\text{-C}$  entre ( $2400 - 3400 \text{ cm}^{-1}$ ) propios de la cadena polimérica de la Vitamina E (Figura 3-16).

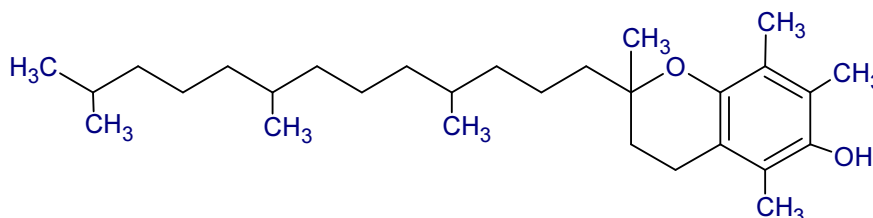


Figura 3-16 Molécula de la vitamina E.

Y es precisamente esta señal la que nos permite identificar mediante la espectroscopia infrarroja la presencia del Alfa tocoferol en los velos de nanofibras y con ello el proceso de encapsulado. Adicionalmente se destaca que el aumento en la % Transmitancia de esta señal es proporcional al incremento en la concentración del componente activo encapsulado en las fibras, siendo de 5% en la muestra A6-15, 7.5% en A7-15 y 10% en A8-15. (Shriner Ralph, et al., 2008)

Continuando con el análisis de los espectros obtenidos, pero ahora en la zona llamada "Huella Digital" que va de 1300 a 909  $\text{cm}^{-1}$ , donde pese a que se presentan bandas de forma vibracional intermitente, es en esta porción del espectro infrarrojo donde las señales obtenidas son casi únicas para cada compuesto.

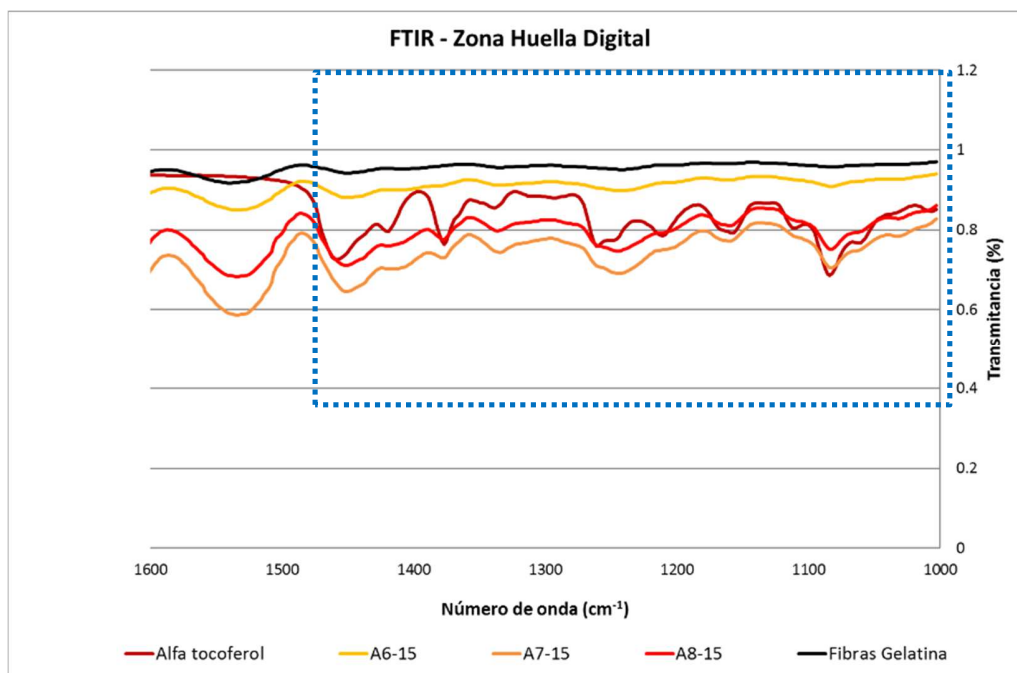


Figura 3-17. Espectro FTIR "Huella Digital" de fibras de Gelatina Tipo A al 22%; Fibras de Gelatina Tipo A al 22% con Alfa tocoferol encapsulado (A6-15 5%) (A7-15 7.5%) (A8-15 10%); Alfa tocoferol puro.

