



# Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Facultad de Químico Farmacobiología  
Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas  
Opción en: “Biotecnología Alimentaria”

## TESIS

“Estudio de la estabilidad del ácido fólico contenido en nanofibras  
de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno obtenidas por  
electrohilado”

Para obtener el grado de: Doctora en Ciencias Biológicas

Presentada por:  
M.C. Karen Aloha Zavala Castillo

Directora de tesis: D.C. Nelly Flores Ramírez  
Co-director de tesis: D.C. Salomón R. Vásquez

Morelia, Michoacán. Julio de 2024.

---

## RESUMEN

### “Estabilidad del ácido fólico contenido en nanofibras de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno obtenidas por electrohilado”

El ácido fólico (AF) es esencial para prevenir enfermedades y malformaciones congénitas durante el embarazo, obteniéndose a través de alimentos fortificados. Sin embargo, su estructura se degrada por radiación ultravioleta, pH ácido y altas temperaturas en la industria alimentaria. Este estudio busca preservar su integridad mediante su interacción con carboximetilcelulosa (CMC) y óxido de polietileno (PEO) en nanofibras obtenidas por electrohilado. El análisis por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier FTIR reveló puentes de hidrógeno entre carboximetilcelulosa y óxido de polietileno, y posiblemente un enlace amida entre carboximetilcelulosa y AF. La microscopía electrónica de barrido (MEB) mostró fibras sin ácido fólico con diámetro promedio de 119 nm, mientras que con ácido fólico disminuyó a 88 nm, con eficiencia de encapsulado del 94.5%. La estabilidad del ácido fólico en las nanofibras ante UV y pH ácido fue mayor que en el ácido fólico sin protección. Termogravimetría (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) demostraron protección térmica de las nanofibras con ácido fólico, con interferencia recíproca entre CMC y PEO, y mejorada estabilidad térmica e influencia en la temperatura de fusión y el calor de fusión. La liberación del AF de las nanofibras fue mayor a pH 3.0 que a 1.2 en condiciones in vitro, con 95% de liberación a pH 7.6, similar a las condiciones intestinales.

**Palabras clave:** vitamina B9, fotoestabilidad, biopolímero, degradación, nanoestructura.

## ABSTRACT

Folic acid (AF) is essential for preventing diseases and congenital malformations during pregnancy, obtained through fortified foods. However, its structure degrades due to ultraviolet radiation, acidic pH, and high temperatures in the food industry. This study aims to preserve its integrity through interaction with carboxymethylcellulose (CMC) and polyethylene oxide (PEO) in electrospun nanofibers. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis revealed hydrogen bonds between carboxymethylcellulose and polyethylene oxide, and possibly an amide linkage between carboxymethylcellulose and AF. Scanning electron microscopy (SEM) showed fibers without AF with an average diameter of 119 nm, while with AF decreased to 88 nm, with an encapsulation efficiency of 94.5%. The stability of AF in nanofibers against UV and acidic pH was higher than in unprotected folic acid. Thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC) demonstrated thermal protection of nanofibers with AF, with reciprocal interference between CMC and PEO, and improved thermal stability influencing the melting temperature and enthalpy. The release of AF from nanofibers was higher at pH 3.0 than at 1.2 under in vitro conditions, with 95% release at pH 7.6, similar to intestinal conditions.

**Keywords:** nanofibers, electrospinning, folic acid, carboxymethylcellulose

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por el apoyo económico proporcionado para la realización del presente proyecto.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, especialmente a la Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera, por la infraestructura prestada para la realización del presente trabajo.

A mi asesora la D.C. Nelly Flores Ramírez por su guía académica y personal en todo momento.

A mi co-asesor el D.C. Salomón R. Vásquez por su apoyo en la realización del presente trabajo de tesis.

Al D.C. Héctor E. Martínez, por las facilidades prestadas para trabajar en el Laboratorio de Investigación y Análisis de Alimentos de la Facultad de Químico Farmacobiología, así como las importantes aportaciones para la realización del presente trabajo.

A la D.C. Ma. Guadalupe Garnica por las aportaciones y consejos para la realización del presente trabajo.

Al D.C. Leandro García, por las aportaciones y consejos para la realización del presente trabajo.

A los compañeros del Posgrado de la Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera y del Posgrado de Química del Laboratorio de polímeros, por compartir sus conocimientos conmigo y ayuda en el laboratorio.

## ÍNDICE

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
Resumen	I
Abstract	Ii
Agradecimientos	Iii
Lista de figuras	Ix
Lista de tablas	Xiv
Abreviaturas	Xvii
Glosario de términos	Xviii
Congresos	Xix
<b>Capítulo I. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 Generalidades	1
1.2 Objetivo general	2
1.2.1 Objetivos particulares	2
1.3 Justificación de la investigación	3
1.4 Planteamiento del problema	4
1.5 Hipótesis	4
<b>Capítulo II. Marco Teórico</b>	<b>5</b>
2.1 Antecedentes	5
2.2 Nanotecnología en la industria alimentaria	6
2.3 Nanoencapsulación	6
2.3.1 Métodos de nanoencapsulación	6
2.4 Proceso de electrohilado	7
2.4.1 Equipo de electrohilado	7
2.5 Parámetros del proceso	8
2.5.1 Voltaje aplicado	8
2.5.2 Velocidad de flujo	8
2.5.3 Tipos de colectores	9
2.5.4 Distancia del capilar al colector	9
2.6 Parámetros de la solución polimérica	9
2.6.1 Concentración	9

2.6.2	Peso molecular	10
2.6.3	Viscosidad	10
2.6.4	Tensión superficial relativa	11
2.6.5	Conductividad eléctrica	11
2.7	Parámetros ambientales	11
2.8	Ácido fólico como componente bioactivo	12
2.8.1	Estabilidad del ácido fólico	12
2.9	Carboximetilcelulosa sódica	13
2.9.1	Generalidades	13
2.9.2	Aplicaciones en la industria alimentaria	14
2.10	Óxido de polietileno	15
2.10.1	Generalidades	15
2.11	Métodos de caracterización de nanofibras poliméricas	15
2.12	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	15
2.13	Microscopía electrónica de barrido (MEB) con detector de energía dispersiva	16
2.14	Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)	17
2.15	Termogravimetría (TGA)	17
2.16	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	18
<b>Capítulo III. Metodología y materiales</b>		19
3.1	Reactivos y solventes	19
3.2	Procedimientos experimentales	19
3.2.1	Preparación de soluciones poliméricas sin y con ácido fólico	19
3.2.2	Obtención de nanofibras por electrohilado	20
3.3	Técnicas de caracterización de las soluciones poliméricas	20
3.3.1	Viscosidad	20
3.3.2	Conductividad eléctrica	20
3.3.3	Ángulo de contacto	21
3.3.4	Tensión superficial de líquidos por pesada hidrostática (Ley de Tate)	21
3.4	Técnicas de caracterización de las nanofibras	23
3.4.1	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	

para análisis estructural	23
3.4.2 Análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido (MEB)	23
3.4.3 Eficiencia de encapsulado del ácido fólico (EE)	23
3.4.4 Estudio de la estabilidad del ácido fólico en nanofibras frente a radiación ultravioleta tipo A	24
3.5 Estudio de estabilidad del ácido fólico en nanofibras en pH ácido	24
3.6 Estudio del comportamiento térmico del ácido fólico en nanofibras mediante termogravimetría (TGA/DTG) y calorimetría diferencial de barrido (DSC)	25
3.7 Perfil de liberación del ácido fólico contenido en nanofibras a pH ácido y alcalino <i>in vitro</i> similar al pH gastrointestinal	25
<b>Capítulo IV. Resultados y discusión</b>	26
4.1 Solución de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno sin ácido fólico (CMC/PEO)	26
4.2 Solución de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno con ácido fólico (CMC/PEO/AF)	28
4.3 Generación de nanofibras poliméricas por el método de electrohilado	29
4.3.1 Parámetros de equipo para electrohilar la solución de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno sin ácido fólico	29
4.3.2 Parámetros de equipo para electrohilar la solución de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno con ácido fólico	31
4.4 Análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido (MEB) con detector de energía dispersiva (EDS)	33
4.4.1 Fibras de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno sin ácido fólico	33
4.4.2 Fibras de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno con ácido fólico	35
4.5 Optimización de los parámetros de las soluciones poliméricas y del equipo	37
4.5.1 Rendimiento de producción	40
4.6 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	40
4.6.1 Películas poliméricas con ácido fólico	40
4.6.2 Fibras de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno electrohiladas con ácido fólico	42

4.7 Microscopía electrónica de barrido (MEB) con detector de energía dispersiva (EDS)	44
4.7.1 Películas poliméricas con ácido fólico	44
4.7.2 Fibras de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno sin ácido fólico	45
4.7.3 Nanofibras de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno con ácido fólico	48
4.8 Eficiencia de encapsulado del ácido fólico en nanofibras electrohiladas	50
4.9 Estudio de la fotoestabilidad del ácido fólico	51
4.9.1 Análisis de varianza (ANOVA) de los tratamientos irradiados con luz ultravioleta	52
4.9.2 Prueba de Tukey (comparación de medias)	52
4.10 Estudio de la estabilidad del ácido fólico en medios con pH ácido	53
4.10.1 Análisis de varianza (ANOVA) de los tratamientos en solución con pH de 3	54
4.10.2 Prueba de Tukey (comparación de medias)	54
4.10.3 Análisis de varianza (ANOVA) de los tratamientos en solución con pH de 5.8	57
4.10.4 Prueba de Tukey (comparación de medias)	57
4.11 Estudio de la estabilidad térmica de los polímeros y del ácido fólico por termogravimetría (TGA)	59
4.11.1 Análisis de la estabilidad térmica de películas poliméricas con ácido fólico	62
4.11.2 Análisis de la estabilidad térmica de fibras de CMC/PEO sin y con ácido fólico	64
4.12 Estudio de la estabilidad térmica de los polímeros y del ácido fólico por calorimetría diferencial de barrido (DSC)	67
4.12.1 Análisis de las transiciones térmicas de películas de carboximetilcelulosa y óxido con ácido fólico por DSC	70
4.12.2 Análisis de las transiciones térmicas de fibras de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno sin y con ácido fólico por DSC	72

4.12.3 Análisis comparativo de las transiciones térmicas de las películas y fibras de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno con ácido fólico por DSC	74
4.13 Perfil de liberación del ácido fólico contenido en nanofibras de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno en medio acuoso con pH ácido y alcalino <i>in vitro</i> simular al pH gastrointestinal	74
<b>Capítulo V. Conclusiones</b>	77
<b>Capítulo VI. Recomendaciones</b>	78
<b>Capítulo VII. Referencias</b>	79

**LISTA DE FIGURAS**

<b>No. de Figura</b>	<b>Nombre</b>	<b>Página</b>
1	Esquema del proceso de electrohilado tradicional	8
2	Estructura química del ácido fólico	13
3	Estructura química de un segmento representativo de la cadena de carboximetilcelulosa	15
4	Estructura química del óxido de polietileno	16
5	Viscosímetro digital de Brookfield	22
6	Medidor portátil de conductividad eléctrica	23
7	Goniómetro manual	23
8	Perfil de una gota colgante mostrando las variables de la Ley de Tate	24
9	Muestra representativa de la solución de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno sin ácido fólico	28
10	Muestra representativa de la solución de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno con ácido fólico	30
11	Equipo de electrohilado: a) empleo de una caja de acrílico para control de parámetros ambientales y b) partes del equipo	31
12	Proceso de electrohilado: a) equipo de electrohilado, b) producto final de la solución CP-II, c) equipo de electrohilado y d) producto final de la solución CP-III.	32
13	Evidencia de la dificultad para electrohilar la solución CP-I	33
14	Proceso de electrohilado: a) Equipo de electrohilado, b) producto final de la solución CAP-I, c) equipo de electrohilado y d) producto final de la solución CAP-II	34
15	Micrografías por MEB de zonas representativas de la muestra CP-II a diferentes ampliaciones: a) 1,000x, b) 2,500x, c) 5,000x y d) 10,000x con medición aproximada de diámetro	35

16	Micrografías por MEB de zonas representativas de la muestra CP-III a diferentes ampliaciones: a) 1,000x, b) 2,500x, c) 5,000x y d) 10,000x con medición aproximada de diámetro	36
17	Espectro EDS de la muestra CP-III	37
18	Micrografías por MEB de zonas representativas de la muestra CAP-I a diferentes ampliaciones: a) 1,000x, b) 2,500x, c) 5,000x y d) 10,000x con medición aproximada de diámetro	37
19	Micrografías por MEB de zonas representativas de la muestra CAP-II a diferentes ampliaciones: a) 1,000x, b) 2,500x, c) 5,000x y d) 10,000x con medición aproximada de diámetro	38
20	Espectro EDS de la muestra CAP-II	39
21	Equipo de electrohilado: a) ajustes del equipo de electrohilado, b) producto final de la solución CP-IV y c) producto final de la solución CAP-III	41
22	Espectro infrarrojo de las películas poliméricas con ácido fólico: a) CMC/AF, b) PEO/AF y c) CMC/AF/PEO	44
23	Espectro infrarrojo de: a) película de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno con ácido fólico y b) fibras electrohiladas de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno con ácido fólico	45
24	Micrografías por MEB de una zona representativa de la película de CMC/AF a diferentes ampliaciones: a) 1,000x, b) 2,500x y c) 10,000x, respectivamente	46
25	Micrografías por MEB de una zona representativa de la película de PEO/AF a diferentes ampliaciones: a) 1,000x, b) 2,500x y c) 10,000x, respectivamente	46
26	Micrografías por MEB de una zona representativa de la película de CMC/PEO con ácido fólico a diferentes ampliaciones: a) 1,000x, b) 2,500x y c) 10,000x, respectivamente	47

27	Micrografías por MEB a diferentes ampliaciones de fibras de CMC/PEO sin ácido fólico: a) 1,000x, b) 2,500x, c) 5,000x y d) 10,000x, respectivamente	48
28	Espectro EDS de una muestra representativa de las fibras de CMC/PEO sin ácido fólico	49
29	Distribución del diámetro de las fibras de CMC/PEO sin ácido fólico obtenidas mediante la técnica de electrohilado	49
30	Micrografías por MEB a diferentes ampliaciones de las nanofibras de CMC/PEO sin ácido fólico a) 1,000x, b) 2,500x, c) 5,000x y d) 10,000x, respectivamente	50
31	Espectro EDS de una muestra representativa de las nanofibras de CMC/PEO con ácido fólico	51
32	Distribución del diámetro de las nanofibras de CMC/PEO con ácido fólico	52
33	Curva de calibración de ácido fólico	52
34	Estudio de la fotoestabilidad del ácido fólico: a) tratamientos P-AF, NF-AF y AF-libre y b) sistema usado para irradiar con luz ultravioleta los tratamientos en solución buffer (pH de 7)	53
35	Porcentaje de ácido fólico degradado en los distintos tratamientos después de ser irradiados con luz ultravioleta al transcurrir 1 h	54
36	Estabilidad del ácido fólico contenido en los distintos tratamientos en solución con pH de 3 (P-AF, NF-AF y AF-libre: a) después de 15 días y b) después de 30 días	56
37	Porcentaje de ácido fólico degradado en los distintos tratamientos: P-AF, NF-AF y AF-libre después de 15 y 30 días en solución con pH=3 y oscuridad	58
38	Sistema utilizado para los tratamientos P-AF, NF-AF y AF-libre en medio acuoso con pH de 5.8: a) después de 15 días y b) después de 30 días	58

39	Porcentaje de ácido fólico degradado en los distintos tratamientos: P-AF, NF-AF y AF-libre después de 15 y 30 días en solución con pH de 5.8 y en oscuridad	60
40	Termograma del ácido fólico: a) TGA y b) DTG	62
41	Termograma de la carboximetilcelulosa: a) TGA y b) DTG	63
42	Termograma del óxido de polietileno: a) TGA y b) DTG	63
43	Termograma de la película de carboximetilcelulosa-ácido fólico	64
44	Termograma de la película óxido de polietileno-ácido fólico	65
45	Termograma de la película de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno y ácido fólico	66
46	Termograma de las fibras de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno sin ácido fólico	67
47	Termograma de las nanofibras de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno y ácido fólico	68
48	Curva DSC del ácido fólico	70
49	Curva DSC de la carboximetilcelulosa	71
50	Curva DSC del óxido de polietileno	71
51	Curva DSC de la película de carboximetilcelulosa con ácido fólico	72
52	Curva DSC de la película de óxido de polietileno con ácido fólico	73
53	Curva DSC de la película de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno y ácido fólico	73
54	Curva DSC de fibras de: a) carboximetilcelulosa-óxido de polietileno sin ácido fólico y b) carboximetilcelulosa-óxido de polietileno con ácido fólico	75
55	Sistema utilizado para conocer el perfil de liberación del ácido fólico contenido en nanofibras de carboximetilcelulosa-óxido	77

de polietileno a distintos pH (1.2, 3 y 7.8) similar al pH gastrointestinal

- 56 Porcentaje promedio del ácido fólico liberado de nanofibras de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno después de 2 h en una solución con pH de 1.2, con pH de 3 y después de 4h a un pH de 7.8, todos los sistemas a 37 °C

78

**LISTA DE TABLAS**

<b>No. de tabla</b>	<b>Nombre</b>	<b>Página</b>
1	Parámetros de solución de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno reportados en la literatura	29
2	Parámetros experimentales de las soluciones de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno sin ácido fólico	29
3	Parámetros experimentales de las soluciones de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno con ácido fólico	30
4	Parámetros iniciales del equipo para el electrohilado de las soluciones de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno sin ácido fólico	31
5	Condiciones de operación para el electrohilado de las soluciones de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno sin ácido fólico	32
6	Parámetros iniciales del equipo para el electrohilado de las soluciones de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno con ácido fólico	33
7	Condiciones de operación para el electrohilado de las soluciones de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno con ácido fólico	34
8	Análisis EDS de las muestras poliméricas sin ácido fólico	36
9	Análisis EDS de las muestras poliméricas con ácido fólico	38
10	Parámetros ensayados y óptimos de las soluciones poliméricas sin y con ácido fólico	40
11	Condiciones de operación para el electrohilado de las soluciones poliméricas sin y con ácido fólico	40
12	Registro de la temperatura de trabajo durante el proceso de electrohilado de la solución con el código CAP-III	41
13	Rendimiento de producción de las películas electrohiladas con y sin ácido fólico	42
14	Análisis EDS de las fibras ultrafinas sin ácido fólico	48

15	Análisis EDS de nanofibras poliméricas con ácido fólico	51
16	Concentración de ácido fólico contenido en los diferentes tratamientos al ser irradiados con luz ultravioleta tipo A en el transcurso de 1 h	53
17	Análisis de varianza de los distintos tratamientos	54
18	Comparación de medias prueba de Tukey con 0.05 de significancia	54
19	Concentración de ácido fólico contenido en los distintos tratamientos en solución con pH de 3 y en oscuridad al transcurrir 15 y 30 días	56
20	Análisis de varianza de los distintos tratamientos con pH de 3	56
21	Comparación de medias prueba de Tukey con 0.05 de significancia	57
22	Concentración de ácido fólico contenido en los distintos tratamientos en solución con pH de 5.8 y en condiciones de oscuridad después de 15 y 30 días	59
23	Análisis de varianza de los distintos tratamientos	59
24	Comparación de medias prueba de Tukey con 0.05 de significancia	59
25	Pérdida de masa en función de la temperatura del ácido fólico	61
26	Pérdida de masa en función de la temperatura de la carboximetilcelulosa	62
27	Pérdida de masa en función de la temperatura de las distintas películas poliméricas con ácido fólico	66
28	Pérdida de masa en función de la temperatura de distintas matrices poliméricas con ácido fólico reportado en la literatura	69
29	Transiciones térmicas del ácido fólico por calorimetría diferencial de barrido	70
30	Transiciones térmicas de la carboximetilcelulosa por DSC	70
31	Transiciones térmicas de películas poliméricas con ácido fólico por DSC	74

- 32 Porcentaje de liberación del ácido fólico contenido en nanofibras de CMC-PEO a diferentes pH (1.2, 3 y 7.8) similar al pH gastrointestinal después de 4 h y a 37 °C

77



<b>ABREVIATURA</b>	<b>NOMBRE</b>
<b>Abs</b>	Absorbancia
<b>AF</b>	Ácido fólico
<b>CMC-AF</b>	Carboximetilcelulosa y ácido fólico
<b>CMC-Na</b>	Carboximetilcelulosa sódica
<b>CMC-PEO</b>	Carboximetilcelulosa y óxido de polietileno
<b>cP</b>	Centipoise
<b>EDS</b>	Detector de dispersión de energía
<b>DS</b>	Grado de sustitución
<b>DSC</b>	Calorimetría diferencial de barrido
<b>FTIR</b>	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
<b>M</b>	Peso molecular
<b>MEB</b>	Microscopía Electrónica de Barrido
<b>NF</b>	Nanofibras
<b>PEO</b>	Óxido de polietileno
<b>TGA</b>	Termogravimetría
<b>UV-Vis</b>	Espectroscopía visible- ultravioleta

## GLOSARIO DE TÉRMINOS

**Disolvente.** Líquido empleado para disolver una o más sustancias y obtener una disolución.

**Eficiencia de encapsulación.** Se refiere la cantidad del compuesto que fue cargado, relacionada con la concentración inicial utilizada.