La Figura 3-17 donde se muestra el espectro FITR de la zona de huella digital generado por las muestra analizadas, nuevamente podemos constatar la presencia del alfa tocoferol en las fibras de Gelatina Tipo A, ya que existe una zona enmarcada en el cuadro azul, con vibraciones intermitentes propias de la molécula de la Vitamina E; Las cuales se visualizan en forma gradual en la muestras A6-15 , A7-15 y A8-15, aumentando de intensidad a medida que el porcentaje de encapsulación incrementa de 5% a 10%. (Silverstein Robert, et al., 1981)

### 3.3 Perfil de disolución de las fibras y liberación del alfa-tocoferol

Para el método de extracción se realizaron ensayos preliminares buscando las condiciones que permitieran liberar el compuesto. La máxima liberación se presentó a los 2 minutos de exposición, las muestras se colocaron en el Sonicador y fueron rotadas a una velocidad de 50 RPM en una solución buffer pH 7.2 y a temperatura ambiente. Resultados similares fueron reportados para la cinética de liberación de nanopartículas de alfatocoferol empleando proteína de suero (Wang, Gao, Li, Subirade, Song & Lang, 2016). Durante el proceso de hidratación las moléculas de la gelatina presentaron diferentes asociaciones moleculares y un proceso de hidratación, fenómeno que favoreció el rompimiento de las fibras a condiciones antes mencionadas.



Figura 3-18 Proceso de hidratación y liberación del alfa-tocoferol.

Durante el proceso de hidratación de la gelatina, se presentan diferentes estados de aglomeración, redes, clusters o relajación de las estructuras de aminoácidos mismas que se encuentran en equilibrio y son dependientes de las condiciones de hidratación, temperatura y pH. Por lo tanto, la liberación del alfa-tocoferol se llevó a cabo lentamente, bajo estas condiciones de agitación por 60 segundos. (Nandana & Subhas C., 2010).

Se probó su mecanismo de liberación sobre la piel humana, encontrándose una rápida liberación al ser sometido a un proceso de tensión durante su contacto con la piel humana, permitiendo que el alfa-tocoferol se liberara rápidamente en el tejido cutáneo, la velocidad se atribuye a la temperatura corporal de aproximadamente 35°C, la cual facilitó la hidratación de la Gelatina y el rompimiento de las cadenas de los aminoácidos. En la Figura 3-19 se puede apreciar además del proceso de liberación, el efecto hidratante y tensor generado por la exposición del velo de nanofibras sobre la piel.



Aunque esta parte de la experimentación no estuvo planteada al inicio, se pensó en llevarla a cabo, para proponer una aplicación práctica para los velos de micro y nanofibras de Gelatina Tipo A con alfa-tocoferol encapsulado.



Figura 3-20 Demostración de la hidratación de la Vitamina E sobre la piel.

Dadas las características estructurales de la gelatina tipo A, ésta tiene efectos regenerativos y de hidratación para el tejido cutáneo, coadyuvado por la presencia del alfa-tocoferol encapsulado y posteriormente liberado de la fibra.

### 3.4 Efecto protector de la gelatina contra la oxidación de la Vitamina E.

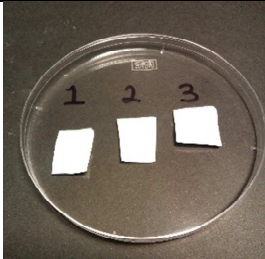
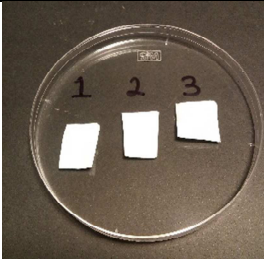
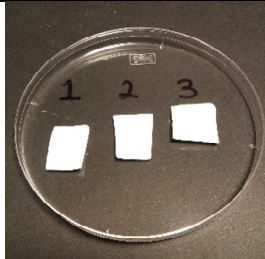
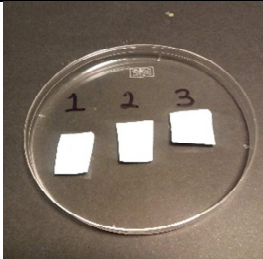
Con la finalidad de evaluar el efecto protector de la Gelatina tipo A al encapsular la vitamina E, los velos de fibras se expusieron a la radiación de luz ultravioleta durante los periodos de 30, 60 y 180 min. Las muestras se irradiaron en tres etapas con un bajo consumo de energía con el fin de simular la energía solar durante el mediodía:

- Exposición de 30 minutos:  $1.4202 \text{ J/cm}^2$
- Exposición de 60 minutos:  $2.8404 \text{ J/cm}^2$
- Exposición de 180 minutos:  $8.5212 \text{ J/cm}^2$

Posteriormente se evaluaron por cambio de color mediante el equipo Colorflex CD 1932, la evidencia de la oxidación del alfa-tocoferol. Se reporta fotoestabilidad de las fibras desarrollados a la radiación UV a dos longitudes de onda, 365 nm (UVA) y 312 nm (UVB), dado que para los tiempos de exposición de 30 y 60 minutos no se presentaron diferencias

significativas en el color de las fibras, ver Tabla 3-14 . Sólo se presentó un ligero cambio de color para la exposición de 180 minutos, por lo tanto, estos últimos datos fueron los analizados.

Tabla 3-14 Muestras de velos de nanofibras irradiados en la Cámara UVC.

Testigo	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3
			
Tiempo de exposición: 0 min	Tiempo de exposición: 30 min	Tiempo de exposición: 90 min	Tiempo de exposición: 180 min

El espacio CIELAB (Figura 3-21) permite descomponer el color de una imagen, en un espacio tridimensional. El parámetro L es el de luminosidad (lightness) y va de 0 (negro) a 100 (blanco). Los otros dos ejes de coordenadas son  $a^*$  y  $b^*$ ; El parámetro  $a^*$  representan variación entre rojizo-verdoso, en cambio el valor de  $b^*$  muestra las variaciones de amarillento-azulado. Aquellos casos en los que  $a^* = b^* = 0$  son acromáticos; por eso el eje  $L^*$  representa la escala acromática de grises que va de blanco al negro.

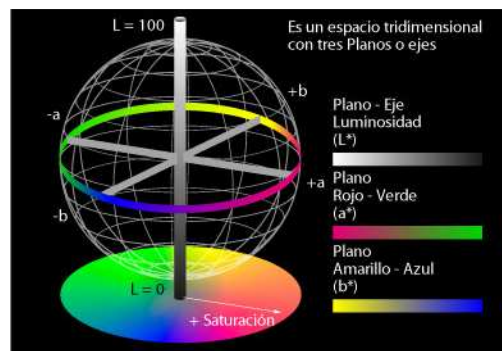


Figura 3-21 Espacio de color CIELAB.

Las proporciones de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  se obtienen de los valores tri-estímulos de acuerdo con las siguientes transformaciones:

$$L^* = 116[(Y/Y_n)^{1/3} - 16, Y_n)^{1/3}]$$

$$a^* = 500[(X/X_n)^{1/3} - (Y/Y_n)^{1/3}]$$

$$b^* = 200[(Y/Y_n)^{1/3} - (Z/Z_n)^{1/3}]$$

Donde  $X_n$ ,  $Y_n$ , and  $Z_n$  son los respectivos valores de X, Y y Z con el iluminante que se haya usado para obtener los valores X, Y y Z de la muestra.

Durante el proceso de oxidación se ha apreció un cambio considerable en el color sólo en la muestra con exposición de 180 minutos, tornándose hacia superficies amarillas, razón por la cual se determinó los parámetros L, a, y b, así como el cambio de su color.

$$\Delta E = \sqrt{(L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2}$$

Tabla 3-15 Valores experimentales promedio del espacio CIELAB, testigo vs 180 min.

Código	$\Delta E$			Desv. Estándar
	30 min	60 min	180 min	
A6-15	0.22	0.41	1.61	0.56
A7-15	0.32	0.50	4.10	0.34
A8-15	0.31	0.61	5.13	0.57

Tiempo de exposición: 180 min

Código	$\Delta E (L)$	$\Delta E (a)$	$\Delta E (b)$
A6-15	2.6387	0.1836	1.2036
A7-15	6.7231	0.8005	2.2077
A8-15	7.7834	1.5436	4.0674

Como es fácilmente apreciable en la Tabla 3-15, la diferencia de color ( $\Delta E$ ) fue mayor para un tiempo de exposición de 180 min en las tres muestras de fibras expuestas, siendo mayor para la A8-15 debido a una mayor concentración de Vitamina E encapsulada. Estos

resultados permiten concluir, que el proceso de encapsulación fue eficiente y podría ser aplicado comercialmente como protector solar con tiempo de exposición mínimo de 180 minutos.