**Enlace por puente de hidrógeno.** Es un tipo de interacción electrostática donde el hidrógeno forma un enlace covalente con un átomo electronegativo como el oxígeno y adquiere una carga positiva parcial. Esta carga positiva parcial del hidrógeno puede interactuar con otro átomo electronegativo y los tres átomos se alinean formando un puente de hidrógeno.

**Nanoencapsulación.** Consiste en atrapar un compuesto bioactivo en el interior de una matriz o agente encapsulante (generalmente un polímero) y de esta manera transportarlo y protegerlo de factores ambientales y de procesamiento.

**Solución o disolución.** Es una mezcla homogénea conformada por dos o más sustancias.

**Transición térmica.** Consiste en los cambios energéticos que experimenta un material polimérico por efecto de la temperatura, es decir, cuando se calienta o enfría.

**Viscosidad.** Es una propiedad que presentan los líquidos para fluir, es decir la facilidad o dificultad que tienen para moverse.

Resultados relacionados con esta investigación fueron presentados en los siguientes congresos:

1. Karen A. Zavala, Nelly Flores, Salomón R. Vásquez. “Ácido fólico injertado en carboximetilcelulosa para obtener nanopartículas como suplemento alimenticio”. 15° Foro Académico de Posgrado en Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Morelia, Michoacán, 7 y 8 de Noviembre, 2021 (cartel).
2. Karen A. Zavala, Nelly Flores, Salomón R. Vásquez. “Characterization and study in acid medium of folic acid/carboxymethyl cellulose nanofibers by electrospinning”. XXX International Materials Research Congress, Cancún del 14 al 19 de Agosto de 2022. (cartel).
3. Karen A. Zavala, Nelly Flores, Salomón R. Vásquez. “Estudio de la fotodegradación y análisis morfológico de nanofibras de ácido fólico-carboximetilcelulosa”. XLIII Encuentro Nacional de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C. Puerto Vallarta México, del 23 al 26 de Agosto de 2022 (cartel).
4. Karen A. Zavala, Nelly Flores, Salomón R. Vásquez. “Estudio de la estabilidad del ácido fólico contenido en nanofibras de carboximetilcelulosa obtenidas por electrohilado”. 16° Foro Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Morelia 7 y 8 de Noviembre de 2022 (oral).
5. Karen A. Zavala, Nelly Flores, Salomón R. Vásquez. “High protection efficiency of folic acid encapsulated in carboxymethyl cellulose-polyethylene oxide nanofibers”. 10<sup>th</sup> Food Science, Biotechnology and Safety Congress Latin Food Puebla, México del 16 al 18 de Noviembre de 2022 (cartel).

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Generalidades

La deficiencia nutricional de ácido fólico conlleva a la aparición de padecimientos cardiovasculares, algunos tipos de cáncer, anemia megaloblástica, problemas neurológicos, defectos del tubo neural durante la gestación (Henry *et al.*, 2017; Ferrazzi *et al.*, 2020) y en los últimos años, se ha investigado su posible participación en problemas de fertilidad masculina (Najafipour *et al.*, 2017; Yuan *et al.*, 2017). Dada su gran importancia para el ser humano, hoy en día, los principales recursos dietético de ácido fólico son los suplementos alimenticios y los alimentos fortificados de alto consumo como la harina de maíz para facilitar su consumo adecuado (Naderi *et al.*, 2018). Sin embargo, el ácido fólico es degradado durante la elaboración de este tipo de alimentos ya que se añade de forma directa y su estructura química resulta dañada cuando se encuentra en medios acuosos con pH ácido (rango de pH de 3 a 5.8), cuando se expone directamente a luz ultravioleta durante algunos procesos de esterilización y/o temperaturas elevadas, lo cual provoca que pierda su efecto benéfico sobre la salud humana (Off *et al.*, 2005; Vora *et al.*, 2007; Neves *et al.*, 2019; Crnivec *et al.*, 2020; Pamunuwa *et al.*, 2021). Por lo tanto, diversos estudios han propuesto proteger de una manera más eficiente diversos compuestos bioactivos termolábiles e hidrosolubles como las vitaminas a través del empleo de nanofibras fabricadas por medio del método de electrohilado (Behrouz y Tucker, 2015; Pérez *et al.*, 2015; Mohammadi *et al.*, 2020) sin modificar las características organolépticas de los alimentos fortificados. Con respecto al ácido fólico, diversos reportes mencionan un incremento en su estabilidad frente a algunos de los factores que causan su degradación después de ser encapsulado en nanofibras con matrices poliméricas naturales como almidón (Borah *et al.*, 2019; Fonseca *et al.*, 2020), alginato-pectina (Pamunuwa *et al.*, 2020), zeína (do Evangelho *et al.*, 2019), caseína (Malekhosseini *et al.*, 2019), aislado de proteína de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) con pululano (Aceituno *et al.*, 2015) y entre los polímeros sintéticos usados para dicho fin se menciona el uso del alcohol polivinílico-alginato, alcohol polivinílico-gelatina (Parin *et al.*, 2021), alginato-pectina-óxido de polietileno (Alborzi *et al.*, 2014), entre otros. No obstante, son escasos los reportes actuales acerca de la liberación del ácido fólico

encapsulado en nanofibras bajo condiciones de pH similar al encontrado en el tracto gastrointestinal. Asimismo, hay pocos estudios que mencionen una protección del ácido fólico conferido por nanofibras poliméricas frente a los tres principales factores que causan su degradación, ya que solo se menciona alguno de ellos. Por lo tanto, en el presente trabajo se estudió si es posible reducir la degradación del ácido fólico en nanofibras electrohiladas al emplear como matriz una mezcla de carboximetilcelulosa (polisacárido) con óxido de polietileno (polímero sintético) además de permitir una liberación adecuada en condiciones de pH similares al gastrointestinal en ausencia de enzimas. Se optó por la carboximetilcelulosa (CMC) debido a que es un polielectrolito aniónico derivado de la celulosa, ampliamente usado en la industria farmacéutica y alimentaria, principalmente se debe a sus propiedades no tóxicas, fácil de manejar, de costo accesible, estable en condiciones ácidas, disponible en varios grados de viscosidad y capaz de atrapar altos niveles de fármaco (El-Newehy *et al.*, 2016; Pettignano *et al.*, 2019). Asimismo, el óxido de polietileno (PEO) además de ser un polímero sintético, también se considera biocompatible y no iónico, lo cual ayuda a reducir las fuerzas repulsivas entre las cadenas poli-aniónicas de la carboximetilcelulosa y promueve la generación de fibras más uniformes con menor presencia de defectos (Basu *et al.*, 2017; Gasparic *et al.* 2020; Maver *et al.*, 2020).

## 1.2 Objetivo general

Preservar la integridad de la estructura molecular del ácido fólico a través de su interacción con carboximetilcelulosa-óxido de polietileno en nanofibras obtenidas por electrohilado para evitar su degradación por radiación ultravioleta, medios ácidos y elevadas temperaturas.

### 1.2.1 Objetivos particulares

- Obtener nanofibras de carboximetilcelulosa con óxido de polietileno a través del proceso de electrohilado convencional bajo condiciones controladas.
- Generar nanofibras de carboximetilcelulosa, óxido de polietileno y ácido fólico a través del proceso de electrohilado empleando una solución bicomponente.

- Determinar el arreglo morfológico y estructural de las diversas nanofibras obtenidas, a través de microscopía electrónica de barrido (MEB) y mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).
- Evaluar el efecto de protección conferido por las nanofibras obtenidas sobre la estabilidad estructural del ácido fólico frente a factores como la radiación ultravioleta, estrés térmico y medios ácidos, mediante espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis), termogravimetría (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC).
- Conocer la eficiencia de la interacción del ácido fólico en las nanofibras de carboximetilcelulosa/ óxido de polietileno, por medio de un perfil de liberación mediante espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis).

### **1.3 Justificación de la investigación**

En México, se han implementado algunas medidas preventivas que pueden seguir las mujeres para prevenir la aparición de malformaciones congénitas debido a que representan una de las causas más frecuentes de muerte en niños y niñas que aún no han cumplido un año. Una de esas medidas se relaciona principalmente con mejorar su dieta para asegurar que consuman una cantidad adecuada de vitaminas y minerales, especialmente de ácido fólico o vitamina B9 desde la etapa reproductiva, durante el transcurso del embarazo y la lactancia, ya que casi todos los embarazos no son planeados. Asimismo, en nuestro país con el objetivo de evitar la aparición de defectos del tubo neural durante la gestación, se puso en marcha la fortificación voluntaria con ácido fólico de las harinas de trigo y maíz (2 miligramos de ácido fólico por cada kilogramo de harina) en 2008 (Norma Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008) (Rosado *et al.*, 1999). Sin embargo, de acuerdo con lo reportado a través de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (2022), no se ha podido cumplir de manera satisfactoria con el objetivo de aumentar el consumo de ácido fólico en mujeres en edad reproductiva debido a que las mujeres de entre 19 y 39 años mencionaron un bajo consumo bajo de alimentos fortificados con ácido fólico, lo cual también se debe a que durante la elaboración de este tipo de alimentos industrializados, el ácido fólico podría ser degradado por efecto de las altas temperaturas, radiación ultravioleta, pH ácido de algunos productos líquidos, entre otros. Por consiguiente, ha surgido la necesidad de usar nanoestructuras como barreras físicas que

permitan proteger la estabilidad del ácido fólico frente a los factores que provocan su degradación para que pueda ejercer un efecto benéfico sobre la salud humana.

#### **1.4 Planteamiento del problema**

El estilo de vida actual ha propiciado que sea cada vez más frecuente el consumo de alimentos procesados, en la búsqueda de comestibles fáciles de preparar, de costo accesible y nutritivos. Siendo los alimentos fortificados con vitaminas y minerales una opción adecuada para complementar la dieta básica de la población y evitar una deficiencia nutricional. Sin embargo, algunas vitaminas son sensibles a las altas temperaturas, a procesos de esterilización, al pH ácido de productos líquidos, entre otros. Por lo tanto, la industria alimenticia ha recurrido al uso de la nanotecnología para modernizar la protección de las vitaminas durante la elaboración de este tipo de alimentos sin modificar las características organolépticas de los productos finales. En este contexto se han realizado diferentes investigaciones respecto a nanofibras polisacáridas con posibles aplicaciones alimentarias, como matrices de transporte y liberación que ofrecen protección a las vitaminas encapsuladas contra su posible degradación. Sin embargo, el éxito de este tipo de nanofibras para dicho fin dependerá de las características fisicoquímicas de los polímeros, de la interacción química entre las vitaminas y la matriz empleada, del método de generación de las nanofibras y al producto sólido o líquido al cual se desea incorporar.

#### **1.5 Hipótesis**

El ácido fólico después de su incorporación al complejo carboximetilcelulosa-óxido de polietileno en nanofibras evitará su degradación por radiación ultravioleta, medios ácidos y elevadas temperaturas a través de su adecuada interpenetración en la matriz polimérica.

## CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Antecedentes

En los últimos años, se han empleado tanto polímeros naturales como sintéticos en la generación de nanofibras electrohiladas para encapsular diferentes vitaminas hidrosolubles como el ácido fólico para evitar su degradación por factores ambientales y de procesamiento industrial. Se encapsularon distintas concentraciones de ácido fólico en nanofibras de almidón de papa mediante la técnica de electrohilado y se reportó que la morfología de las nanofibras se vio afectada por la presencia del ácido fólico. A mayor contenido de ácido fólico fue menor la presencia de defectos en las nanofibras con un diámetro promedio en un rango de entre 75 a 81 nm. La eficiencia de encapsulado fue de entre 73 y 95% conforme se incrementó la cantidad de ácido fólico. También se reportó que las nanofibras protegieron al ácido fólico contenido frente a radiación ultravioleta durante 1 h y se mantuvo estable al alcanzar una temperatura de 310°C. Por último, el mayor porcentaje de liberación de ácido fólico ocurrió en condiciones de pH alcalino similar al encontrado en el tracto intestinal (Fonseca *et al.*, 2020).

Por otro lado, se reportó el uso de nanofibras de quitosano con un polímero sintético (polivinil alcohol) para encapsular ácido fólico y cuyo diámetro promedio fue de 75 nm con una porosidad del 55%. Asimismo, los resultados termogravimétricos indicaron que la presencia del ácido fólico disminuyó la degradación de la matriz polimérica ya que actuó como un agente antioxidante a altas temperaturas. Finalmente, el ácido fólico tuvo una liberación mayor en condiciones de pH 8.04 (95.2%) en comparación con condiciones de pH 5.44 después de 8h en dichas condiciones (Parin *et al.*, 2021).

De igual importancia se utilizaron microfibras electrohiladas de Eudragit S 100 (polímero sintético) para encapsular ácido fólico, las cuales presentaron una superficie lisa con baja presencia de defectos. Al incrementarse el voltaje empleado y la concentración de ácido fólico en solución (1.25%) las microfibras fueron más homogéneas sin porosidad. La eficiencia de encapsulado fue del 90% y la resistencia a condiciones ácidas fue mayor al 70%, es decir que se degradó un 30% del contenido total ácido fólico (Akhgari *et al.*, 2022)

## **2.2 Nanotecnología en la industria alimenticia**

Actualmente, se ha hecho evidente el empleo nanotecnológico en áreas relacionadas con la salud humana como la medicina, ingeniería de tejidos, entre otras. Sin embargo, se ha popularizado su uso dentro de la industria alimentaria para prolongar el tiempo de vida útil de algunas frutas, para mejorar la calidad y seguridad alimentaria mediante biosensores. Además de innovar en el desarrollo de productos nuevos denominados nanoalimentos, los cuales contiene nanopartículas o nanofibras que evitan la pérdida de compuestos volátiles (que aportan sabor u olor), evitan el contacto entre ingredientes incompatibles al interior del mismo alimento y de esta manera disminuir la pérdida de nutrientes (Dasgupta *et al.*, 2015).

## **2.3 Nanoencapsulación**

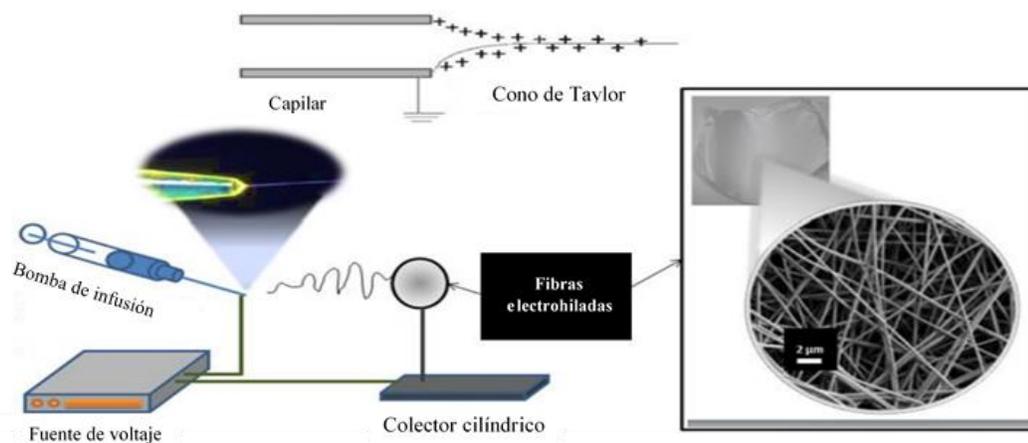
La nanoencapsulación es un método efectivo para proteger diversos compuestos bioactivos de la degradación ambiental mediante sistemas de liberación controlada que van desde varios micrómetros a nanómetros (Dan, 2016). Se ha considerado a la nanoencapsulación como opción viable para disminuir la inestabilidad química de diferentes compuestos solubles en agua que pueden degradarse fácilmente al ser incorporados a productos líquidos, además de ser sensibles a oxidantes, frente a radiación ultravioleta y elevadas temperaturas como las vitaminas del complejo B (Soto y López, 2011).

### **2.3.1 Métodos de nanoencapsulación**

Entre las técnicas más empleadas para realizar la nanoencapsulación de componentes bioactivos dependen principalmente de las características fisicoquímicas tanto del material de recubrimiento como del compuesto a encapsular, debido a que debe existir una compatibilidad entre ambos materiales. Por consiguiente, los procesos de encapsulación se dividen en dos grupos principalmente: químicos y mecánicos. Con respecto a los procesos químicos se incluye la coacervación, emulsión inversa, gelificación iónica, atrapamiento en liposomas, etc; mientras que dentro de los procesos mecánicos se encuentra el secado por aspersion (Santosh *et al.*, 2020), liofilización (Nesterenko *et al.*, 2013), destacando la técnica de electrohilado por ser un proceso sencillo, versátil y escalable a nivel industrial (Rostamabadi *et al.*, 2020), entre otros.

## 2.4 Proceso de electrohilado

El electrohilado es considerado como uno de los procesos más simples en la fabricación de fibras poliméricas naturales y/o sintéticas ya que permite obtener diámetros que se encuentran dentro del orden micrométrico o nanométrico. Este método ofrece la ventaja de llevarse a cabo en condiciones ambientales, escalable a nivel industrial, es económico y permite la encapsulación de compuestos bioactivos termolábiles. El principio básico de dicha técnica consiste en aplicar un campo eléctrico sobre un polímero en solución depositado en un capilar, con ayuda de una fuente de voltaje. Una vez que se carga eléctricamente la solución que sale del capilar, esta es atraída hacia el colector por diferencia de potencial eléctrico formando el cono de Taylor, con lo cual es eyectado la solución polimérica y en su trayecto el solvente se evapora para dejar depositadas las fibras en el colector, tal y como se ilustra en la Figura 1 (Okutan *et al.*, 2014; Duque *et al.*, 2014).



**Figura 1. Ilustración del proceso de electrohilado tradicional.**

### 2.4.1 Equipo de electrohilado

Básicamente el equipo de electrohilado incluye cuatro partes como se ilustra en la Figura 2 y en referencia a lo reportado por Rogina *et al.*, (2014):

- 1) Una jeringa donde se carga el polímero en solución sin burbujas y que se conecta a un capilar o aguja con diámetro interno variable de entre los 0.8 mm a 0.3 mm.
- 5) Una bomba de infusión donde se coloca la jeringa para suministrar un flujo constante.

- 6) Una fuente de alto voltaje.
- 7) Un colector en forma de placa metálica conectada a tierra para recibir el material el producto final electrohilado.

El equipo de electrohilado se puede colocar de forma horizontal o vertical de acuerdo al espacio destinado al equipo e incluso a las condiciones ambientales. Uno de los problemas más frecuentes al momento de trabajar en forma vertical es la salida de gotas de la solución polimérica desde el capilar hacia la placa colectora, las cuales pueden caer sobre las fibras depositadas haciendo que se mojen y se deforme la superficie del material colectado y se tenga que interrumpir el proceso (Li *et al.*, 2004). Las fibras fabricadas son estructuras ultrafinas con diámetro micro o nanométrico cuyo ancho no supera los 50 nm debido a que poseen una gran área superficial por unidad de masa y porosidad controlable. Estas características morfológicas hacen que las películas compuestas por fibras electrohiladas sean consideradas como candidatos para diferentes aplicaciones como sistemas de encapsulación, de transporte y en la formación de películas comestibles (Zhang *et al.*, 2005).

## **2.5 Parámetros del proceso**

### **2.5.1 Voltaje aplicado**

Un parámetro crucial para llevar a cabo proceso de electrohilado, es el voltaje eléctrico aplicado sobre el polímero en solución. Se debe inducir la carga eléctrica necesaria sobre el polímero en solución depositado en el capilar para iniciar el proceso como tal debido a que es importante cargar eléctricamente la superficie de la solución para que sea traída hacia el colector con carga contraria. Experimentalmente se ha comprobado que la forma inicial de la gota cambia con el voltaje aplicado y se sugiere que al utilizar voltajes altos hay más eyección del polímero y esto facilita la formación de una fibra con mayor o menor diámetro, dependiendo de las propiedades físico-químicas del polímero empleado (Son *et al.*, 2004).

### **2.5.2 Velocidad de flujo**

La velocidad de flujo de la solución polimérica permite la formación de fibras. También puede influir en la morfología y el tamaño de las mismas, además se ha reportado que a velocidades muy bajas, el flujo del polímero en solución a través del capilar es

insuficiente para reemplazar la solución expulsada por lo cual no se puede mantener el cono de Taylor y por lo tanto, el disolvente no alcanza a evaporarse de forma adecuada evitando la formación de fibras ultrafinas. Si se incrementa la velocidad de salida, puede ocurrir un incremento en el tamaño de las fibras formadas y la aparición de defectos en su morfología como perlas (Yuan *et al.*, 2004).

### **2.5.3 Tipos de colectores**

El colector empleado en el equipo de electrohilado es de suma importancia debido a que actúa como un soporte conductor donde se depositan las fibras conforme se van generando. Comúnmente se emplean placas cuadradas de aluminio como colectores o cilindros de cobre. Sin embargo, en ocasiones resulta difícil retirar o despegar las fibras depositadas en el colector por lo cual se debe emplear un material intermediario conductor que facilite el retiro de las fibras. Por lo tanto, dependiendo de su aplicación se pueden emplear diferentes tipos de colectores como papel o tela conductora, mallas de alambre, barras cuadradas o alineadas, cilindros giratorios, entre otros (Burger *et al.*, 2006).