Con respecto a los valores de L, a y b se observa que los cambios en los parámetros L y b fueron de mayor magnitud indicando que las fibras durante su exposición a la radiación UV, presentaron un decremento de la luminosidad (L) y un aumento en la tonalidad amarilla (b), resultado del inicio de reacciones de oxidación del alfa-tocoferol encapsulado en la fibra. Esta investigación contribuye al desarrollo de formulaciones foto-protectoras basados en nanofibras eficaces con un potencial terapéutico debido a la presencia de antioxidantes.

### 3.5 Concentración de alfa tocoferol en las fibras de gelatina

La concentración de alfa-tocoferol teórica en las nanofibras se obtuvo a partir de un balance de materia, al inicio y después del proceso de electrohilado. La concentración p/p agua: ácido acético: gelatina: alfa-tocoferol fue modificada significativamente. Dado que durante el proceso de electrohilado se eliminó en promedio el 97.81% del solvente contenido y con ello las concentraciones de Alfa-tocoferol y gelatina se incrementaron (Tabla 3-16).

**Tabla 3-16 Composición de alfa-tocoferol en las emulsiones formuladas antes y posterior al proceso de electrohilado (p/p %)**

Código	Alfa-tocoferol (% p/p)	
	Antes	Después
A6-15	4.8%	21.6%
A7-15	7.5%	30.7%
A8-15	9.5%	36.1%

Por ello se concluye que, desde el punto de vista fisicoquímico, microscópico, estructural y funcional, la formulación del código A7-15 (22 g Gelatina Tipo A, 30 %v/v ácido acético y 7.5 %v/v del alfa-tocoferol) fue la seleccionada para la posterior aplicación industrial

### 3.6 Prueba in vivo e irritabilidad de las fibras.

Debido a que una posible aplicación para los velos de nanofibras de gelatina con Vitamina E encapsulada será cosmetológica, se debe efectuar la prueba de sensibilización en piel humana basada en la NOM-039-SSA1-1993. Para el desarrollo de este estudio se requirió la participación de 20 voluntarios. Se aplicaron parches de 2 cm<sup>2</sup> a cada voluntario, previa firma del consentimiento, mismos que fueron ubicados en la cara interna del brazo, en donde permanecieron durante 3 horas, luego de transcurrido el tiempo, éstos se retiraron y se realizó la primera medición. Se observó la reacción producida en la piel. A las 24 horas de la aplicación y remoción de los parches se citó nuevamente a los pacientes para realizar una segunda medición.

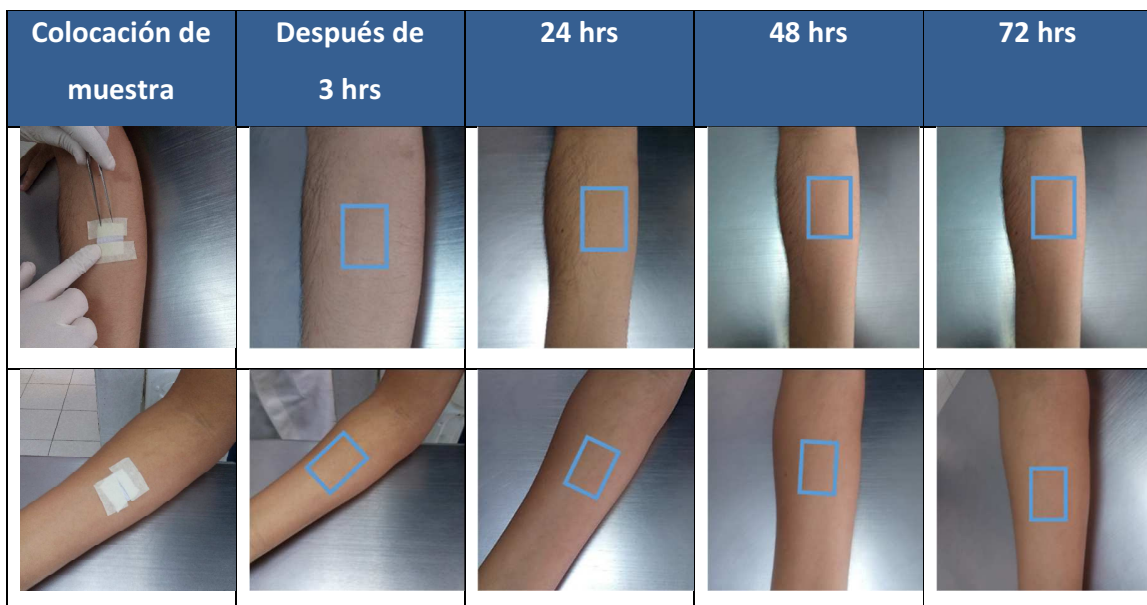


Figura 3-22 Pruebas de irritabilidad de las nanofibras.

Los resultados en el test de parche (Figura 3-22) mostraron una compatibilidad adecuada con el tejido cutáneo, dado que después de 24, 48 y 72 horas no hubo presencia de irritación en la piel donde se colocó la película con nanofibras de alfa-tocoferol. Se calculó el índice de irritación primaria y los resultados fueron cero, dado que ningún voluntario presentó irritación y por ello el producto se ubicó como NO IRRITANTE.

### 3.7 Aplicación

Definición: Máscara facial hidratante y antioxidante en base papel arroz. El diseño consiste en una película elaborada a partir de nanofibras de gelatina y alfa-tocoferol encapsulado soportada en una hoja de papel arroz, dicha hoja presenta un diseño del contorno facial que facilita su aplicación. (ver, Figura 3-23)

Se utiliza una base de hoja de papel arroz con características comerciales como densidad de área superficial entre 3.6 a 4.5 kg por 278.7 m<sup>2</sup> por capa. El producto es obtenido mediante la colocación del papel arroz en el rodillo colector del equipo de electrohilado, en el cual la película de nanofibras de Gelatina y alfa-tocoferol encapsulado es depositada durante el proceso de electrohilado por 60 minutos.



Figura 3-23 Aplicación práctica de las fibras de Gelatina Tipo A con alfa-tocoferol encapsulado.

## 4 Conclusiones

La técnica de electrospinning o electrohilado es una técnica novedosa que permitió la formación de las nanofibras de gelatina y alfa-tocoferol encapsulado.

El trabajo de experimentación fue obtenido siguiendo un diseño experimental, mismo que permitió la identificación de factores interno y externos y su efecto en la formación y características de las nanofibras obtenidas.

Como inicio fue posible evidenciar que el tipo de gelatina empleado, así como su concentración influyeron de forma importante en el proceso de formación de las fibras, dado que su estructura, así como la polaridad de los residuos poliméricos, afectaron las propiedades y su comportamiento electrónico.

Es importante mencionar que el conocimiento de la estructura del material encapsulante y formador de las fibras permite obtener resultados positivos más rápidamente en cuanto a la identificación de las condiciones para su formación.

Otro efecto significativo fue el hecho de probar diferentes voltajes que permitieron la formación de las fibras, dado que los voltajes altos generaron fibras más uniformes, mientras que bajos voltajes no permitieron la formación de las fibras.

Con respecto a las condiciones de formación de las fibras se determinó experimentalmente el uso de voltaje de 15 KV para el polo positivo y 15 KV para el polo negativo permitieron obtener resultados positivos.

La morfología de las nanofibras obtenidas por este método varió en función de las condiciones de obtención previamente identificadas mismas que se presentaron en la Tabla 3-3 y Tabla 3-4 de la sección de resultados.

Se obtuvieron diferentes características térmicas mismas que permitieron identificar que las fibras encapsularon adecuadamente al alfa tocoferol a temperatura superior a la atmosférica y con ello asegurando la protección del antioxidante propuesto.

Con respecto a la humectabilidad y capacidad de liberación del material, se detectó que, dadas las características y naturaleza polar de la gelatina, las fibras desarrolladas presentaron un proceso de hidratación de 30 segundos, tiempo corto el cual permitió una rápida hidratación y adhesión al tejido cutáneo.

Con respecto a la aplicación de esta técnica se concluye que es una técnica innovadora, que se encuentra en etapa de exploración para el desarrollo de nuevos materiales, siendo el propuesto en este trabajo de investigación una mascarilla humectante que permite la humectación cutánea dada la proteína animal que presenta, así como alfa-tocoferol, importante nutriente para el proceso reparador celular.