### **2.5.4 Distancia del capilar al colector**

Tanto la morfología como el diámetro de las fibras fabricadas pueden verse afectadas por la separación existente entre la punta del capilar y el colector. Varios reportes mencionan que es necesario establecer una distancia mínima donde las fibras tengan el tiempo suficiente para que se evapore el solvente y lleguen secas al colector, de lo contrario podrían llegar húmedas y fusionarse con las otras fibras ya depositadas en el colector. De igual manera, si la distancia empleada es demasiado grande, se corre el riesgo de dar lugar a la formación de perlas o defectos a lo largo de las fibras. Por lo tanto, se debe establecer una distancia óptima entre la punta del capilar y el colector para permitir que el solvente se alcance a evaporar y se obtengan fibras continuas sin defectos (Jalili *et al.*, 2005).

## **2.6 Parámetros de la solución polimérica**

### **2.6.1 Concentración**

Para favorecer la fabricación de fibras durante el proceso de electrohilado, es necesario establecer la concentración más baja que se puede usar del polímero en solución

para lograr el electrohilado. Por otro lado, hay estudios que reportaron que a menor concentración de la solución se da lugar a la formación de partículas en vez de fibras y por el contrario, a mayor concentración se pueden obtener fibras con mayor diámetro. Por lo tanto, se debe establecer la concentración ideal de la solución polimérica para realizar el electrohilado correctamente ya que a bajas concentraciones la solución es atraída en forma de gotas en lugar de ser eyectada como un hilo y a altas concentraciones, las fibras generadas pueden tener un mayor diámetro o presentar una forma no continua como si fuera cortada en partes. Asimismo, tanto la tensión superficial como la viscosidad de la solución polimérica son importantes para la fabricación de fibras continuas y homogéneas (Bhardwaj y Kundu, 2010).

### **2.6.2 Peso molecular**

Otro de los parámetros importantes para facilitar el electrohilado de polímeros en solución es el peso molecular debido a que también tiene un efecto significativo sobre algunas de las propiedades físicas como la viscosidad, tensión superficial, conductividad e incluso la resistencia dieléctrica. Dicho parámetro afecta la morfología de las fibras fabricadas y en algunos estudios, se menciona que generalmente, las soluciones poliméricas con un peso molecular elevado son las ideales para realizar el proceso, ya que cuentan con la viscosidad adecuada para la formación de fibras, las cuales pueden presentar un diámetro mayor. También, se ha reportado que una solución con un peso molecular demasiado bajo tiende a formar perlas o defectos a lo largo de las fibras e incluso con un diámetro menor al esperado (Bhardwaj y Kundu, 2010).

### **2.6.3 Viscosidad**

La viscosidad del polímero en solución es el parámetro de mayor importancia para la obtención de tanto la morfología como del diámetro adecuado dependiendo de la aplicación de las fibras. Hay reportes donde se menciona que si la viscosidad es demasiado baja no se permite la formación de fibras continuas y en contraste, cuando se tiene una viscosidad muy elevada se presenta la dificultad de eyección de la solución del capilar al colector propiciando la ausencia de fibras generadas. Por lo tanto, resulta fundamental trabajar con una viscosidad óptima para fabricar fibras con una morfología adecuada además del diámetro deseado, lo

cual va a depender de las propiedades del polímero en solución principalmente si se hace uso de coadyuvantes que permitan facilitar el electrohilado de la solución (Haghi y Akbari, 2007).

#### **2.6.4 Tensión superficial relativa**

El tipo de solvente utilizado para la preparación de cualquier solución polimérica es fundamental para el proceso de electrohilado debido a que debe evaporarse por completo. En términos generales, se menciona que la presencia de defectos en las fibras se puede deber a la presencia de una baja tensión superficial. Mientras que la presencia de una tensión superficial elevada no permite el electrohilado por la inestabilidad en la eyección y dificultar la fabricación de fibras (Hohman *et al.*, 2001). Por otro lado, dependiendo de la tensión superficial del polímero en solución se debe considerar el campo eléctrico utilizado para que pueda ser estirada hacia el colector. Sin embargo, una tensión superficial baja no necesariamente será la ideal para el proceso de electrohilado también depende de los otros parámetros de la solución (Pham *et al.*, 2006).

#### **2.6.5 Conductividad eléctrica**

Dependiendo del tipo de polímero, el disolvente utilizado y de las sales ionizables presentes, se establece la conductividad de la solución polimérica. En diversos reportes se menciona que al incrementarse la conductividad eléctrica se favorece la disminución del diámetro promedio de las fibras fabricadas. Por el contrario, la presencia de una conductividad eléctrica baja da como resultado un alargamiento deficiente de la solución eyectada y por lo tanto se generan fibras no homogéneas con defectos (Demir *et al.*, 2002).

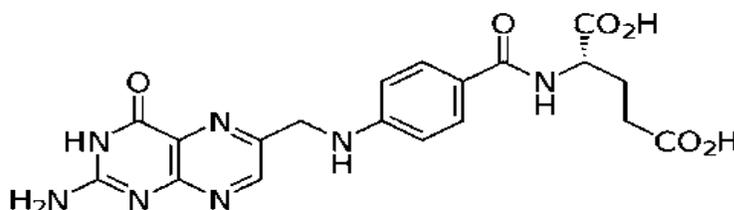
### **2.7 Parámetros ambientales**

Otros parámetros que afectan la fabricación de fibras son la temperatura ambiental y la humedad. Dependiendo del porcentaje de humedad, pueden aparecer poros de tamaño variable sobre la superficie de las fibras. En general, a una baja humedad el disolvente podría evaporarse más rápido dependiendo de su volatilidad, lo cual podría ocurrir en el transcurso de algunos minutos antes de que la punta del capilar se obstruya con el mismo polímero en solución. Por su parte, la temperatura puede aumentar la velocidad de evaporación

provocando una disminución de la viscosidad y dificultando la formación de fibras (Casper *et al.* 2004).

## 2.8 Ácido fólico como componente bioactivo

La estructura química del ácido fólico (AF) como se ilustra en la Figura 2, está constituida por la unión de un doble anillo pterínico con una molécula de ácido *p*-aminobenzoico mediante un puente metilénico, lo cual se une a una molécula de ácido glutámico mediante un enlace peptídico (Suárez, 2003).



**Figura 2. Estructura química del ácido fólico.**

Los seres humanos no sintetizan folatos y los adquieren a través de la dieta ya sea mediante vegetales de hoja verde o a través de alimentos fortificados. Sin embargo, durante su cocción se puede destruir entre el 50 al 80% del contenido total, por lo tanto, se emplea su forma sintética y monoglutámica denominada ácido fólico, ya que es más estable y biodisponible en comparación con los folatos (McKillop *et al.*, 2002).

La deficiencia nutricional de ácido fólico es una de las causas de defectos del tubo neural durante la gestación, padecimientos coronarios e incluso, anemia megaloblástica. Con respecto a las embarazadas la administración de ácido fólico evita la presencia de defectos congénitos como espina bífida o anencefalia, especialmente si hay antecedentes de fetos con dichas deficiencias (Brito *et al.*, 2012). De acuerdo a la OMS la dosis recomendada es de 0,4 mg (400  $\mu$ g) de ácido fólico 1 mes antes del embarazo (OMS, 2014).

### 2.8.1 Estabilidad del ácido fólico

El enriquecimiento de alimentos con ácido fólico (AF), fundamentalmente productos lácteos y cereales, resulta ser un proceso complicado debido a que dicha vitamina es sensible cambios de temperatura, exposición a luz ultravioleta y cambios de pH, entre otros factores.

Los productos de degradación resultantes no poseen ninguna actividad biológica; por lo tanto, es necesario proteger al ácido fólico añadido durante la producción de nutraceúticos, suplementos alimenticios e incluso productos farmacéuticos de factores de procesamiento y ambientales. Uno de esos factores, es la radiación con luz ultravioleta usada en algunos procesos de esterilización donde puede ocurrir la fotólisis del ácido fólico. Ocurre debido a la luz ultravioleta absorbida por el grupo de pteridina y con una absorción de 350 nm, lo cual provoca la ruptura del enlace amida (C9 y N10), dando lugar a la formación del 2-amino-4-hidroxi-6-formil-pterina (6-FPT) y p-aminobenzoil-L-ácido glutámico (PABG) (Lopera *et al.*, 2009); en la reacción de fotólisis se da lugar a reacciones secundarias donde el 6-FPT es oxidado al correspondiente 6-ácido carboxílico (6-CBPT) y éste posteriormente sufre descarboxilación formando 2-amino-4-hidroxi-pteridina (Hua *et al.*, 2007; Mahmood *et al.*, 2014).

Otro factor de degradación es la temperatura que se emplea durante la elaboración de alimentos industrializados con ácido fólico. Se ha estudiado la estabilidad estructural del ácido fólico cristalino mediante termogravimetría, en un rango de 20°C a 600 °C y se reportó que cerca de los 139.38 °C se pierde la porción correspondiente al ácido glutámico y al alcanzar los 200°C la degradación fue mayor ya que el ácido fólico cristalino se volvió amorfo; enseguida ocurrió la degradación del anillo de pterina y el ácido p-aminobenzoico que se traslapan en un rango de 265.98 °C a 404.26 °C (Vora *et al.* 2002).

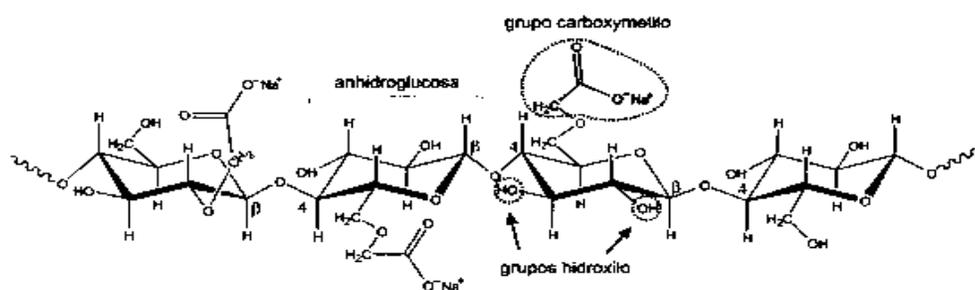
Por último, se menciona en diversos estudios que el ácido fólico es más estable en condiciones alcalinas (pH rango 8.05–10.40) con solo 6.9% de degradación después de 48 h en comparación en condiciones ácidas (la degradación fue del 5 al 15% a pH 3.51 y 4.68 (Liang *et al.*, 2013).

## **2.9 Carboximetilcelulosa sódica**

### **2.9.1 Generalidades**

La carboximetilcelulosa sódica (CMC-Na) se obtiene al modificar química la celulosa haciéndola más soluble en agua. Durante la síntesis, se introducen grupos químicos de “carboximetil de sodio” ( $\text{CH}_2\text{COONa}$ ) en las unidades repetitivas de la celulosa, como se ilustra en la Figura 3, los cuales son los responsables de aumentar el grado de solubilidad en agua, una propiedad que la celulosa no posee.

Otra de las propiedades importantes de la carboximetilcelulosa es el denominado grado de sustitución (DS). La magnitud del DS se refiere al número promedio de grupos hidroxilo sustituidos por grupos de  $\text{CH}_2\text{COONa}$  por unidad de anhidroglucosa. Cada unidad de anhidroglucosa en la celulosa posee tres grupos hidroxilo que están disponibles para un DS máximo de tres. Por ejemplo, en una CMC-Na con un DS de 1.5, significa que en promedio 50% de los grupos hidroxilos son eterificados con el  $\text{CH}_2\text{COONa}$  y 50% promedio restante de cada unidad anhidroglucosa queda libre (Reyes *et al.*, 2011).



**Figura 3. Estructura química de un segmento representativo de las cadenas poliméricas de la carboximetilcelulosa.**

### 2.9.2 Aplicaciones en la industria alimentaria

La carboximetilcelulosa (CMC) clasificado como un polisacárido aniónico sintetizado por una hidrólisis ácida y posteriormente por una alcalinización de la celulosa, es considerado como un material semisintético empleado para espesar productos líquidos, estabilizar emulsiones, retener agua, mejorar la textura de productos sólidos e incluso evitar la formación de cristales de hielo en helados. También se caracteriza por disolverse tanto en agua caliente como fría; otra ventaja que ofrece es que no aporta calorías lo cual lo clasifica como un ingrediente idóneo para desarrollar alimentos dietéticos (Bayarri, González y Costell, 2009).

Con respecto a la cantidad que se puede emplear de carboximetilcelulosa de acuerdo a las buenas prácticas de fabricación dependerá del alimento y se establecerá la dosis máxima adecuada para que cumpla su función dentro del alimento y en caso de consumir en exceso podría tener un efecto laxante lo cual se restablece con una hidratación adecuada (FAO/OMS, 2015).

## 2.10 Óxido de polietileno

### 2.10.1 Generalidades

Químicamente la estructura del óxido de polietileno (PEO) se escribe como H-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-OH tal y como se ilustra en la Figura 4. Dicho polímero es sintético y se clasifica como biocompatible, biodegradable, hidrosoluble, con capacidad de formar puentes de hidrógeno con otros polímeros, así como también es empleado como un espesante y como un vehículo de fármacos (Colin y Zapata, 2013). También, como reactivo químico se encuentra con diferentes pesos moleculares y dentro de sus aplicaciones en el área farmacéutica se utiliza para la formación de micro o nanopartículas, hidrogeles y liposomas como sistemas de liberación de principios activos (Dhawan *et al.*, 2005).

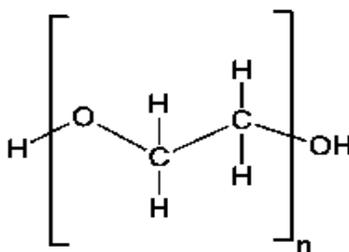


Figura 4. Estructura química del óxido de polietileno (PEO).

### 2.11 Métodos de caracterización de nanofibras poliméricas

Enseguida, se describen las técnicas de caracterización más comúnmente empleadas para el análisis de nanofibras obtenidas por electrohilado.

### 2.12 Espectroscopía infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

La técnica más empleada para identificar compuestos químicos de una muestra es la espectroscopía de adsorción infrarroja (IR) y recibe su nombre debido a la región dentro del espectro electromagnético donde se realiza. En general, la región infrarroja del espectro electromagnético se considera en un rango de longitud de onda de 2,800 a 10 cm<sup>-1</sup>. Desde el punto de vista de los instrumentos se puede dividir en tres zonas: IR cercano (NIR) que comprende de 12,800 a 4,000 cm<sup>-1</sup>, el IR medio que comprende de 4,000 a 400 cm<sup>-1</sup> (es

donde se realizan las mediciones analíticas tradicionales ) y por último, el IR lejano que abarca de los 400 a los 10  $\text{cm}^{-1}$ . Una vez que ocurre la absorción dentro del espectro infrarrojo medio por parte de la muestra, las moléculas comienzan a vibrar y ocurre un cambio en el momento dipolar del enlace químico, en otras palabras la intensidad de su absorción será mayor conforme sea más polar la molécula. Cada enlace químico vibra de forma diferente donde ocurren estiramientos o deformaciones y por lo tanto, dará señales características dentro del espectro infrarrojo con lo cual se podrá identificar el tipo de enlace químico del que se trata (Skoog y Leary, 1995).

Se denomina espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier porque emplea un interferómetro en el cual la luz infrarroja se produce desde una fuente incandescente y se dirige a un separador de luz luminoso, una parte de la luz generada atraviesa el separador y la otra parte es reflejada. Dicha luz reflejada incide sobre un espejo estacionario, mientras que la transmitida incide sobre un espejo que se mueve a velocidad constante. Después de eso, la información es recaba por la computadora y se emplea un algoritmo computacional estándar llamado transformada de Fourier, lo cual permite convertir el dominio de tiempo en el espectro de dominio de frecuencia para visualizar la intensidad de la absorción como una función de la frecuencia o de longitud de onda y arroja como resultado un espectro infrarrojo con las señales características del material analizado (Rouessac y Rouessac, 2003).

### **2.13 Microscopía electrónica de barrido (MEB) con detector de energía dispersiva**

Para analizar la morfología y superficie de cualquier material polimérico se recurre a la generación de una imagen tridimensional a nivel microscópico. Para lo cual, se requiere de un microscopio electrónico de barrido para detectar, procesar y poder visualizar las señales que se obtienen al hacer incidir un haz de electrones de alta energía sobre la muestra a analizar y obtener una imagen de la superficie. El microscopio electrónico de barrido está conformado por un cañón electrónico en una columna de alto vacío, del orden de 10<sup>-5</sup> mm de Hg, donde se genera un haz de electrones de alta energía (5 - 30 kV). También tiene detectores que registran las señales originadas por la interacción entre el haz de electrones y la muestra, las cuales son procesadas conforme el haz de electrones se desplaza sobre cada parte de su superficie, es decir, se hace un barrido línea por línea abarcando pequeñas zonas en forma rectangular y finalmente se visualiza una micrografía completa (Sperling, 2006).

Otra característica importante del microscopio electrónico de barrido es que puede contar con diferentes tipos de detectores, entre los cuales se menciona al detector de energía dispersiva (EDS), el cual consiste en emitir rayos X sobre una zona puntual de la muestra y detectar la energía de cada fotón incidente sobre la muestra. Después dichos pulsos electrónicos son procesados por un analizador multicanal y finalmente se obtiene un espectro que permite identificar rápidamente los elementos químicos presentes en una muestra si su concentración es superior al 1 % (Goldstein *et al.*, 2007).

#### **2.14 Espectroscopía ultraviolet-visible (UV-Vis)**

La espectroscopía UV-Vis cuantifica la cantidad de radiación que absorbe o transmite un analito dentro del espectro electromagnético entre las longitudes de onda del ultravioleta (380-200 nm) y luz visible (780-380 nm). Cuando ocurre la absorción de este tipo de radiación se produce la transición de los electrones que se encuentran en la parte más externa de los átomos en las moléculas, que va de los niveles más fundamentales hacia niveles más altos de energía. La ley de Lambert-Beer menciona la relación entre la intensidad de la luz que es absorbida o transmitida y la concentración presente en la muestra. La cuantificación de la absorbancia se realiza utilizando un espectrofotómetro, el cual tiene un monocromador (prisma o red de difracción) que regula la longitud de onda de la radiación que se hace incidir sobre la muestra, también cuenta con un sistema óptico que recibe la luz transmitida por la muestra y posee un detector que recibe la señal de la intensidad de la luz transmitida a cada longitud de onda y la transforma en señal eléctrica que un ordenador procesa y compara con la de “referencia” (Misra y Dubinskii, 2002).

#### **2.15 Termogravimetría (TGA)**

El análisis termogravimétrico se emplea para analizar la descomposición térmica de materiales sólidos, midiendo la pérdida de peso en función de la temperatura. También se pueden analizar diferentes procesos de desorción, adsorción y reacciones de descomposición bajo en un ambiente de gas inerte como el nitrógeno o usando oxígeno (agente oxidante). Dicho análisis consiste en monitorear de forma continua los cambios de masa del material de interés de acuerdo a la variación de la temperatura a una tasa térmica constante (cambio de temperatura lineal). Los datos que se obtienen a través de este tipo de análisis muestran los

cambios de masa con respecto a la temperatura y se genera un Termograma que es la representación gráfica de los cambios porcentuales de la masa de la muestra (Rodríguez y Villegas, 2012).

### **2.16 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

De manera complementaria al análisis del comportamiento térmico de algunos materiales se realiza la calorimetría diferencial de barrido debido a que cuantifica los cambios energéticos de una muestra, es decir, que determina la cantidad de calor que absorbe o libera el material analizado a temperatura constante, durante un determinado tiempo o al someterlo a calor o enfriamiento a velocidad constante en un intervalo establecido de temperatura. Dicho análisis se basa en someter a calentamiento una muestra y también se requiere de un compuesto de referencia para que ambos se mantengan a la misma temperatura, empleando sensores y realizando ajustes a las potencias de calentamiento. Posteriormente, se realiza un barrido de la muestra con una velocidad de calentamiento constante tanto a la muestra como al material de referencia y las transiciones térmicas se presentan gráficamente y recibe el nombre de diagrama o curva DSC (por sus siglas en inglés de la técnica) y normalmente se registran cuatro barridos, donde los tres primeros son de calentamiento y el último de enfriamiento. El primer barrido se realiza a 20 °C/min y se obtiene información sobre la temperatura de fusión de la muestra y también se obtiene información sobre su grado de cristalinidad. Cuando se presentan discontinuidades en la línea base al elevarse la temperatura, puede ser un indicio de descomposición térmica lo cual puede compararse con un análisis termogravimétrico de la misma muestra. Enseguida, el segundo barrido de calentamiento se utiliza para verificar la fusión de la muestra cristalizada a partir del fundido y posteriormente la muestra es enfriada rápidamente con el objetivo de obtener el polímero en estado amorfo. Finalmente, se efectúa un tercer calentamiento para determinar la temperatura de transición vítrea del material e identificar si se produce una cristalización en frío (pico exotérmico) o fusión (pico endotérmico) (Suriñach *et al.*, 1992).

## CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

### 3.1 Reactivos y solventes

Ácido fólico (ácido pteroil-glutámico,  $C_{19}H_{19}N_7O_6$ ). Polvo de color amarillo con peso molecular de 441.4 g/mol y pureza de >97 %. Producto de grado farmacéutico de la marca Sigma-Aldrich.

Agua destilada. Líquido incoloro, insípido con una pureza del 100%. Sustancia no tóxica sin efectos adversos a la salud.

Carboximetilcelulosa (sal sódica de un éter policarboximetílico de la celulosa). Polvo granuloso blanco e higroscópico tras su desecación. Cuyo peso molecular es de 250,000 g/mol y un DS de 0.7. Se dispersa en agua dando disoluciones coloidales y es insoluble en acetona, etanol y tolueno. Producto de grado alimenticio de la marca QUIAL.