Se comprobó que fue posible la encapsulación de alfa tocoferol, mediante la espectroscopia FTIR, resaltando el potencial de esta, mediante la identificación de los enlaces dobles correspondientes a las moléculas.

## 5 Bibliografía.

Aranberri, I., Binks, B. P., Clint, J. H. & Fletcher, P. D. I., 2006. Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensioactivos. *Iberoamericana de polímeros*, Volumen 7, pp. 211 - 231.

Avantor Performance Materials, I., 2011. *Material Safety Data Sheet*. Center Valley: Avantor Performance Materials.

Blé-Castillo, J. L., Díaz-Zagoya, J. C. & Méndez, J. D., 2008. Suplementación con Vitamina E, ¿Benéfica o dañina?. *Medigraphic (Gac Méd Méx)*, 144(2), pp. 147 - 154.

Burger, C., Hsiao, B. S. & Chu, B., 2006. Nanofibrous materials and their applications. *Reviews in advance*, Issue 36, pp. 333 - 368.

Calero, N., Muñoz, J. & Guerrero, A., 2013. Efecto del pH en emulsiones o/w formuladas con proteína de patata y quitosano.. *Grasas y aceites del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Sevilla*, pp. 15 - 21.

Cerecedo Núñez, H. H., Hernández Vázquez, E. E. & Padilla Sosa, P., 2010. Nanociencia y nanotecnología. *La ciencia y el hombre*, p. Volumen XXIII No.2.

Deitzel, J. M., Kleinmeyer, J. D., Hirvonen, J. K. & Beck Tan, N. C., 2001. Controlled deposition of electrospun poly (ethyleneoxide) fibers. *Polymer*, pp. 8163-8170.

Deng-Guang, Y. y otros, 2014. Coaxial electrospinning with mixed solvents: From flat to round eudragit L100 nanofibers for better colon-targeted sustained drug release profiles. *Journal of Nanomaterials*, Issue 967295, pp. 1-8.

Díaz del Castillo Rodríguez, F., 2012. *Introducción a los nanomateriales*, Estado de México: Facultad de estudios superiores Cuautitlán (UNAM). Departamento de Ingeniería. Laboratorio de tecnología de materiales..

Duque Sánchez, L. M., Rodríguez, L. & López, M., 2013. Electrospinning: La era de las nanofibras. *Iberoamericana de Polímeros*, pp. 10 - 27.

Frenot, A. & Chronakis Ioannis, S., 2003. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, Issue 8, pp. 64 - 75.

Gamboa, W., Mantilla, O. & Castillo, V., 2007. *Producción de micro y nano fibras a partir de la técnica "electrospinning" para aplicaciones farmacológicas*, Habana, Cuba.: Fundación Cardiovascular de Colombia. Grupo Bioingeniería.

García Ceja, A. & López Malo, A., 2012. Biopolímeros utilizados en la encapsulación. *Temas selectos de ingeniería de alimentos UDLAP*, pp. 84 - 97.

García Chávez, R. & Mendoza Martínez, A. M., 2010. Estudio de las propiedades morfológicas y reológicas de una red híbrida de polímeros sintetizada a partir de tres biopolímeros: Gelatina/Quitosa/Dextran.. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, Volumen 11, pp. 88 - 109.

Gelita, 2011. *Material Safety Data Sheet*. Toronto(Stn. Main): s.n.

Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I. & Mulligan, C. N., 1999. Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, Volumen 50, pp. 213 - 224.

GMIA, 2012. *Gelatin Handbook*. EUA: Gelatin manufacturers institute of América.

Granda-Restrepo, D., Medina-Pineda, Y., Culebras-Rubio, M. & Gómez-Clari, C., 2014. Desarrollo y caracterización de una película activa biodegradable con antioxidantes (Alfa-tocoferol) a partir de las proteínas del lactosuero. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 21(1), pp. 11-19.

Gutiérrez Pulido, H. & De la Vara Salazar, R., 2012. *Análisis y Diseño de Experimentos*. México, D.F.: Mc Graw Hill.

Hernández Jaimes, M. d. C., 2009. *Encapsulación en nanoemulsiones de extractos de Equisetum Arvense*, México: Universidad Autónoma Metropolitana.

Jia Horng, L. y otros, 2015. Manufacturing techniques and property evaluations of PVA/Gelatin electrospinning nanofiber membranes. *Applied Mechanics and Materials*, Volumen 749, pp. 178 - 181.

Ju-Ha, S., Hyoun-Ee, K. & Hae-Won, K., 2008. Production of electrospun gelatin nanofiber by water-based co-solvent approach. *Journal of Materials Science*, Volumen 19, pp. 95 - 102.

Kosegarten-Conde, C. & Jiménez-Munguía, M., 2012. Factores principales que interviene en la estabilidad de una emulsion doble. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos UDLAP*, Issue 6, pp. 1-18.

Lei, L. & You-Lo, H., 2006. Chitosan bicomponent nanofibers and nanoporous fibers. *Carbohydrate Research*, Issue 341, pp. 374 - 381.

Li, D., McCann, J. T. & Xia, Y., 2005. Use of electrospinning to directly fabricate hollow nanofibers with functionalized inner and outer surfaces. *Small*, Issue 1, pp. 83-86.

Loera Serna, S., Ruiz Angeles, J., Flores Moreno, J. & Soto Portas, L., 2012. Protegiendo fármacos con nanomateriales inteligentes. *Mundo Nano UNAM*, 5(1), pp. 1-10.

Nagihan, O., Pinar, T. & Filiz, A., 2014. Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers. *Food Hydrocolloids 39*, Issue 39, pp. 19-26.

Nandana, B. & Subhas C., K., 2010. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances 28*, Issue 28, p. 325–347.

Navideh, A. y otros, 2014. Preparation of Astaxanthin Nanodispersions Using Gelatin-Based Stabilizer System. *Molecules*, Issue 9, pp. 14257-14265.

- Odian, G., 2004. *Principles of polymerization*. New York: John Wiley & Sons, Inc..
- Poole Charles, P. & Owens Frank, J., 2007. *Introduction to Nanotechnology*. Barcelona, España: Reverté, S.A..
- Prasanth, R. y otros, 2012. Electrospun polymer nanofibers: The booming cutting edge technology. *Reactive and Functional Polymers*, pp. 915 - 930.
- Rojas Cortés, M. G., Vallejo Díaz, B. M. & Ernesto Perilla, J., 2008. Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico.. *Ingeniería e investigación*, pp. 57 - 71.
- Sahay, R., Thavasi, V. & Ramakrishna, S., 2011. Design modifications in electrospinning setup for advanced applications. *Journal of nanomaterials*, pp. 1-17.
- Sandoval Aldana, A., Rodríguez Sandoval, E. & Ayala Aponte, A., 2004. Encapsulacion de aditivos para la industria de alimentos. *Revista Científica y Tecnológica de la Universidad del Valle*, Volumen 5, p. 73 a 83.
- Shriner Ralph, L. y otros, 2008. *The systematic identification of organic compounds*. New York: Limusa Wiley.
- Sigma-Aldrich, 2011. *Producto Information*. St. Louis: Sigma-Aldrich, Inc..
- Silverstein Robert, M., Clayton Bassler, G. & Morrill Terence, C., 1981. *Spectrometric identification of organic compounds*. New York: John Wiley & Sons, Inc..
- Skoog Douglas, A., Holler F., J. & Crouch Stanley, R., 2008. *Principios de análisis instrumental*. México D.F.: Cengage Learning Editores.
- Xavier M., P. y otros, 2011. Encapsulación de quercetina en nano y micro-emulsiones alimenticias. *Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay*, Issue 6, pp. 37 - 41.

Yang, C. y otros, 2009. *Comparisons of fibers properties between vertical and horizontal type electrospinning systems*, Pekín: Annual Report Conference on Electrical Isulation and Dielectric Phenomena.

Yanzhong, Z. y otros, 2004. Electrospinning of Gelatin Fibers and Gelatin/PCL Composite Fibrous Sacffolds. *Interscience*, pp. 156 - 165.

Yu, J. y otros, 2008. Production of aligned helical polymer nanofibers by electrospinning. *European Polymer Journal*, Volumen 44, pp. 2838-2844.

Zheng-Ming, H., Y.-Z., Z., Kotaki, M. & Ramakrishna, S., 2003. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites science and technology*, Issue 63, pp. 2223-2253.