Etanol (alcohol etílico,  $C_2H_6O$ ). Líquido volátil a temperatura ambiente, incoloro y con olor característico. Producto de la marca J.T. Baker.

Óxido de polietileno (PEO,  $(-CH_2CH_2O-)_n$ ). Polvo de color blanco cuyo peso molecular es de 400,000 g/mol, viscosidad de 2.250-4.500 cP (25 °C). Producto de grado farmacéutico de la marca Sigma-Aldrich.

### 3.2 Procedimientos experimentales

#### 3.2.1 Preparación de soluciones poliméricas sin y con ácido fólico

Se prepararon soluciones de carboximetilcelulosa 5% (p/v) y óxido de polietileno 5% (p/v) por separado utilizando como solvente agua desionizada-etanol (1:1 v/v) bajo agitación durante 24 h hasta su completa disolución. Después se preparó una solución de CMC-PEO porcentual (50:50) de forma similar al reporte de Maver *et al.* (2020) y Gasparic *et al.* (2017). A continuación, se preparó una solución de carboximetilcelulosa-ácido fólico (0.5 mg/g de CMC) bajo agitación durante 48 h en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió por goteo una solución de óxido de polietileno (PEO) bajo agitación por 24 h a temperatura ambiente y en oscuridad.

### 3.2.2 Obtención de nanofibras por electrohilado

La obtención de las nanofibras de CMC con ácido fólico se llevó a cabo en 2 etapas: a) nanofibras de CMC/PEO sin ácido fólico y b) nanofibras de CMC-AF/PEO con ácido fólico en solución.

El proceso de electrohilado se aplicó en cada una de las etapas mencionadas con antelación de forma similar al estudio de Basu *et al.*, (2017). Se empleó una jeringa de 5 ml equipada con una aguja con un diámetro de 0.8-0.6 mm, un potencial eléctrico de 30-40 Kv, velocidad de inyección de 0.1-0.01 ml/min y una distancia entre la punta de la aguja y el colector de 8-20 cm. Una vez formadas las nanofibras se secaron en estufa a 80 °C durante 12 h y se colocaron dentro de un desecador para evitar que absorban humedad del ambiente.

### 3.3 Técnicas de caracterización de las soluciones poliméricas

#### 3.3.1 Viscosidad

Para determinar la viscosidad de las soluciones preparadas descritas en el apartado 3.2.1, se empleó un viscosímetro digital Brookfield mostrado en la Figura 5, utilizando un volumen de 16 ml de cada solución.



**Figura 5. Viscosímetro digital de Brookfield.**

#### 3.3.2 Conductividad eléctrica

Se utilizó un potenciómetro portátil similar al que se ilustra en la Figura 6 para medir la conductividad eléctrica de cada una de las soluciones mencionadas en el apartado 3.2.1.



**Figura 6. Medidor portátil de conductividad eléctrica.**

### 3.3.3 Ángulo de contacto

Para dicho análisis se utilizó un goniómetro, como se aprecia en la Figura 7 junto con el software ImageJ para el procesamiento de datos. El ángulo de contacto fue cuantificado realizando la prueba de la gota, para esta prueba se colocó un soporte universal al lado del goniómetro sujetando una jeringa con agua de la cual se dejó caer una gota en cada una de las laminillas, la muestra se colocará sobre la superficie de vidrio del goniómetro y una vez que la gota caiga sobre ella se tomó una foto, la cual fue procesada en el software para determinar el ángulo que se logra formar entre la superficie del sustrato y la gota que se encuentra arriba. Se realizó por triplicado para cada muestra.

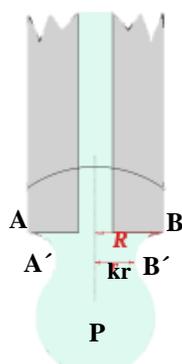


**Figura 7. Goniómetro manual.**

### 3.3.4 Tensión superficial de líquidos por pesada hidrostática (Ley de Tate)

Una forma manual de medir la tensión superficial relativa ( $\gamma$ ) de un líquido se puede realizar usando gotas de esa sustancia y del agua como referencia. Para lo cual se requiere un

tubo de vidrio donde se coloca el líquido a analizar y en cuanto una gota se desprenda del extremo del tubo debido a que su peso iguala las fuerzas de tensión superficial que la sostienen y que actúan a lo largo de la circunferencia (AB) de contacto con el tubo como se ilustra en la Figura 8. Debido a que la gota no se desprende justo al final del tubo, más bien por debajo de la línea denominada A'B' que es de menor diámetro y que no hay seguridad de que el líquido situado entre los niveles AB y A'B' sea arrastrado por la gota, la fórmula a emplear es la siguiente:  $P=2\pi r\gamma$ .



**Figura 8. Perfil de una gota colgante mostrando las variables de la Ley de Tate.**

Experimentalmente se ha determinado el peso de la gota (denominado P) y de un coeficiente de contracción denominado k. Ésta es la denominada Ley de Tate, el peso de la gota es proporcional al radio del tubo R y a la tensión superficial del líquido  $\gamma$ . La aplicación de esta ley permite realizar medidas relativas de la tensión superficial de líquidos de interés al conocer la tensión superficial del agua destilada ya que se utiliza como líquido de referencia para realizar dicha medición. La técnica es sencilla y consiste en utilizar un cuentagotas para colocar un número determinado de agua destilada por goteo ( $\gamma_1$ , tensión superficial es de 72.8 dinas/cm) y se mide su masa ( $m_1$ ). Después con ayuda de un gotero se toma un líquido al cual se le desea conocer su tensión superficial relativa ( $\gamma_2$ ) y se deja caer el mismo número de gotas para medir su masa ( $m_2$ ).

**Fórmula 1.**

<p><b>Ley de Tate.</b>     <math>\frac{m_1}{m_2} = \frac{\gamma_1}{\gamma_2}</math></p>
---

### 3.4 Técnicas de caracterización de las nanofibras

#### 3.4.1 Espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Para conocer interacción química de las nanofibras fabricadas se empleó la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier usando el equipo PERKIN ELMER Spectrum 400 FT-IR con una lámpara de tungsteno en un rango de longitud de onda de 4000-600  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 3.4.2 Análisis morfológico mediante microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para visualizar la morfología de las nanofibras obtenidas se utilizó un microscopio electrónico de barrido (MEB) de la marca JEOL modelo JSM 7600F de alta resolución, equipado con un haz atenuante especial para muestras no conductoras; el cual también está provisto con un microanalizador de energía dispersiva de rayos X para determinar la composición química de la muestra.

#### 3.4.3 Eficiencia de encapsulado del ácido fólico (EE)

La cantidad de ácido fólico contenido en las nanofibras poliméricas, se cuantificó midiendo la absorbancia del ácido fólico a 280 nm usando la curva de calibración previamente elaborada a partir de una solución patrón de ácido fólico, realizando diluciones consecutivas en el rango de 0.02 – 1.0 mg/ml empleando una solución de NaOH 0.1 M y después para extraer el ácido fólico encapsulado, se colocó la solución en un baño ultrasónico y después de transcurrir 5 minutos, se centrifugó a 2,500 rpm por 5 minutos y después de tomar el sobrenadante fue analizado mediante espectrofotometría UV-Vis y la eficiencia de encapsulación se calculó aplicando la **fórmula 2**.

$$\text{Fórmula 2} \quad \%EE = \frac{\text{mg AF encontrado}}{\text{mg de AF teórico}} \times 100$$

#### **3.4.4 Estudio de la estabilidad estructural del ácido fólico en nanofibras frente a radiación ultravioleta tipo A**

Para determinar la fotoestabilidad del ácido fólico después de ser expuesto a radiación ultravioleta (UV) tipo A, se siguió la metodología usada por do Evangelho *et al.*, (2019) con algunas modificaciones.

Se colocaron 5 mg de las nanofibras de CMC-PEO con ácido fólico en 5 ml de una solución de fosfatos (PBS) a pH de 7 y se colocó a 20 cm de una lámpara Osram Ultra-Vitralux (300 W con una  $\lambda=365$  nm) durante 60 minutos para acelerar la oxidación de la vitamina. Una vez transcurrido el tiempo de irradiación, el ácido fólico fue extraído mediante baño ultrasónico que duró 5 minutos y después, se centrifugó a 1,500 rpm por 5 minutos para tomar el sobrenadante, el cual fue lavado con una solución de NaOH 0.2 M y por último fue analizado espectrofotometría UV-Vis con una absorbancia de 350 nm. Se siguió el mismo procedimiento de análisis para una solución control con la misma cantidad de nanofibras que se mantuvo en condiciones de oscuridad para fines comparativos.

Las mediciones se realizaron por triplicado y el análisis estadístico se hizo por medio del programa Stata/SE 10.0 para Windows. Para determinar la diferencia estadística significativa entre tratamientos se hizo un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de intervalo múltiple de Tukey. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para  $p < 0.05$ .

#### **3.5 Estudio de la estabilidad del ácido fólico en nanofibras en pH ácido**

El estudio sobre la degradación del ácido fólico en medio acuoso bajo condiciones de pH ácido en el transcurso de 15 y 30 días, se realizó de manera similar a lo reportado por Alborzi *et al.* (2014), con algunas modificaciones.

Se colocaron 5 mg de las nanofibras poliméricas con ácido fólico en soluciones de HCl con diferente pH (3 y 5.8, respectivamente) a 25 °C y alejados de la luz solar, es decir en oscuridad. Para cada solución se tomaron alícuotas en diferentes tiempos (a los 15 y 30 días), las cuales fueron sometidas al método de extracción (baño ultrasónico, centrifugado, lavado con una solución de NaOH 0.2 M) y después fueron analizadas por espectrofotometría UV-Vis a una absorbancia de 350 nm. Se siguió el mismo procedimiento de análisis para una

solución control con la misma cantidad de nanofibras que se mantuvo en condiciones de pH neutro y en oscuridad para fines comparativos.

Las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados obtenidos se resumen en la tabla 16 y el análisis estadístico se hizo por medio del programa Stata/SE 10.0 para Windows. Para determinar la diferencia estadística significativa entre tratamientos se hizo un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de intervalo múltiple de Tukey. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para  $p < 0.05$ .

### **3.6 Estudio del comportamiento térmico del ácido fólico en nanofibras mediante termogravimetría (TGA/DTG) y calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

El análisis del comportamiento térmico del ácido fólico contenido en las nanofibras se realizará de manera simultánea usando el equipo NETZSCH modelo STA 779 F6. Las muestras se colocarán en el equipo en crisoles de aluminio para calentarlas de 55 °C hasta 600 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C min<sup>-1</sup> en una atmósfera inerte de nitrógeno gaseoso (10 ml/min).

### **3.7 Perfil de liberación del ácido fólico contenido en nanofibras a pH ácido y alcalino *in vitro* similar al pH gastrointestinal**

Para determinar el porcentaje de liberación del ácido fólico contenido en las nanofibras poliméricas se siguió la metodología reportada por Alborzi *et al.*, (2014) con algunos cambios.

El ensayo se realizó colocando 10 mg de las nanofibras en 40 ml de soluciones de HCl 0.1 M (pH de 1.2 y de 3) y buffer de fosfatos (pH de 7.8) similares al pH gástrico e intestinal, a 37±1 °C con agitación de 125±5 rpm. El proceso de liberación fue monitoreado tomando alícuotas en periodos de 30, 60, 90 y 120 min de agitación para las condiciones ácidas y para el pH ligeramente alcalino se tomaron alícuotas a los 60, 120, 180 y 240 min. Después de aplicar el método de extracción descrito en el apartado 3.4.3 fueron analizadas por espectrofotometría a 280 nm para calcular el porcentaje de AF liberado. Se obtuvieron los valores promedio en cada intervalo por triplicado y los cálculos se realizaron empleando la curva de calibración de ácido fólico con solución patrón previamente elaborada.

## CAPÍTULO IV.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Maver *et al.* (2020) emplearon una solución polimérica de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno para incorporar extractos medicinales (polifenoles) y generar nanofibras electrohiladas con propiedades antimicrobianas. Por lo mencionado anteriormente, se optó por realizar una reacción química de forma directa entre el polímero de carboximetilcelulosa (CMC) y ácido fólico (AF) para posteriormente añadir óxido de polietileno con el objetivo de asegurar la interpenetración de la vitamina en cuestión en la matriz polimérica y favorecer el proceso de electrohilado al incorporar óxido de polietileno. Con respecto a los parámetros de equipo se tomaron como referencia los estudios realizados por Basu *et al.*, (2017) y Maver *et al.*, (2020) con algunos cambios.

#### 4.1 Solución de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno sin ácido fólico (CMC/PEO)

En la Figura 9 se muestra una solución transparente y sin precipitados de carboximetilcelulosa con óxido de polietileno sin ácido fólico.



**Figura 9. Muestra representativa de la solución de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno sin ácido fólico.**

En la tabla 1 se resumen los parámetros reportados por Maver *et al.* (2020) de soluciones poliméricas de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno las cuales se tomaron en cuenta como referencia para realizar el proceso de electrohilado empleando las soluciones sin ácido fólico.

**Tabla 1. Parámetros de soluciones de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno reportados en la literatura**

Código	Solución polimérica (p/v)	Proporción porcentual (volumen)	Parámetros reportados		
			Viscosidad (cP)	Conductividad eléctrica ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	Tensión superficial (mN/m)
CMC	5%	-	125 $\pm$ 5	*NR	74.1 $\pm$ 0.2
PEO	5%	-	4554 $\pm$ 1	102	63.8 $\pm$ 0.5
CP-I	-	50:50	1045 $\pm$ 1	754	62.3 $\pm$ 0.3
CP-II	-	40:60	3900 $\pm$ 1	*NR	*NR
CP-III	-	30:70	3600 $\pm$ 2	*NR	*NR

Los resultados son expresados en promedio (n=3)  $\pm$ desviación estándar. \*NR: no reportado en la literatura.

Se trabajó con diferentes proporciones porcentuales de las soluciones de CMC/PEO (50:50, 40:60 y 30:70 v/v) de manera similar a lo reportado Gasparic *et al.*, (2017) y se descartaron las soluciones de CMC/PEO (80/20, 90/10, 95/5 v/v) debido a que al incrementar la cantidad de carboximetilcelulosa no se formaron nanofibras. En contraste, al aumentarse la cantidad de PEO se facilitó el electrohilado y también al disminuir la tensión superficial. Además de incrementarse la viscosidad por la formación de puentes de hidrógeno entre los átomos de oxígeno de los grupos éter del PEO con los grupos hidroxilo de la CMC.

En la tabla 2 se muestran los parámetros medidos de las soluciones de CMC-PEO de manera individual y de las diferentes proporciones porcentuales en volumen.

**Tabla 2. Parámetros experimentales de las soluciones de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno sin ácido fólico**

Código	Solución polimérica (p/v)	Proporción porcentual (v)	Viscosidad aparente (cP)	Ángulo de contacto (grados)
CMC	5%	-	5600 $\pm$ 0.6	-
PEO	5%	-	1500 $\pm$ 0.6	-
CP-I	-	50:50	7800 $\pm$ 0.5	50.6 $\pm$ 0.5
CP-II	-	70:60	6900 $\pm$ 0.1	57.8 $\pm$ 0.1
CP-III	-	60:70	6600 $\pm$ 0.1	55.6 $\pm$ 0.1

Los resultados son expresados en promedio (n=3)  $\pm$ desviación estándar

La viscosidad experimental difiere del reportado por Maver *et al.*, (2020) y Gasparic *et al.*, (2017) debido a que las materias primas utilizadas son de distinto peso molecular y grado de sustitución. También se cuantificó el ángulo de contacto para evaluar si la presencia de etanol cambia el carácter hidrofílico de la CMC en las soluciones poliméricas.

## 4.2 Solución de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno con ácido fólico (CMC/PEO/AF)

En la Figura 10, se observa una solución de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno con ácido fólico de color amarillo por la presencia de la vitamina.



**Figura 10. Muestra representativa de la solución de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno con ácido fólico.**

En la tabla 3 se resumen los parámetros experimentales de las soluciones de CMC/PEO/AF consideradas para realizar ensayos en el equipo de electrohilado.

**Tabla 3. Parámetros experimentales de la solución de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno con ácido fólico**

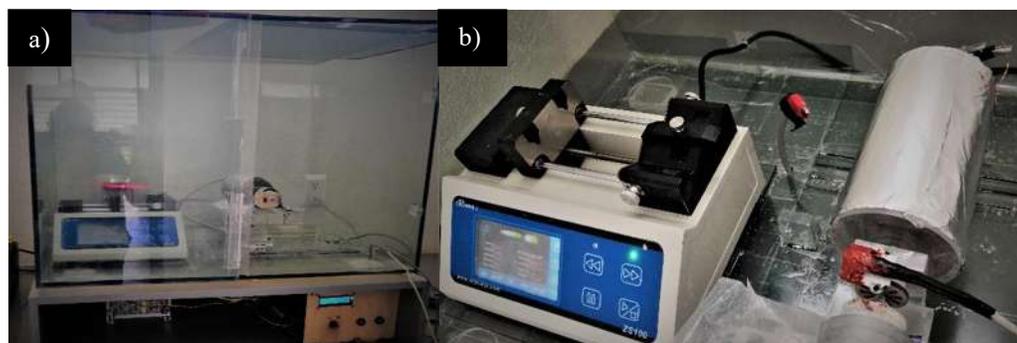
Código	Proporción porcentual (v)	Cantidad de AF (mg/g CMC)	Viscosidad (cP)	Ángulo de contacto (grados)
CAP-I	40:60	0.5	7700+0.5	56.77+0.5
CAP-II	30:70	0.5	6800+0.5	17.56+0.5

Los resultados son expresados en promedio (n=3)  $\pm$  desviación estándar.

Como se puede apreciar, la incorporación de ácido fólico incrementó la viscosidad de las soluciones poliméricas lo cual sugiere una interacción con los polímeros empleados de forma similar a estudios recientes acerca del uso de nanofibras para proteger ácido fólico donde se utilizó como matriz zeína (do Evangelho *et al.*, 2019) y almidón (Fonseca *et al.*, 2020). Dichos investigadores también reportaron que tras la incorporación de ácido fólico se disminuyó la conductividad eléctrica favoreciendo la generación de fibras ultrafinas de menor diámetro.

### 4.3 Generación de nanofibras poliméricas por el método de electrohilado

La obtención de nanofibras poliméricas de CMC-PEO se logró usando el equipo que se muestra en la Figura 11, como primer paso se inició la búsqueda de condiciones adecuadas para la generación de nanofibras variando las proporciones porcentuales de los polímeros en solución sin ácido fólico y también se realizaron modificaciones de los parámetros del equipo.



**Figura 11. Equipo de electrohilado: a) empleo de una caja de acrílico para control de parámetros ambientales y b) partes del equipo de electrohilado.**

#### 4.3.1 Parámetros de equipo para electrohilar la solución de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno sin ácido fólico

Las condiciones de operación inicial para obtener nanofibras a partir de la solución polimérica de CMC/PEO en ausencia de ácido fólico se resumen en la tabla 4.

**Tabla 4. Parámetros iniciales del equipo para el electrohilado de las soluciones de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno sin ácido fólico**

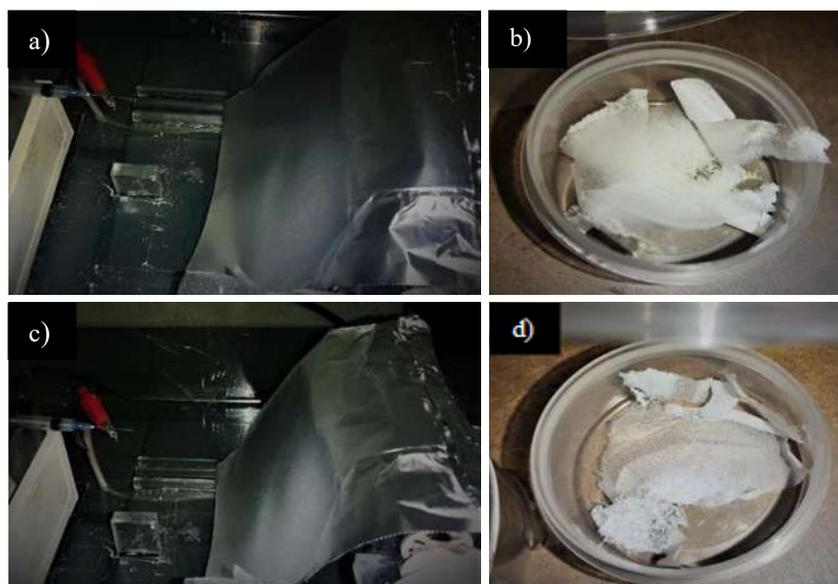
Código	Solución polimérica		
	CP-I	CP-II	CP-III
Proporción porcentual en volumen	CMC-PEO (50:50)	CMC-PEO (40:60)	CMC-PEO (30:70)
Disolvente	Agua-etanol (50:50)	Agua-etanol (50:50)	Agua-etanol (50:50)
Diámetro del capilar (mm)	0.8-0.6	0.8-0.6	0.8-0.6
Velocidad de flujo de salida (ml/min)	0.1-0.01	0.1-0.01	0.1-0.01
Voltaje (kV)	30-35	30-35	30-35
Distancia entre el capilar-colector (cm)	8-20	8-20	8-20
Tipo de colector	Plano	Plano	Plano

En la tabla 5, se muestran las condiciones que permitieron electrohilar las soluciones poliméricas sin ácido fólico, después de múltiples ensayos.

**Tabla 5. Condiciones de operación para el electrohilado de las soluciones de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno sin ácido fólico**

Código	Solución polimérica	
	CP-II	CP-III
Proporción porcentual (volumen)	CMC-PEO (70:60)	CMC-PEO (60:70)
Disolvente	Agua-etanol (50:50)	Agua-etanol (50:50)
Diámetro del capilar (mm)	0.6	0.6
Velocidad de flujo de salida (ml/min)	0.05	0.05
Voltaje (kV)	60	65
Distancia entre el capilar-colector (cm)	8	10
Tipo de colector	Plano	Plano

Como resultado se observó que después de cierto tiempo de trabajo en el equipo, fue posible electrohilar las soluciones con el código CP-II y CP-III debido al incremento de la cantidad de PEO a fin de generar fibras adecuadas con una menor presencia de gotas sobre las fibras. Adicionalmente, se observó que la solución polimérica no fue depositada de forma homogénea sobre la totalidad del área del colector fijo como se observa en la Figura 12.



**Figura 12. Proceso de electrohilado: a) equipo de electrohilado, b) producto final de la solución CP-II, c) equipo de electrohilado y d) producto final de la solución CP-III.**

La solución con el código CP-I no fue posible electrohilar debido a que su alta viscosidad dificultó la salida de la solución polimérica hacia el colector y finalmente provocó el taponamiento del capilar empleado durante el proceso, como se observa en la Figura 13.



**Figura 13. Evidencia de la dificultad para electrohilar la solución CP-I.**

#### **4.3.2 Parámetros de equipo para electrohilar la solución de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno con ácido fólico**

Se realizaron múltiples pruebas para establecer las condiciones que permitieron la formación de nanofibras tras la incorporación del ácido fólico a la solución polimérica, tomando como base las condiciones de operación ensayadas anteriormente, lo cual se resume en la tabla 6.

**Tabla 6. Parámetros iniciales del equipo para el electrohilado de las soluciones de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno con ácido fólico**

<b>Código</b>	<b>Solución polimérica</b>	
	<b>CAP-I</b>	<b>CAP-II</b>
Proporción porcentual en volumen	CMC/PEO (40:60)	CMC/PEO (30:70)
Cantidad de AF (mg/g de CMC)	0.5	0.5
Disolvente	Agua-etanol (50:50)	Agua-etanol (50:50)
Diámetro del capilar (mm)	0.6	0.6
Velocidad de flujo de salida (ml/min)	0.05-0.02	0.05-0.02
Voltaje (kV)	30-35	30-35
Distancia entre el capilar-colector (cm)	10-12	10-12
Tipo de colector	Plano	Plano

En la tabla 7 se presentan las condiciones que permitieron llevar a cabo el electrohilado de las soluciones CMC/PEO/AF.

**Tabla 7. Condiciones de operación para el electrohilado de las soluciones de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno con ácido fólico**

Código	Solución polimérica	
	CAP-I	CAP-II
Proporción porcentual (volumen)	CMC/PEO (40:60)	CMC/PEO (30:70)
Cantidad de AF (mg/g de CMC)	0.5	0.5
Disolvente	Agua-etanol (1:1)	Agua-etanol (1:1)
Diámetro del capilar (mm)	0.6	0.6
Velocidad de flujo de salida (ml/min)	0.01	0.01
Voltaje (kV)	30	35
Distancia capilar-colector (cm)	10	12
Tipo de colector	Plano	Plano

Después de cierto tiempo de trabajo en el equipo, se logró electrohilado de las soluciones con el código CAP-I y CAP-II tras la formación de una película con algunas zonas de color amarillo, lo cual sugiere una posible distribución no homogénea del ácido fólico en solución como se percibe visualmente en la Figura 14.



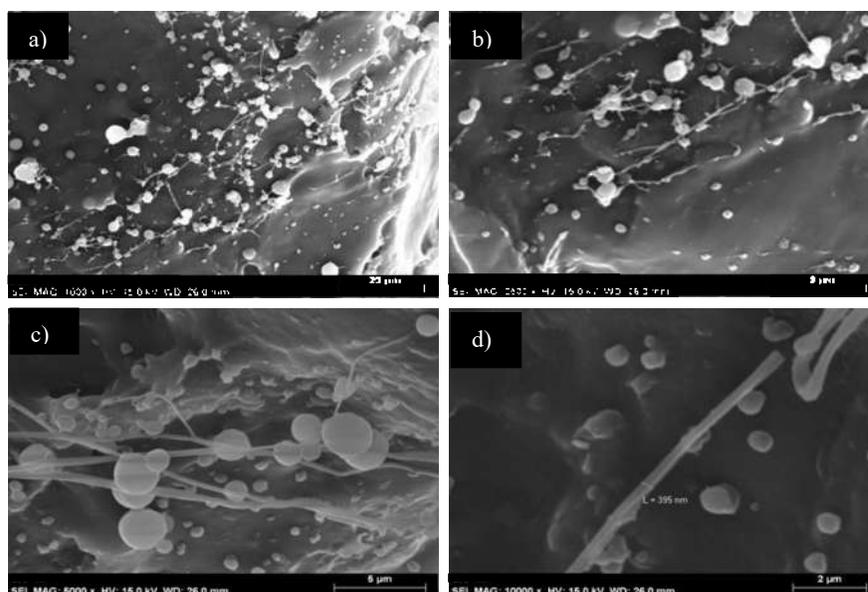
**Figura 14. Proceso de electrohilado: a) Equipo de electrohilado, b) producto final de la solución CAP-I, c) equipo de electrohilado y d) producto final de la solución CAP-II.**

#### 4.4 Análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido (MEB) con detector de energía dispersiva (EDS).

Las fibras fabricadas fueron puestas en estufa a 60°C por 8 h para secarse y retirar el remanente de disolvente y fueron analizadas por MEB para observar su forma tridimensional, textura y diámetro. También se efectuó un análisis semicuantitativo de la composición química de las mismas con ayuda de un detector de energía dispersiva (EDS).

##### 4.4.1 Fibras de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno sin ácido fólico

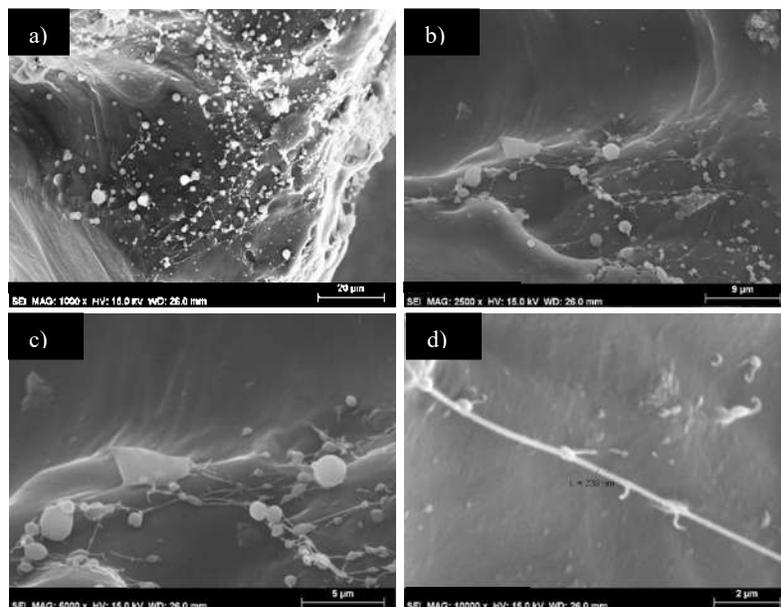
En la Figura 15 se ilustran micrografías obtenidas por MEB a diferentes ampliaciones (1,000x, 2,500x, 5,000x y 10,000x) de una zona representativa de la película CP-II donde se observa la presencia de algunas fibras planas con superficie lisa sin presencia de defectos en coexistencia con partículas esféricas y se determinó un diámetro aproximado de 395 nm.



**Figura 15. Micrografías por MEB de zonas representativas de la muestra CP-II a diferentes ampliaciones: a) 1,000x, b) 2,500x, c) 5,000x y d) 10,000x con medición aproximada de diámetro.**

En la Figura 16 se ilustran micrografías obtenidas por MEB a diferentes ampliaciones de una zona representativa de la muestra CP-III donde se observa la presencia de algunas fibras ultrafinas con superficie lisa y nula presencia de defectos, las cuales se aprecian junto

con partículas esféricas de diversos tamaños y también, se determinó un diámetro aproximado de 239 nm.

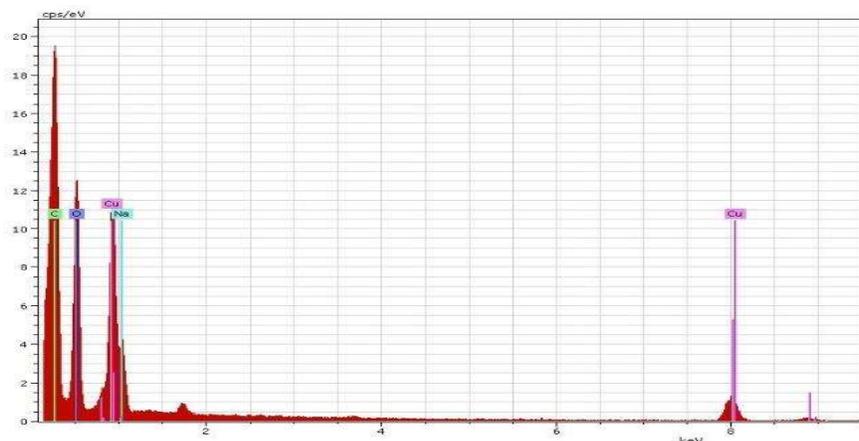


**Figura 16. Micrografías por MEB de zonas representativas de la muestra CP-III a diferentes ampliaciones: a) 1,000x, b) 2,500x, c) 5,000x y d) 10,000x con medición aproximada de diámetro.**

En la tabla 8, se contemplan los resultados obtenidos por EDS del análisis químico de elementos que se identificaron en la superficie de la muestra con el código CP-III, junto con su espectro EDS mostrado en la Figura 17, donde se identificó la presencia de carbono, oxígeno y sodio, elementos característicos de los polímeros.

**Tabla 8. Análisis EDS de la muestra CP-III**

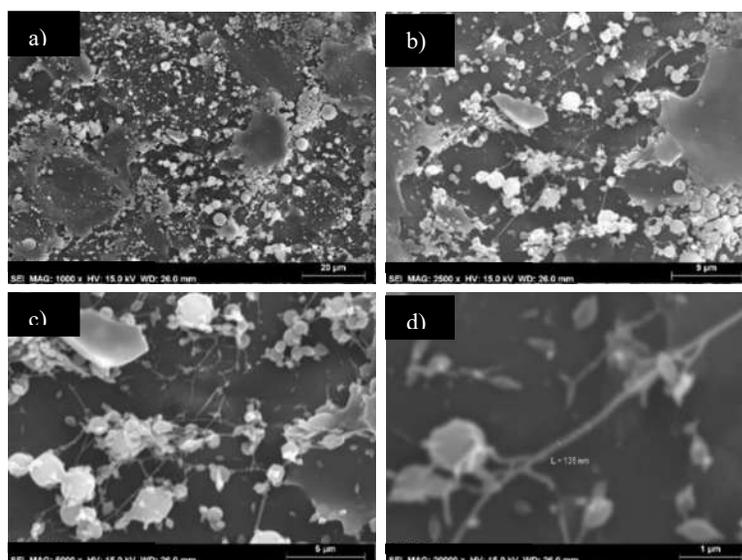
<b>Elemento químico</b>	<b>% Peso</b>	<b>% Atómico</b>
Carbono	38.02	46.45
Oxígeno	50.08	45.94
Sodio	11.9	7.61
Total	100	100



**Figura 17. Espectro EDS de la muestra CP-III.**

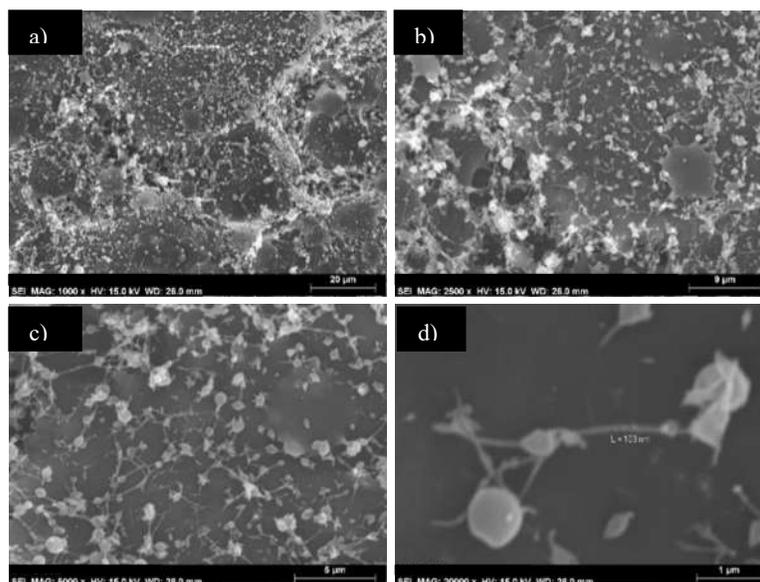
#### 4.4.2 Fibras de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno con ácido fólico

En la Figura 18 se ilustran las micrografías obtenidas por MEB a diferentes ampliaciones de una zona representativa de la película CAP-I donde se identificó la presencia de algunas fibras planas sin poros y con un diámetro aproximado de 135 nm. Se observan perlas en su morfología, lo cual se consideran defectos que pueden deberse a que la solución no logró ser estirada totalmente al colector y se atribuye a la baja viscosidad.



**Figura 18. Micrografías por MEB de zonas representativas de la muestra CAP-I a diferentes ampliaciones: a) 1,000x, b) 2,500x, c) 5,000x y d) 10,000x con medición aproximada de diámetro.**

En la Figura 19 se ilustran micrografías a diferentes ampliaciones (1,000x, 2,500x, 5,000x y 10,000x) de una zona representativa del producto final CAP-II donde se observa la presencia de fibras escasas distribuidas al azar, con menor longitud y diámetro aproximado de 103 nm, además de una mayor cantidad de defectos en forma de perlas.

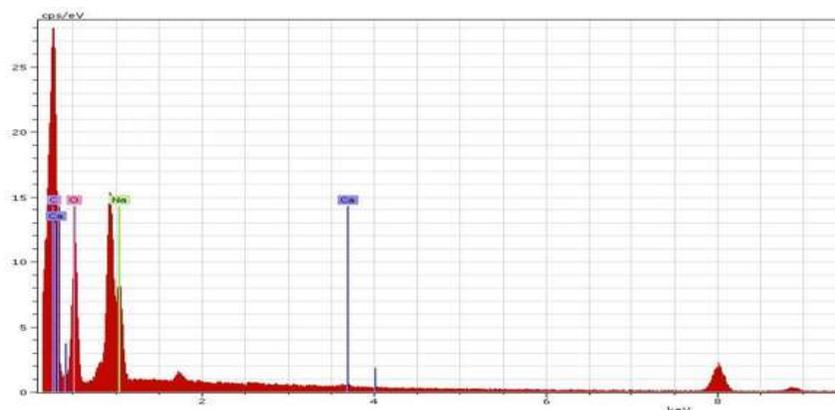


**Figura 19. Micrografías por MEB de zonas representativas de la muestra CAP-II a diferentes ampliaciones: a) 1,000x, b) 2,500x, c) 5,000x y d) 10,000x con medición aproximada de diámetro.**

En la tabla 9, se resumen los resultados de EDS de la muestra con el código CAP-II, junto con su espectro EDS mostrado en la Figura 20, donde se apreció el aumento en la concentración de carbono y oxígeno por la incorporación del ácido fólico. Sin embargo, no se detectó la presencia del nitrógeno (elemento característico del ácido fólico).

**Tabla 9. Análisis EDS de la muestra CAP-II**

Elemento químico	% Peso	% Atómico
Carbono	52.82	62.76
Oxígeno	40.09	32.02
Sodio	6.33	4.65
Calcio	Trazas	Trazas
Total	100	100



**Figura 20. Espectro EDS de la muestra CAP-II.**

Las micrografías tomadas muestran que al incrementarse la proporción de PEO en la solución polimérica se puede disminuir el espesor o diámetro de las fibras fabricadas considerando la influencia del voltaje usado y también la distancia capilar-colector. Sin embargo, debe optimizarse la solución polimérica y el electrohilado para evitar la formación de partículas poliméricas y obtener fibras continuas con orientación aleatoria.

#### **4.5 Optimización de los parámetros de las soluciones poliméricas y del equipo**

De los ensayos y resultados previamente obtenidos se encontró que la solución de CMC/PEO (30:70) con el código CP-III, tiene la proporción porcentual (en volumen) máxima para la posible fabricación de fibras ultrafinas mediante la técnica de electrohilado. Sin embargo, se optó por trabajar con la solución de CMC/PEO (40:60) con el código CP-II, tomando en cuenta los resultados obtenidos por MEB, a la cual se le modificó la proporción porcentual del solvente en volumen agua:etanol (40:60) para favorecer el proceso de electrohilado. De igual manera, se empleó el mismo solvente (agua:etanol 40:60) para preparar la solución de CMC/PEO/AF (40:60) con el código CAP-I, a la cual se le incrementó la concentración de ácido fólico de 0.5 mg a 1.5 mg por cada gramo de CMC; también se determinó la tensión superficial relativa de las soluciones poliméricas sin y con ácido fólico mediante la ley de Tate como se describe en el apartado 3.3.4. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 10.

**Tabla 10. Parámetros ensayados y óptimos de las soluciones de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno sin y con ácido fólico**

Código	Solución polimérica			
	Ensayo CP-II	Óptimo CP-III	Ensayo CAP-I	Óptimo CAP-III
Proporción porcentual (volumen)	CMC/PEO (40:60)	CMC/PEO (30:70)	CMC/PEO/AF (40:60)	CMC/PEO/AF (30:70)
Cantidad de AF (mg/g de CMC)	-	-	0.5	1.5
Disolvente empleado	Agua-etanol (50:50)	Agua-etanol (40:60)	Agua-etanol (50:50)	Agua-etanol (40:60)
Viscosidad (cP)	3900±0.1	3890±0.6	4400±0.5	4560±0.6
Conductividad (μS/cm)	593±2	644±1	410±2	419±1
Ángulo de contacto (grados)	24.8±0.1	23.9±0.5	23.47±0.1	23.67±0.5
Tensión superficial relativa (dinas/cm)	126.65±1.4	132.21±1.5	75.66±0.2	76.83±1.2

Los resultados son expresados en promedio (n=3) ± desviación estándar.

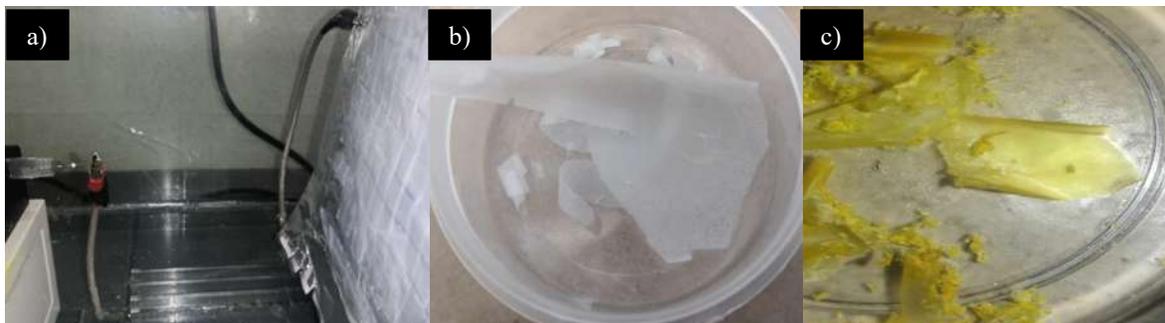
Respecto a los parámetros del equipo de electrohilado, se aumentó el diámetro del capilar usado de 0.6 mm a 0.7 mm. La distancia y el voltaje se incrementaron para la solución polimérica con ácido fólico con el fin de generar fibras ultrafinas con ausencia de nanopartículas y defectos, tal y como se resume en la tabla 11.

**Tabla 11. Condiciones de operación para el electrohilado de las soluciones de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno sin y con ácido fólico**

Código	Solución polimérica			
	Ensayo CP-II	Óptimo CP-IV	Ensayo CAP-I	Óptimo CAP-III
Diámetro del capilar (mm)	0.6	0.7	0.6	0.7
Velocidad de flujo de salida (ml/min)	0.05	0.05	0.01	0.02
Voltaje (kV)	30	30	30	35
Distancia capilar-colector (cm)	8	10	10	12
Tipo de colector	Plano	Plano	Plano	Plano

Los cambios realizados favorecieron una mejor distribución de las soluciones poliméricas sobre una mayor área del colector con lo cual se obtuvieron películas

homogéneas con un espesor adecuado para ser retiradas con facilidad del colector como se percibe en la Figura 21.



**Figura 21. Proceso de electrohilado: a) Equipo de electrohilado, b) producto final de la solución CP-IV y c) producto final de la solución CAP-III.**

Conforme avanzaba el proceso de electrohilado, se monitoreo la temperatura aproximada de trabajo durante la formación del cono de Taylor para verificar que dicha temperatura no ocasionara la degradación del ácido fólico contenido en la solución polimérica con el código CAP-III, como se resume en la tabla 12.

**Tabla 12. Registro de la temperatura de trabajo durante el proceso de electrohilado de la solución CAP-III**

Tiempo (h)	Temperatura promedio (°C)
0	25.8±0.1
1	26.8±0.1
5	27.3±0.1
6	28.0±0.1
7	29.2±0.1

Los resultados son expresados en promedio(n=3) ±desviación estándar

Se estima que la temperatura de trabajo durante el proceso de electrohilado en promedio oscila los 25-30 °C después de 4 h de funcionamiento continuo, lo cual sugiere que la temperatura alcanzada no genera daños sobre la estabilidad estructural del ácido fólico.

#### 4.5.1 Rendimiento de producción

Para calcular el rendimiento de producción de las nanofibras depositadas en las películas poliméricas sin y con ácido fólico obtenidas por la técnica de electrohilado, se empleó la siguiente ecuación y los resultados se muestran en la tabla 13.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{(\text{peso de las películas electrohiladas})}{(\text{peso teórico de las materias primas})} (100)$$

**Tabla 13. Rendimiento de producción de los productos finales de las soluciones electrohiladas de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno sin y con ácido fólico**

Código	Producto final	
	P-CP	P-CAP
Cantidad teórica (g)	1	1.0006
Peso obtenido (g)	0.85	0.866
Rendimiento de producción (%)	85%	86.54%

De acuerdo con los resultados obtenidos los porcentajes de rendimiento difieren entre un 13-15% del contenido teórico debido a que, durante el electrohilado, cierta cantidad de las soluciones empleadas fue atraída hacia algunos componentes metálicos del equipo lo cual provoca dicha pérdida. Sin embargo, se considera un rendimiento alto al compararse con otras técnicas empleadas de producción de nanofibras como síntesis en plantillas, separación de fases o autoensamblaje.

#### 4.6 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

A continuación, se muestran los resultados obtenidos del análisis estructural de las películas elaboradas a partir de mezclas de carboximetilcelulosa con ácido fólico, de óxido de polietileno con ácido fólico y por último, de carboximetilcelulosa con óxido de polietileno y ácido fólico, para conocer las posibles interacciones químicas entre las materias primas.

##### 4.6.1 Películas poliméricas con ácido fólico

En la Figura 22, se colocaron de forma comparativa los espectros infrarrojos obtenidos de películas elaboradas a partir de mezclas de los polímeros de forma individual con ácido fólico, es decir, de carboximetilcelulosa con ácido fólico (CMC/AF), óxido de

polietileno con ácido fólico (PEO/AF) y carboximetilcelulosa-óxido de polietileno con ácido fólico (CMC/PEO/AF).

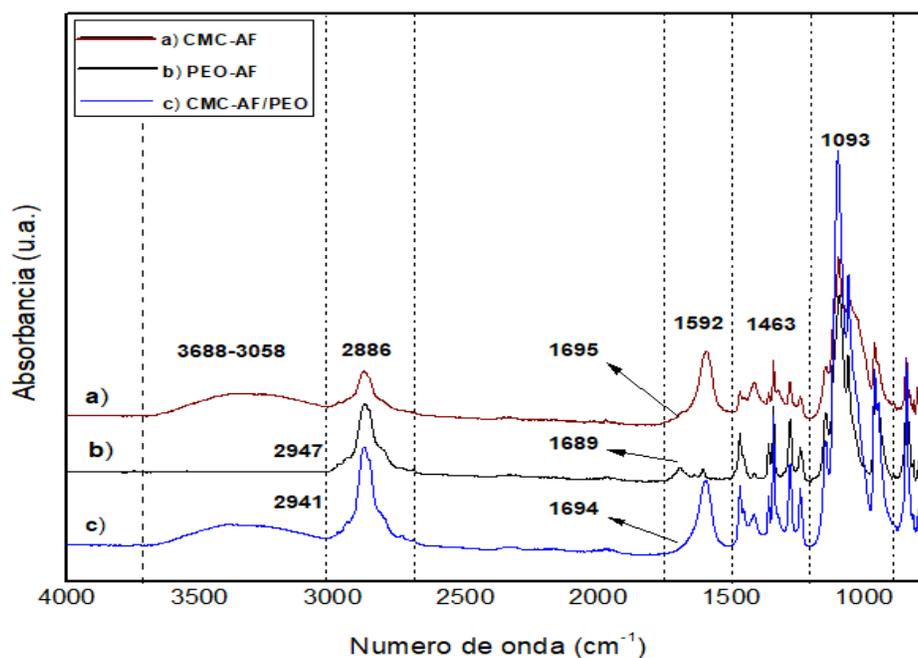
La Figura 22a exhibe el espectro infrarrojo obtenido de una película de **carboximetilcelulosa con ácido fólico** donde el componente mayoritario es la CMC y se observa más marcadamente en el espectro FTIR. Sin embargo, se aprecian algunas señales características provenientes de las tensiones que aporta la presencia del ácido fólico.

En la región de  $3,700-3,000\text{ cm}^{-1}$  se aprecia una amplia banda de absorción correspondiente a la presencia de grupos hidroxilo (-OH), la cual aparece centrada a  $3380\text{ cm}^{-1}$  dado que es una tensión normal para polímeros que le son asignados un gran número de tensiones internas y externas como la carboximetilcelulosa. Así mismo, dicha banda se sobrepone a la frecuencia vibracional característica de los grupos N-H a  $3245\text{ cm}^{-1}$  provenientes de la molécula del ácido fólico, por lo que no se logra apreciar en el espectro. En menor intensidad se observa un pequeño hombro a  $1695\text{ cm}^{-1}$  indicativo de la vibración de tensión característica del grupo amida del ácido glutámico, proveniente del ácido fólico. Por otro lado, la señal de flexión a  $1592\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la presencia de grupos carbonilo (C=O) provenientes de la CMC asociada con la señal de vibración a  $1409\text{ cm}^{-1}$  que se atribuye al estiramiento asimétrico de los grupos carboximéticos (COONa) del polímero. Finalmente, las señales a  $1104$  y  $1058\text{ cm}^{-1}$  representan la vibración asimétrica y simétrica del grupo éter (C-O-C) de las unidades de anhidroglucosa de la CMC.

En la Figura 22b se muestra el espectro infrarrojo correspondiente a la película de **óxido de polietileno con ácido fólico**, donde el componente mayoritario es el polímero en cuestión y también, se logran apreciar algunas señales características del ácido fólico. Por ejemplo, se observa una banda de adsorción ubicada a  $2937\text{ cm}^{-1}$  que es característico de la vibración simétrica de grupos metilenos ( $\text{CH}_2$ ) provenientes de las cadenas del óxido de polietileno cuya presencia esta combinada a la señal de  $1490\text{ cm}^{-1}$ . También se muestra en  $1689\text{ cm}^{-1}$  y a  $1604\text{ cm}^{-1}$ , vibraciones de tensión características del grupo amida del ácido glutámico y el enlace C=C aromático del ácido p-aminobenzoico provenientes de la vitamina en cuestión. Mientras que las señales a  $1098$  y  $843\text{ cm}^{-1}$  indican las tensiones asimétricas y de flexión del enlace éter (C-O-C) de las cadenas del óxido de polietileno.

Finalmente, se ilustra en la Figura 22c el espectro infrarrojo correspondiente a la mezcla de **carboximetilcelulosa y óxido de polietileno con ácido fólico**, donde se observan

indicios de la posible formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo (-OH) presentes en las cadenas de carboximetilcelulosa con los átomos de oxígeno del grupo éter proveniente del óxido de polietileno, de forma similar a lo reportado por Maver *et al.*, (2020) quienes analizaron nanofibras electrohiladas de CMC-PEO. Mientras que el ácido fólico, al encontrarse en menor cantidad posiblemente se encuentre también interaccionando con las cadenas poliméricas mediante la formación de puentes de hidrógeno de forma similar a lo reportado por Acevedo *et al.*, (2018) quienes determinaron que la incorporación de ácido fólico a nanoláminas de alginato-quitosano en medio alcalino se logró mediante la formación de puentes de hidrógeno dado que no se favoreció una interacción electrostática suficiente para promover un enlace iónico entre los componentes.



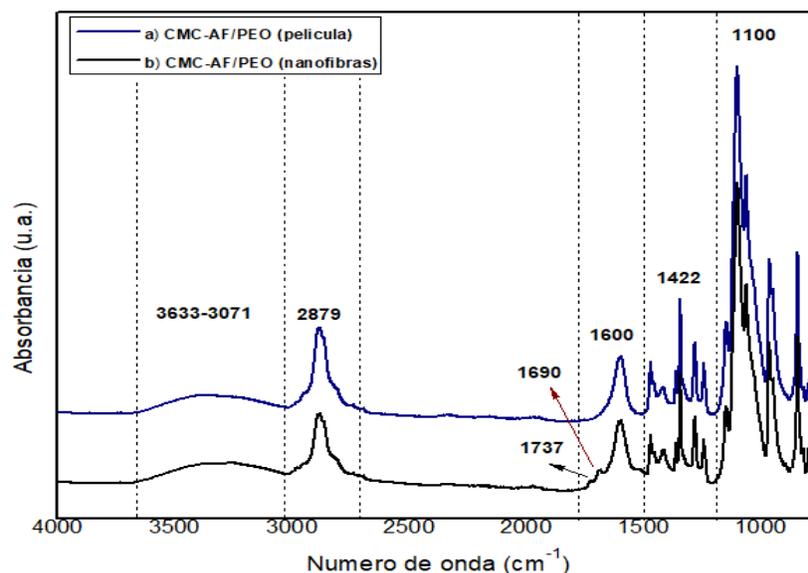
**Figura 22. Espectro infrarrojo de las películas poliméricas con ácido fólico: a) CMC/AF, b) PEO/AF y c) CMC/PEO/AF.**

#### 4.6.2 Fibras de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno electrohiladas con ácido fólico

En la Figura 23, se colocaron de forma comparativa los espectros infrarrojos obtenidos de: a) **película de CMC/PEO con ácido fólico** y b) **fibras de CMC/PEO con ácido fólico**, con el objetivo de comparar la interacción química entre las materias primas al incrementar la concentración de ácido fólico, el tiempo de reacción y la técnica de obtención.

En la Figura 23a se muestran las frecuencias de vibración correspondientes a la **película de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno con ácido fólico** donde se aprecia una amplia banda de absorción en la región de 3633-3071  $\text{cm}^{-1}$  indicativo de la interacción de los grupos hidroxilo (-OH) provenientes de las tensiones intra e intermolecular entre los componentes, principalmente de los polímeros presentes. También se observa una banda de adsorción en 2879  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración simétrica de grupos metilenos ( $\text{CH}_2$ ) de las cadenas de la carboximetilcelulosa y del óxido de polietileno. Así como también se muestra a 1600  $\text{cm}^{-1}$ , la frecuencia de vibración característica del enlace  $\text{C}=\text{C}$  aromático del ácido *p*-aminobenzoico perteneciente al ácido fólico.

En comparación con el espectro infrarrojo correspondiente a las **fibras de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno con ácido fólico**, donde se encuentran depositadas las nanofibras de CMC/PEO/AF, se aprecia una nueva frecuencia de vibración a 1737  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la formación de un enlace éster entre la CMC y el ácido fólico, al incrementarse la concentración de ácido fólico añadido. Dicho resultado es similar al obtenido por Borah *et al.* en el 2019, quienes confirmaron por FTIR la esterificación del ácido fólico en las cadenas ramificadas de amilopectina.



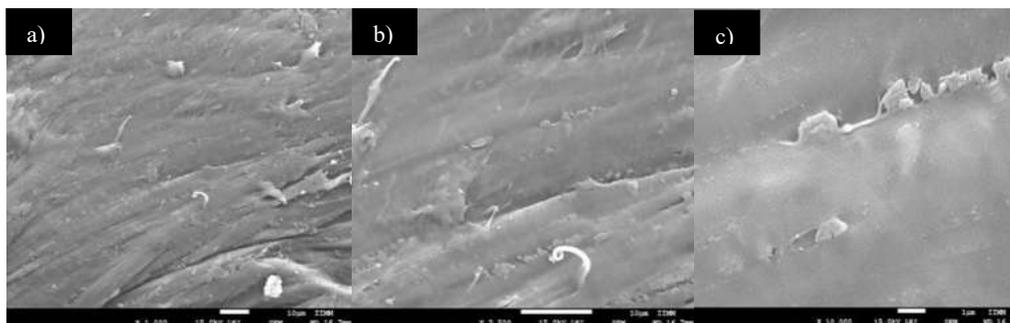
**Figura 23. Espectro infrarrojo de: a) película de CMC/PEO con ácido fólico y b) fibras electrohiladas de CMC/PEO con ácido fólico.**

#### 4.7 Microscopía electrónica de barrido (MEB) con detector de energía dispersiva

El análisis morfológico realizado por MEB para observar la forma tridimensional, textura y compatibilidad de los polímeros con el ácido fólico, se describe a continuación. De manera simultánea, también se efectuó un análisis de la composición química de dichas películas con ayuda de un detector de energía dispersiva (EDS).

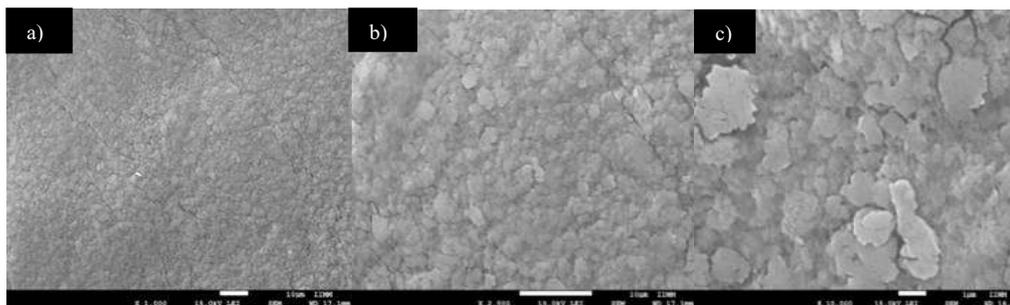
##### 4.7.1 Películas poliméricas con ácido fólico

En la Figura 24a, 24b y 24c se muestran micrografías obtenidas por MEB a diferentes ampliaciones (1,000x, 2,500x y 10,000x) de una zona representativa de una película de **carboximetilcelulosa y ácido fólico** donde se aprecia una superficie continua con algunos relieves sin fases dispersas lo cual indica una buena compatibilidad de ambos compuestos.



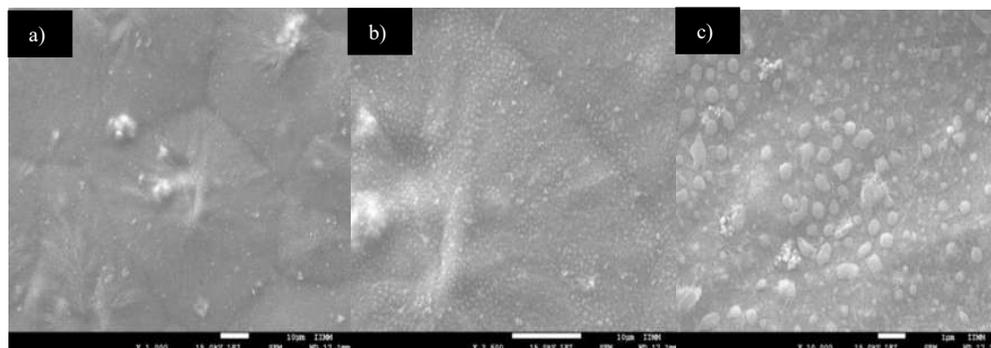
**Figura 24.** Micrografías por MEB de una zona representativa de la película de CMC/AF a diferentes ampliaciones: a) 1,000x, b) 2,500x y c) 10,000x, respectivamente.

De igual manera, la Figura 25a, 25b y 25c, se aprecia una película de **óxido de polietileno y ácido fólico** con una superficie rugosa y agrietada, lo cual sugiere una deficiente interacción de los compuestos.



**Figura 25.** Micrografías por MEB de una zona representativa de la película de PEO/AF a diferentes ampliaciones: a) 1,000x, b) 2,500x y c) 10,000x, respectivamente.

En la Figura 26a, 26b y 26c se observa una moderada incorporación de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno con el ácido fólico debido a una separación de fases, lo cual pudo deberse al tiempo de agitación y las condiciones de secado en placa.

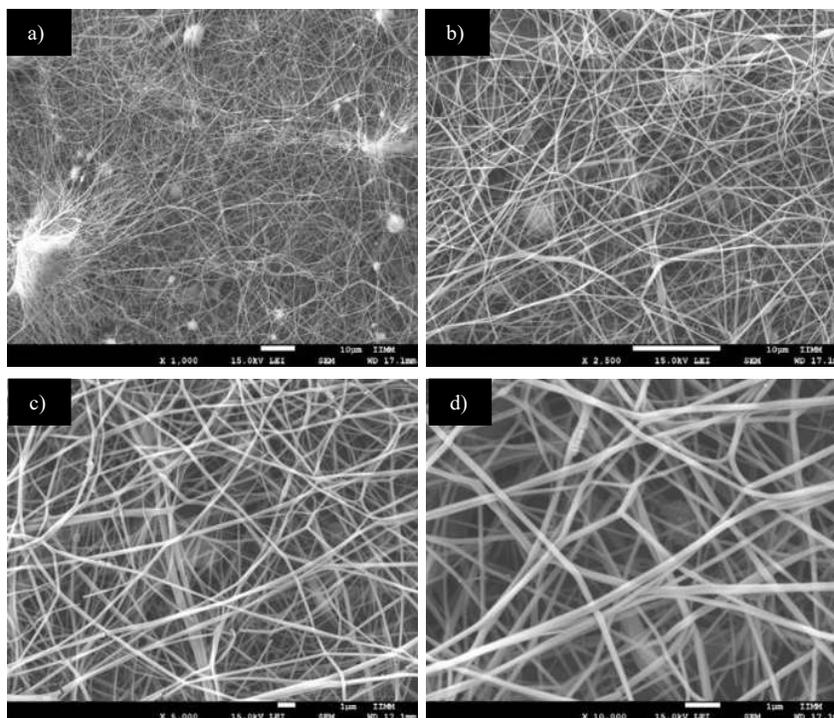


**Figura 26. Micrografías tomadas por MEB de una película de CMC/PEO con ácido fólico a diferentes ampliaciones: a) 1,000x, b) 2,300x y c) 10,000x, respectivamente.**

#### **4.7.2 Fibras de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno sin ácido fólico**

En la Figura 27a, 27b, 27c y 27d se ilustran micrografías tomadas por MEB a diferentes ampliaciones (1,000x, 2,500x, 5,000x y 10,000x, respectivamente) de una zona representativa de **fibras de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno sin ácido fólico**.

En la micrografía 27d (ampliación de 10,000x) se muestra que posteriormente a la optimización de los parámetros de solución y variables en el manejo del equipo se logró la obtención de fibras ultrafinas continuas relativamente uniformes, con una forma plana y superficie lisa con mínima presencia de defectos a lo largo de las mismas. Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Baek *et al.* (2020) quienes obtuvieron nanofibras de alginato/carboximetilcelulosa/óxido de polietileno con una morfología uniforme, de superficie lisa sin poros y poca presencia de defectos. Después de incorporar lidocaína obtuvieron nanofibras sin defectos y con menor diámetro. Asimismo, Maver *et al.* (2020) obtuvieron nanofibras de carboximetilcelulosa/óxido de polietileno con extractos medicinales y reportaron una morfología uniforme sin defectos visibles y sin fusionar para las nanofibras sin extracto medicinal.

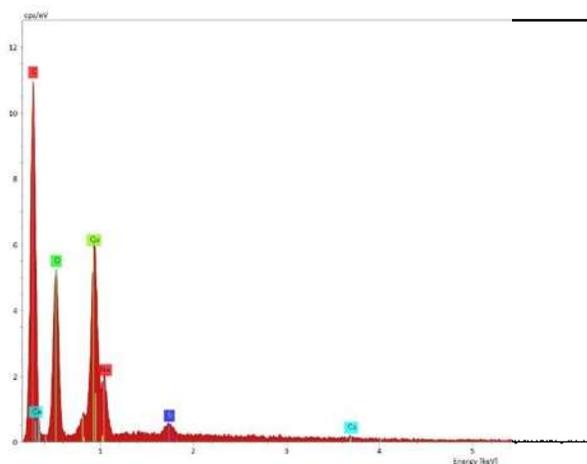


**Figura 27. Micrografías por MEB a diferentes ampliaciones de las fibras de CMC/PEO sin ácido fólico: a) 1,000x, b) 2,500x, c) 5,000x y d) 10,000x respectivamente.**

En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos por EDS del análisis químico de elementos que se identificaron en la superficie de una muestra representativa de las fibras ultrafinas sin ácido fólico obtenida mediante la técnica de electrohilado, junto con su espectro EDS mostrado en la Figura 28, donde se identificó la presencia de elementos característicos de los polímeros.

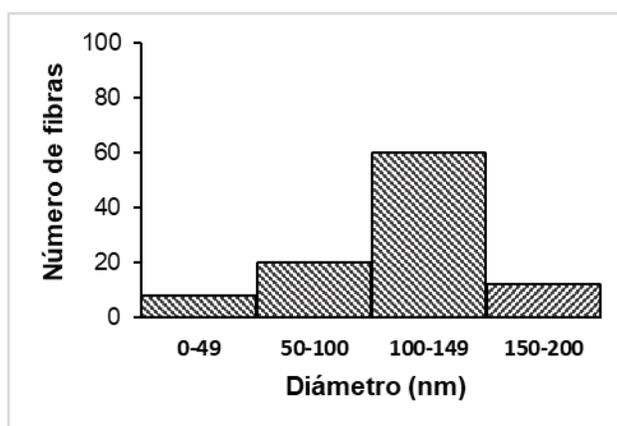
**Tabla 14. Análisis EDS de las fibras de CMC/PEO sin ácido fólico**

Elemento químico	% Peso	% Atómico
Carbono	52.82	62.76
Oxígeno	40.09	31.02
Sodio	6.33	4.65
Calcio	0.76	1.57
Total	100	100



**Figura 28. Espectro EDS de una muestra representativa de las fibras de CMC/PEO sin ácido fólico.**

El diámetro de las fibras fueron medidas usando el programa ImageJ directamente de las micrografías tomadas por MEB, se midieron de forma individual 50 nanofibras para calcular el diámetro promedio, dando como resultado un diámetro promedio de 119 nm como se muestra en la Figura 29. Dicho resultado difiere del obtenido por Maver *et al.*, (2020) quienes reportaron nanofibras de CMC/PEO con un diámetro promedio 177 nm al emplear un equipo de electrohilado sin capilar.

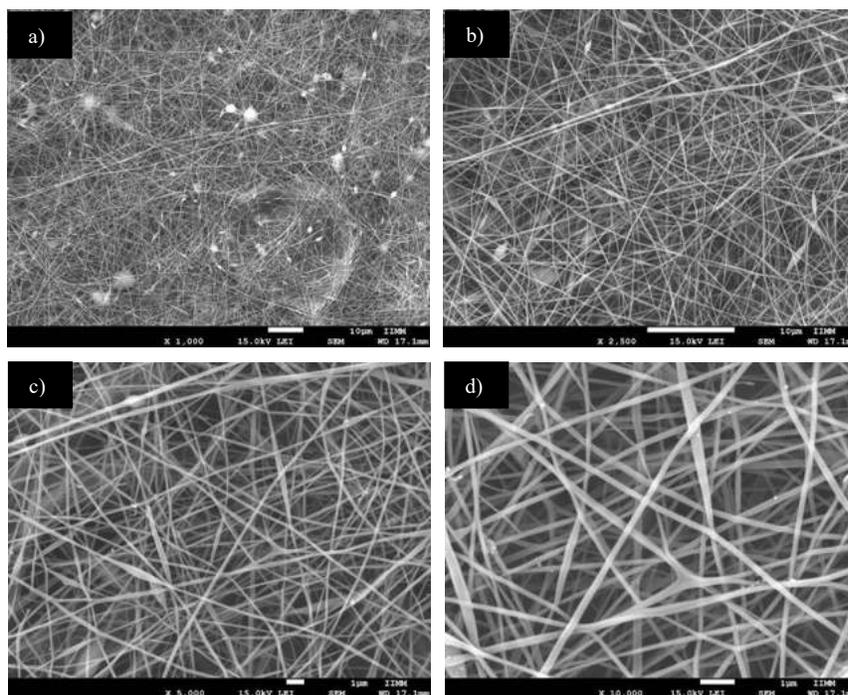


**Figura 29. Distribución del diámetro de las fibras de CMC/PEO sin ácido fólico.**

#### 4.7.3 Nanofibras de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno con ácido fólico

En la Figura 30a, 30b, 30c y 30d se muestran micrografías obtenidas por MEB a diferentes ampliaciones (1,000x, 2,500x, 5,000x y 10,000x, respectivamente) de una zona representativa de las nanofibras de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno y ácido fólico (CMC/AF/PEO).

En la Figura 30d (ampliación de 10,000x) se observó que la adición de ácido fólico ocasiona pocos cambios morfológicamente hablando de las fibras formadas en comparación con las fibras ultrafinas sin ácido fólico, debido que presentan una forma plana, con una superficie lisa y una baja presencia de defectos a lo largo de las mismas. Los resultados obtenidos son similares a los reportados por do Evangelho *et al.* (2019) quienes obtuvieron nanofibras de zeína con ácido fólico y cuya morfología no se modificó tras la incorporación de ácido fólico. Por otro lado, Fonseca *et al.*, (2020) reportaron que al incrementar la cantidad de ácido fólico a nanofibras de almidón, éstas exhibieron una morfología más homogénea y continua, sin defectos.

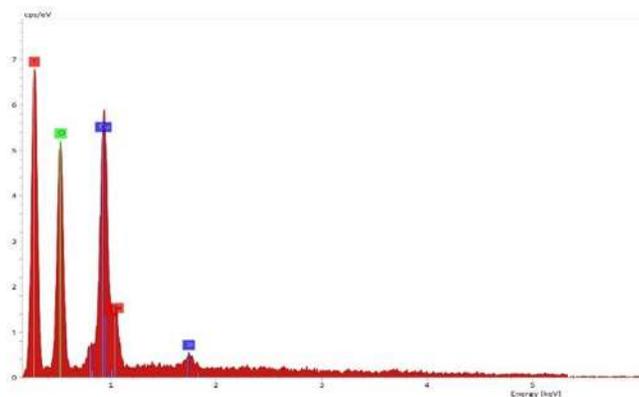


**Figura 30.** Micrografías por MEB a diferentes ampliaciones de nanofibras de CMC/PEO con ácido fólico a) 1,000x, b) 2,500x, c) 5,000x y d) 10,000x, respectivamente.

En la tabla 15, se perciben los resultados obtenidos por EDS del análisis químico de elementos que se identificaron en la superficie de las nanofibras con ácido fólico junto con su espectro EDS mostrado en la Figura 31, donde se apreció el aumento en la cantidad de carbono y oxígeno por la incorporación de ácido fólico. Sin embargo, no se detectó la presencia del nitrógeno (elemento característico del ácido fólico) lo cual da indicios de una de una posible distribución no homogénea del ácido fólico a lo largo de las nanofibras.

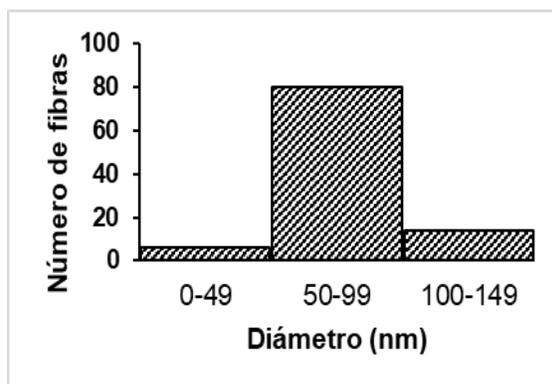
**Tabla 15. Análisis EDS de nanofibras de CMC/PEO con ácido fólico**

Elemento químico	% Peso	% Atómico
Carbono	52.82	62.76
Oxígeno	40.09	31.02
Sodio	6.33	4.65
Calcio	0.76	1.57
Total	100	100



**Figura 31. Espectro EDS de una muestra representativa de las nanofibras de CMC/PEO con ácido fólico.**

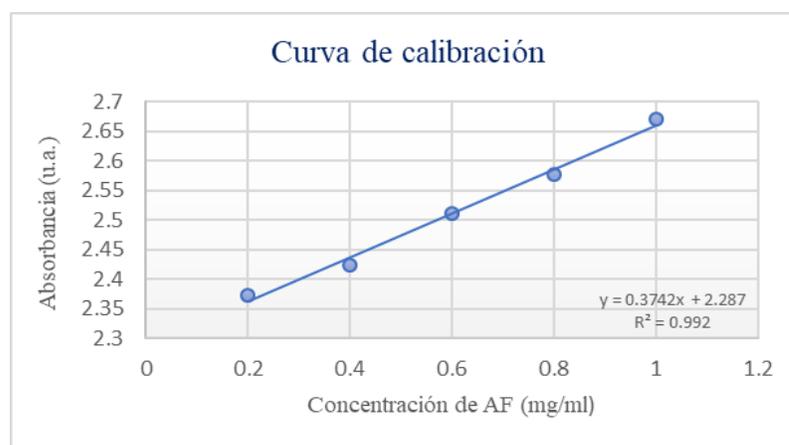
El diámetro de las fibras fueron medidas usando ImageJ directamente de las micrografías tomadas con MEB y se midieron de forma individual 50 nanofibras para establecer el diámetro, dando como resultado un diámetro promedio de 88 nm como se percibe de una mejor manera en la Figura 32.



**Figura 32. Distribución del diámetro de las fibras de CMC/PEO con ácido fólico.**

#### 4.8 Eficiencia de encapsulado del ácido fólico en nanofibras electrohiladas

Se cuantificó la cantidad de ácido fólico contenido en las nanofibras poliméricas electrohiladas, mediante una curva de calibración previamente elaborada y como se describió en el apartado 6.5.3. Una vez que se empleó el método de extracción, se analizó por espectrometría UV-Vis y se calculó el porcentaje de eficiencia de encapsulación aplicando la **ecuación 2** del apartado 6.5.3. Se realizaron 3 réplicas para cada solución empleada y la ecuación obtenida de la curva de calibración fue  $y=0.3742x + 2.287$ ,  $R^2= 0.992$  como se muestra en la Figura 33.



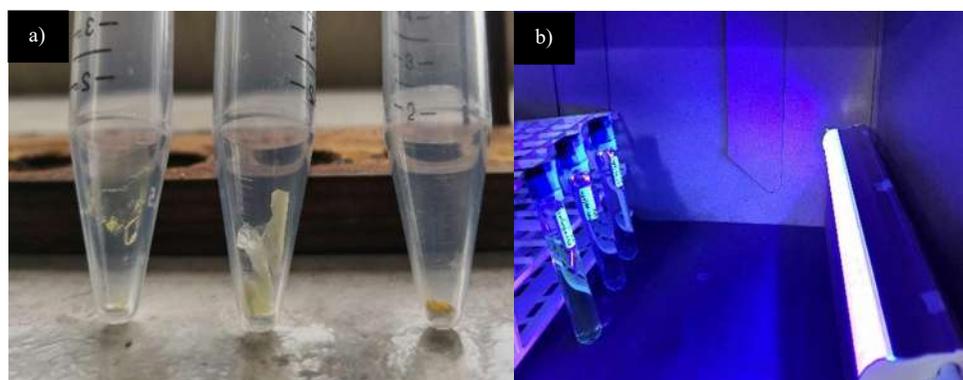
**Figura 33. Curva de calibración de ácido fólico.**

Como resultado se obtuvo una eficiencia de encapsulado de 94.5 % de ácido fólico contenido en las nanofibras poliméricas lo cual es similar a lo reportado por Fonseca *et al.*

(2020) quienes obtuvieron una eficiencia de encapsulado del 95.6% al usar almidón como matriz para la fabricación de nanofibras. Asimismo, Aceituno *et al.*, (2015) reportaron una eficiencia de encapsulado de ácido fólico del 95% en nanofibras electrohiladas de aislado de proteína de amaranto con pululano.

#### 4.9 Estudio de la fotoestabilidad del ácido fólico

En la Figura 34, se muestra el sistema utilizado para determinar la concentración de ácido fólico contenido en los diferentes tratamientos (película de CMC-PEO con ácido fólico con el código **P-AF**, nanofibras de CMC-PEO-AF con el código **NF-AF** y ácido fólico sin protección con el código **AF-libre**) después de ser irradiados con una lámpara de luz ultravioleta tipo A ( $\lambda=365$  nm) durante 1 h siguiendo la metodología descrita en el **apartado 3.4.4** y los resultados obtenidos se encuentran en la tabla 16.



**Figura 34. Estudio de la fotoestabilidad del ácido fólico: a) tratamientos P-AF, NF-AF y AF-libre y b) sistema empleado para irradiar con luz ultravioleta los tratamientos en solución buffer (pH de 7).**

**Tabla 16. Concentración de ácido fólico contenido en los diferentes tratamientos al ser irradiados con luz ultravioleta tipo A en el transcurso de 1 h**

Código	Concentración de AF (mg/ml)			
	Control	20 min	40 min	60 min
P-AF	0.589±0.001	0.518±0.001	0.289±0.001	0.130±0.001
NF-AF	0.566±0.001	0.539±0.001	0.464±0.001	0.445±0.001
AF-libre	0.605±0.001	0.348±0.005	0.091±0.001	ND*

Los resultados son expresados en promedio (n=3) ± desviación estándar. \*ND: no detectado

#### 4.9.1 Análisis de varianza (ANOVA) de los tratamientos irradiados con luz UV

En la tabla 17 se muestran los resultados de ANOVA de un factor, donde se indican las diferencias significativas entre los grupos de tratamiento ( $p < 0,05$ ). El análisis estadístico de Fisher (valor F) y los valores P obtenidos permitieron evaluar la influencia de los factores críticos y la eficiencia del modelo.

Tabla 17. Análisis de varianza de los distintos tratamientos

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Entre grupos	0.4346	2	0.2173	11.754	3.4668
Dentro de los grupos	0.3882	21	0.0184		
Total	0.8229	23			

#### 4.9.2 Prueba de Tukey (comparación de medias)

En la tabla 18 se encuentra el análisis de comparaciones múltiples (Tukey) con un nivel de significancia de 0.05, para contrastar la existencia de diferencias significativas para todos los tratamientos.

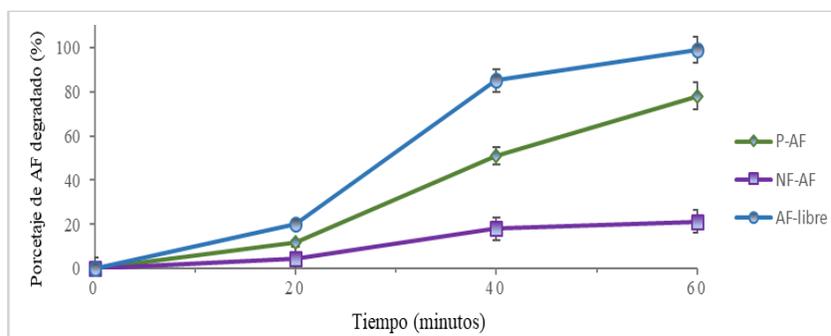
Tabla 18. Comparación de medias prueba de Tukey con 0.05 de significancia

Par de tratamientos	Magnitud de diferencia
P-AF con NF-AF	0.230*
NF-AF con AF-libre	0.323*
P-AF con AF-libre	0.092 NS

\*Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ); NS Diferencias no significativas.

Como se percibe en la Figura 35, para el tratamiento con el código **P-AF** la degradación de AF fue de 77.92% después de 1 h de radiación UV. Asimismo, para el tratamiento **NF-AF** la degradación del AF contenido fue de 21.37% y finalmente, para el tratamiento **AF-libre**, no fue posible detectar la presencia de AF sin degradar, lo cual está acorde con lo reportado por Wang *et al.*, (2021) quienes determinaron que el ácido fólico en solución buffer (pH de 7) fue rápidamente degradado en un 22% después de 20 min de exposición a luz ultravioleta y a los 40 min se degradó en un 80% en comparación al

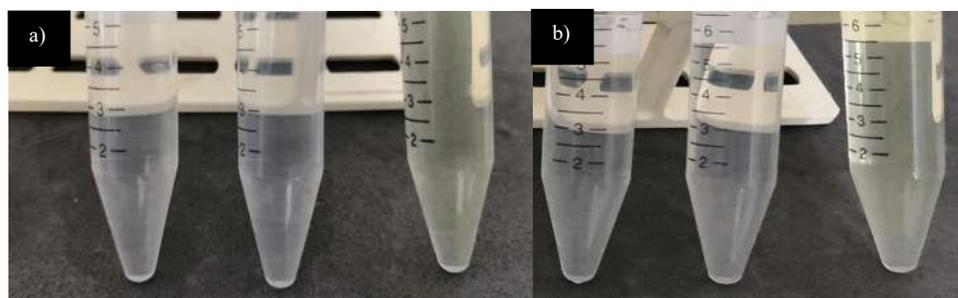
contenido inicial. De los resultados obtenidos, se deduce que las nanofibras poliméricas presentaron el menor porcentaje de degradación de ácido fólico frente a radiación UVA. Es importante enfatizar que las características químicas y físicas del polímero que alberga al AF es fundamental para aportar estabilidad a la molécula activa, esto es evidente al comparar con investigaciones como la realizada por Fonseca *et al.*, (2020) ya que reportaron que la cantidad de ácido fólico contenido en nanofibras de almidón posterior a ser expuestas a luz UV en seco por 1 h, se incrementó debido a que la matriz empleada se disolvió parcialmente por la humedad presente en el ambiente. Aunque también reportaron que el ácido fólico se mantuvo estable durante dicho periodo de tiempo. Asimismo, do Evangelho *et al.*, (2019) reportaron ácido fólico contenido en nanofibras de zeína después de ser irradiadas con luz UV por 1 h se degradó un 17.57%. Por lo tanto, la estabilidad estructural del ácido fólico contenido en nanofibras de CMC-AF/PEO podría deberse a la interacción química entre el ácido fólico y los polímeros en cuestión, lo cual dificulta el rompimiento del enlace en la posición C9 y N10 en la estructura del ácido fólico confiriendo una mayor estabilidad frente a la radiación ultravioleta.



**Figura 35. Porcentaje de ácido fólico degradado en los distintos tratamientos después de ser irradiados con luz ultravioleta al transcurrir 1 h.**

#### 4.10 Estudio de la estabilidad del ácido fólico en medios con pH ácido

En la Figura 36, se ilustran los distintos tratamientos (P-AF, NF-AF y AF-libre) después de ser colocados en una solución con pH de 3, después de 15 y 30 días en condiciones de oscuridad y siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.4.5. También se resume en la tabla 19 la concentración de ácido fólico contenido en los diferentes tratamientos después de 15 y 30 días en las condiciones mencionadas con anterioridad.



**Figura 36. Estabilidad del ácido fólico contenido en los distintos tratamientos en solución con pH de 3 (P-AF, NF-AF y AF-libre): a) después de 15 días y b) después de 30 días.**

**Tabla 19. Concentración de ácido fólico contenido en los distintos tratamientos en solución con pH=3 y oscuridad al transcurrir 15 y 30 días**

Código	Concentración de AF (mg/ml)		
	Control	15 días	30 días
P-AF	0.587±0.001	0.120±0.001	0.108±0.001
NF-AF	0.568±0.001	0.535±0.001	0.533±0.001
AF-libre	0.605±0.001	0.060±0.001	ND*

Los resultados son expresados en promedio (n=3) ± desviación estándar. \*ND= No detectado

#### 4.10.1 Análisis de varianza (ANOVA) de los tratamientos en solución con pH de 3

En la tabla 20 se muestran los resultados de ANOVA de un factor, donde se indican las diferencias significativas entre los grupos de tratamiento ( $p < 0,05$ ). El análisis estadístico de Fisher (valor F) y los valores P obtenidos permitieron evaluar la influencia de los factores críticos y la eficiencia del modelo.

**Tabla 20. Análisis de varianza de los distintos tratamientos con pH de 6**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Entre grupos	0.6962	2	0.3481	17827.4	3.885
Dentro de los grupos	0.0002	12	0.00001		
Total	0.6964	14			

#### 4.10.2 Prueba de Tukey (comparación de medias)

En la tabla 21 se muestra el análisis de comparaciones múltiples (Tukey) con un nivel de significancia de 0.05, para contrastar la existencia de diferencias significativas para todos los tratamientos.

**Tabla 21. Comparación de medias prueba de Tukey con 0.05 de significancia**

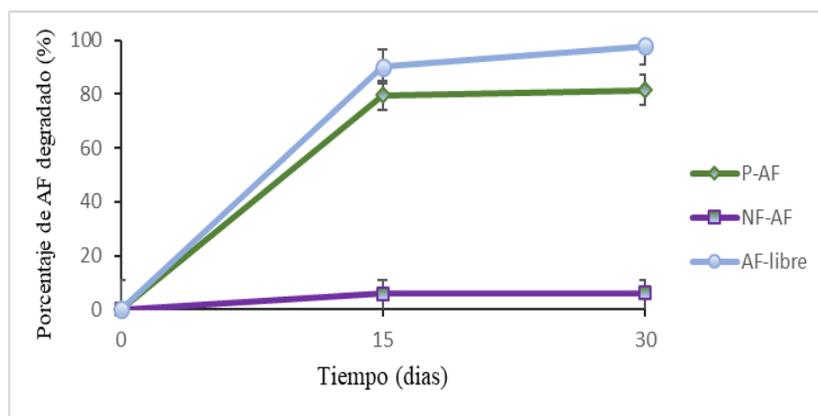
<b>Par de tratamientos</b>	<b>Magnitud de diferencia</b>
P-AF con NF-AF	0.42 *
NF-AF con AF-libre	0.05*
P-AF con AF-libre	0.47*

\*Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ); NS Diferencias no significativas.

En la Figura 37, se muestra gráficamente que el tratamiento con el código **P-AF**, después de 15 y 30 días en solución con  $\text{pH}=3$ , tuvo un porcentaje de degradación de ácido fólico mayor al 80% durante dicho periodo de tiempo. En contraste, para el tratamiento **NF-AF** la degradación prácticamente se mantuvo en un 6% durante el transcurso de los 30 días y finalmente, para el tratamiento **AF-libre** se determinó que a los 15 días se degradó 90.1% en comparación con el contenido inicial y al finalizar los 30 días, no fue posible detectar el ácido fólico activa. Dichos resultados son distintos a los observados por Alborzi *et al.*, (2014) quienes reportaron que el ácido fólico contenido en nanofibras electrohiladas de alginato-pectina con cloruro de calcio (agente entrecruzante), las cuales retuvieron un 90% del ácido fólico después de 41 días (en solución con  $\text{pH}$  de 3), es decir, que en promedio se degradó 3% en comparación con el contenido inicial. También reportaron que el ácido fólico sin protección fue degradado casi en su totalidad los primeros días bajo las mismas condiciones, ya que sólo recuperaron el 8% del contenido inicial a las 24 h. Asimismo, dichos investigadores determinaron que las nanofibras de alginato-pectina sin entrecruzante retuvieron cerca del 37% del contenido inicial de ácido fólico después de 41 días, lo cual se pudo deber al colapso de las nanofibras en solución propiciando la liberación del ácido fólico y por lo tanto, una menor protección.

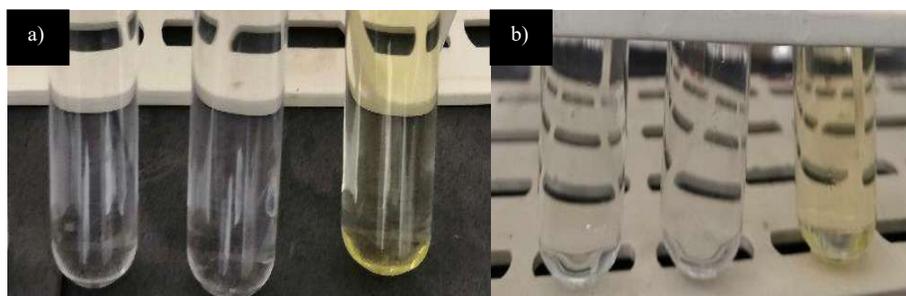
Con base a los resultados obtenidos se considera que las nanofibras de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno tienen el potencial para emplearse como un sistema de protección del ácido fólico en productos líquidos ácidos como jugos de frutas, debido a que la CMC es un polielectrolito aniónico que además tiene un comportamiento  $\text{pH}$ -dependiente. En decir, la CMC a un  $\text{pH}$  de 3 presenta una menor ionización probablemente debido a la protonación de los grupos hidroxilo, lo cual inmoviliza o atrapa al ácido fólico dentro de las cadenas poliméricas de la CMC y dicho efecto, ya ha sido sugerido en estudios similares (Garzón *et al.*, 2009). Por otro lado, dado que el tratamiento P-AF solamente retuvo el 20% del ácido fólico total, se sugiere que la morfología de las nanofibras sobre la película

polimérica, presentan un efecto importante, debido a que la orientación aleatoria de las mismas y el incremento del área superficial, podrían generar más sitios de interacción entre las nanofibras y el ácido fólico aunado a la baja solubilidad de dicha vitamina en condiciones ácidas, se propicia su deposición en las nanofibras.



**Figura 37. Porcentaje de ácido fólico degradado en los distintos tratamientos: P-AF, NF-AF y AF-libre después de 15 y 30 días en solución con pH de 3 y en oscuridad.**

En la Figura 38, se muestran los distintos tratamientos (P-AF, NF-AF y AF-libre) después de ser colocados en una solución con pH de 5.8, durante 15 y 30 días en condiciones de oscuridad y siguiendo la metodología descrita en el **apartado 6.5.7**. También en la tabla 22 se encuentran las concentraciones de ácido fólico contenido en los diferentes tratamientos después de 15 y 30 días en las condiciones mencionadas con anterioridad.



**Figura 38. Sistema utilizado para los tratamientos P-AF, NF-AF y AF-libre en medio acuoso con pH de 5.8: a) después de 15 días y b) después de 30 días.**

**Tabla 22. Concentración de ácido fólico contenido en los distintos tratamientos en solución con pH de 5.8 en oscuridad (después de 15 y 30 días)**

Código	Concentración de AF (mg/ml)		
	Control	15 días	60 días
<b>P-AF</b>	0.587±0.001	0.286±0.001	0.265±0.001
<b>NF-AF</b>	0.568±0.001	0.518±0.001	0.491±0.001
<b>AF-Libre</b>	0.605±0.001	0.012±0.001	*ND

Los resultados son expresados en promedio (n=3) ± desviación estándar. \*No detectado

#### 4.10.3 Análisis de varianza (ANOVA) de los tratamientos en solución con pH de 5.8

En la tabla 23 se muestran los resultados de ANOVA de un factor, donde se indican las diferencias significativas entre los grupos de tratamiento ( $p < 0,05$ ). El análisis estadístico de Fisher (valor F) y los valores P obtenidos permitieron evaluar la influencia de los factores críticos y la eficiencia del modelo.

**Tabla 23. Análisis de varianza de los distintos tratamientos**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Entre grupos	0.4998	2	0.2499	1669.8	3.885
Dentro de los grupos	0.0017	12	0.0001		
Total	0.5016	14			

#### 4.10.4 Prueba de Tukey (comparación de medias)

En la tabla 24 se muestra el análisis de comparaciones múltiples (Tukey) con un nivel de significancia de 0.05, para contrastar la existencia de diferencias significativas para todos los tratamientos.

**Tabla 24. Comparación de medias prueba de Tukey con 0.05 de significancia**

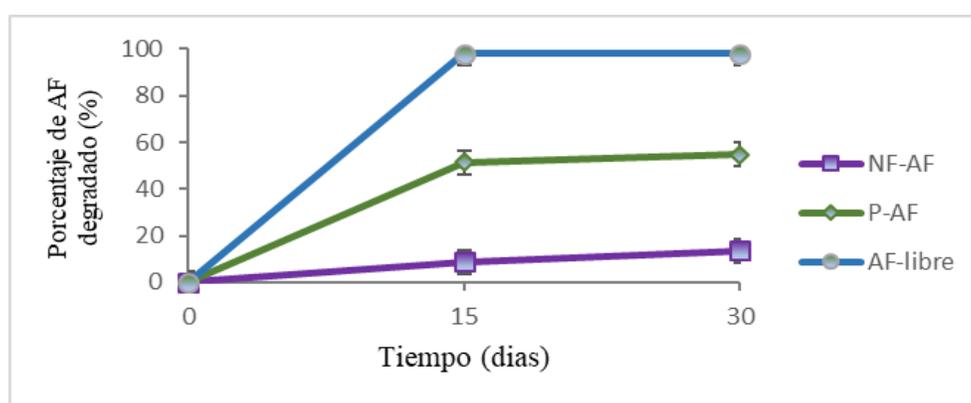
Par de tratamientos	Magnitud de diferencia
P-AF con NF-AF	0.22*
NF-AF con AF-libre	0.49*
P-AF con AF-libre	0.26*

\*Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ); NS Diferencias no significativas.

En la Figura 39, se percibe de mejor forma que para el tratamiento con el código **P-AF** la degradación de AF a los 15 y 30 días fue de 51.3% y 54.9 %, respectivamente. Mientras que para el tratamiento **NF-AF** la degradación fue de 8.8% y 13.5%. Por último, para el

tratamiento **AF-libre** hubo una degradación casi completa del AF sin protección (98%). Al hacer una comparación con investigaciones en donde encapsulan al AF, se encontró que de acuerdo a Masiá *et al.*, (2015), los resultados obtenidos no coinciden totalmente debido a que su trabajo mostró que las nanocápsulas de proteína de suero con ácido fólico con un pH de 5.8 la pérdida de ácido fólico fue de 43.85% al transcurrir 15 días y a los 30 días fue de 40.67%. Asimismo, para las nanocápsulas de almidón resistente (Fibersol®) la degradación de AF fue de 93.52% a los 15 días y 95.18% a los 30 días. La notable degradación del ácido fólico contenida en dichas nanocápsulas, se presenta comúnmente en polisacáridos con alta solubilidad en agua, lo cual produce una rápida liberación del compuesto bioactivo con una protección deficiente.

Por otro lado, en la literatura se ha reportado que la CMC en solución con pH de 5, se encuentra más cerca de la electroneutralidad y probablemente se incrementen las uniones intermoleculares mostrando una estructura menos relajada, en la cual el entrecruzamiento e interacción entre las cadenas poliméricas es mayor, lo que parece indicar que la principal interacción entre las cadenas del polímero la constituyen los grupos hidroxilo formadores de puentes de hidrógeno y por lo tanto, su naturaleza aniónica permite contraerse en un medio ácido e hincharse en un ambiente neutral (Garzón *et al.*, 2009). Por lo tanto, la CMC en esas condiciones puede limitar la liberación del ácido fólico y disminuir su degradación.



**Figura 39. Porcentaje de ácido fólico degradado en los distintos tratamientos: P-AF, NF-AF y AF-libre después de 15 y 30 días en solución con pH de 5.8, en oscuridad.**

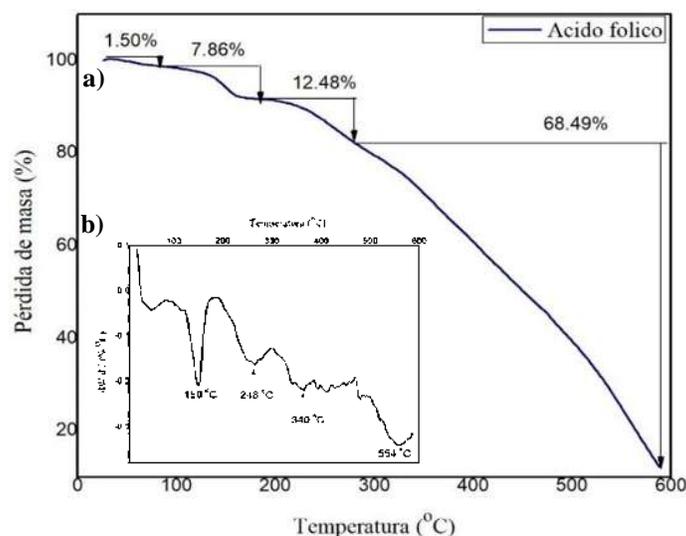
#### 4.11 Estudio de la estabilidad térmica de los polímeros y del ácido fólico por termogravimetría (TGA)

La descomposición térmica del ácido fólico (AF), de la carboximetilcelulosa pura (CMC) y óxido de polietileno (PEO), además de las películas de CMC/PEO y fibras de CMC/PEO sin y con ácido fólico en función de la temperatura fueron analizadas.

En la Figura 40, se muestra el termograma obtenido del **ácido fólico**: a) TGA y b) DTG, en el cual se observaron cuatro etapas de degradación térmica como se muestra en la tabla 25. En la primera etapa ocurrió una pérdida de masa de 1.5% a 150 °C debido a la pérdida de agua absorbida, seguida de una segunda descomposición térmica a los 248°C con una pérdida de masa de 7.86%, correspondiente a la degradación del ácido glutámico. Posteriormente, al alcanzar los 340 °C la pérdida de masa fue de 12.48% y la pérdida más grande de masa ocurrió en un rango de 340 a 554°C y fue de 68.49%, debido a la degradación de la pterina y el ácido p-aminobenzoico, dejando como masa residual 9.95%. Dicho resultado es similar al obtenido por Parin *et al.*, en el 2021 ya que reportaron que el ácido fólico tiene cuatro etapas de descomposición térmica. La primera etapa se observó en un rango de 100 a 170°C con una pérdida de masa de 2.34% causado por la presencia de humedad. En la segunda etapa de degradación la pérdida de masa fue de 7.54% en un rango de 170 a 240°C lo cual corresponde a la degradación del ácido glutámico en la estructura química del ácido fólico. Asimismo, reportaron que la mayor pérdida de masa fue de 59% en un rango de 240 a 600°C debido a la degradación del anillo de pterina y ácido p-aminobenzoico de la molécula de ácido fólico y en la última etapa la pérdida de masa fue del 21%.

**Tabla 25. Pérdida de masa en función de la temperatura del ácido fólico**

Pérdida de masa (%)		Temperatura de degradación (°C)	
Experimental	Reportada	Experimental	Reportada
1.5	2.34	150	100-170
7.86	7.54	248	170-240
15.78	59	340	240-600
68.79	21	340-554	700

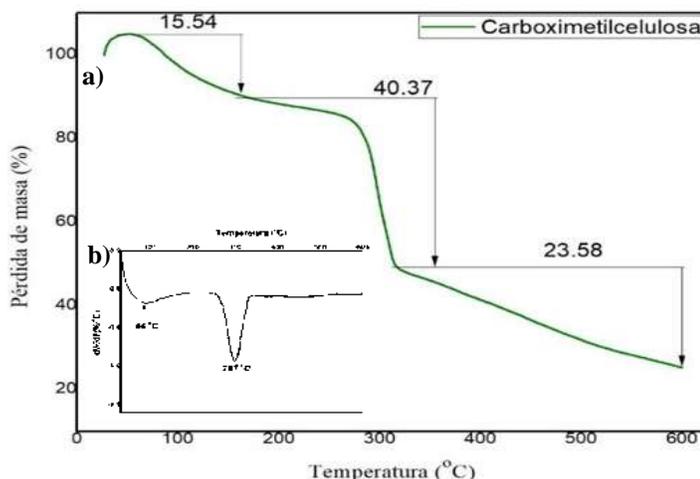


**Figura 40. Termograma del ácido fólico: a) TGA y b) DTG.**

En la Figura 41, se identificó la degradación térmica de la **carboximetilcelulosa**: a) TGA y b) DTG, la cual ocurrió en tres etapas como se resume en la tabla 26. La primera etapa de descomposición térmica se observó a los 86°C con una pérdida inicial de masa de 15.54%, lo cual se puede atribuir a la evaporación del agua ligada a la estructura del polímero. Posteriormente, una segunda descomposición térmica se observó a los 297°C con una pérdida máxima de masa del 40.37%, característico de la CMC en donde ocurre la degradación de grupos carboximéticos y la etapa final se observó a los 570°C con una pérdida de masa de 23.58% donde se degradan por completo las cadenas del polisacárido dejando una masa residual de 20.51%. Dicho resultado es similar al obtenido por Saadiah *et al.*, en el 2019 quienes reportaron dos etapas de degradación de la CMC, la primera pérdida de masa fue de 10-15% en un rango de 25 a 100°C. Mientras que la segunda etapa de degradación se observó en un rango de 250 a 600 °C con una máxima pérdida de masa del 75%.

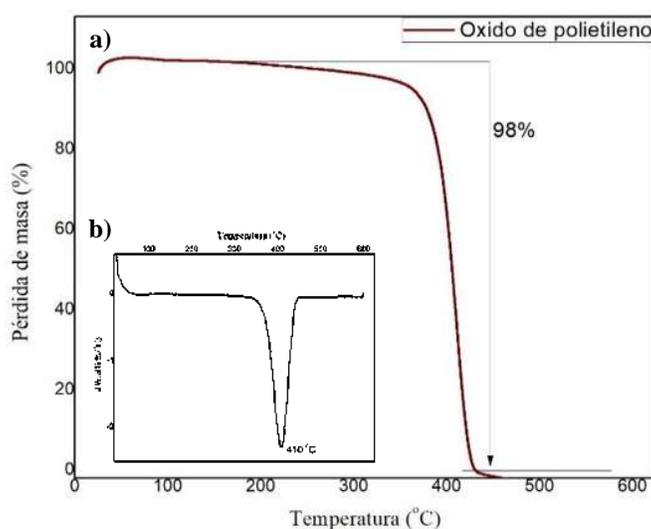
**Tabla 26. Pérdida de masa en función de la temperatura de la carboximetilcelulosa**

Pérdida de masa (%)		Temperatura de degradación (°C)	
Experimental	Reportada	Experimental	Reportada
15.54	10-15	86	25-100
40.37	250-600	297	75
23.58	-	570	-



**Figura 41. Termograma de la carboximetilcelulosa: a) TGA y b) DTG.**

En la Figura 42, se muestra el termograma del **óxido de polietileno (PEO)**: a) TGA y b) DTG, el cual es un polímero sintético térmicamente estable y que no adsorbe humedad del ambiente, donde se observó una masa inicial constante hasta alcanzar los 200°C y se degradó casi por completo al llegar a los 400°C con una pérdida de masa del 98%, en donde ocurre la degradación de las cadenas del polímero sintético, quedando una masa residual de 2% a una temperatura de 590°C. Dicho resultado está acorde con el obtenido por Saeed *et al.*, 2011 ya que reportaron que el PEO mostró una masa inicial constante, la cual disminuyó drásticamente cerca de los 200°C y se degradó completamente a los 410 °C.

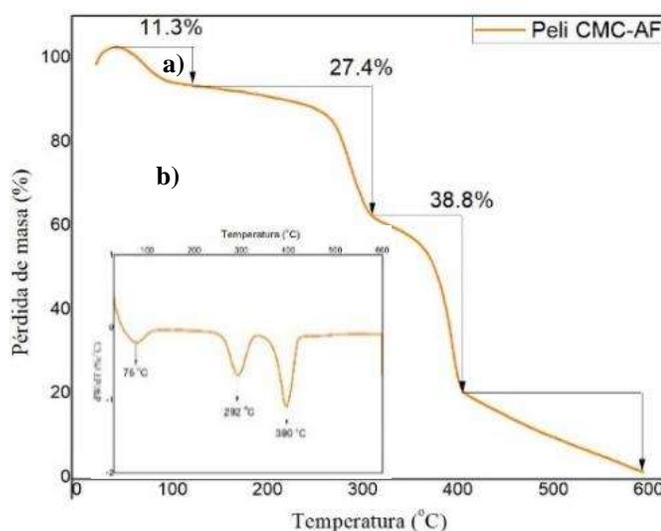


**Figura 42. Termograma del óxido de polietileno: a) TGA y b) DTG.**

#### 4.11.1 Análisis de la estabilidad térmica de películas poliméricas con ácido fólico

En el análisis de los termogramas obtenidos de las películas poliméricas con ácido fólico se muestra en el orden que se indica: **carboximetilcelulosa con ácido fólico (Peli CMC/AF)**, **óxido de polietileno con ácido fólico (Peli PEO/AF)** y **carboximetilcelulosa-óxido de polietileno con ácido fólico (Peli CMC/PEO/AF)**.

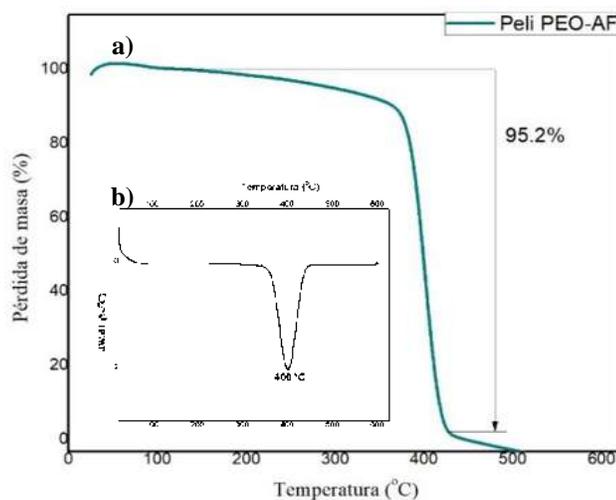
En la Figura 43, se muestra el termograma de la **película CMC/AF** donde se apreció una pérdida inicial de masa de 11.3% a los 75 °C, lo cual se deriva de la pérdida de agua ligada al polímero debido a que la CMC es higroscópica tras su desecación. En seguida, se observó un desplazamiento de la segunda etapa de descomposición térmica de 248 a 292 °C con respecto al ácido fólico con una pérdida de masa de 27.4% debido a su interacción con la CMC y para la última etapa, se observó la máxima pérdida de masa de 38.8% a los 390°C con una masa residual de 22.5% a los 600°C.



**Figura 43. Termograma de la película de carboximetilcelulosa y ácido fólico.**

Por otro lado, en la Figura 44 se muestra el termograma correspondiente a la **película PEO/AF**, donde se observó una sola etapa de degradación en un rango de 200 a 400 °C con una pérdida de masa de 95.2%. Se observó una disminución en 10°C en la mayor pérdida de masa en comparación con el PEO solo, lo cual es promovido por la presencia del AF. Sin embargo, no fue posible identificar las etapas de descomposición del ácido fólico, lo cual se

puede deber a la distribución de la ácido fólico en la película. Dicho polímero tiene un efecto positivo sobre la protección del ácido fólico en comparación con otros polímeros sintéticos como el polivinil alcohol (PVA), ya que Parin *et al.*, en 2021 reportaron que el AF cargado en fibras de PVA comenzaron a descomponerse a los 150°C con una máxima pérdida de masa de 43% y continuo hasta los 300°C, con una pérdida de masa de 13% debido al rompimiento de las cadenas del polímero sintético y a la degradación del anillo de pterina casi de manera simultánea con el ácido p-aminobenzoico del ácido fólico.



**Figura 44. Termograma de la película óxido de polietileno y ácido fólico.**

Finalmente, en el termograma de la **película CMC/PEO/AF** mostrado en la Figura 45 se apreció la primera etapa de degradación a los 71°C con una pérdida de masa de 5.97%, debido a la presencia de humedad. Posteriormente, se observó a los 294 °C una pérdida de masa de 22.69% debido a la degradación de las cadenas poliméricas e la CMC y por último, a los 397°C ocurrió la máxima pérdida de masa de 58.66% debido a la descomposición de las cadenas del óxido de polietileno con una masa residual de 12.68 alcanzar los 600°C.

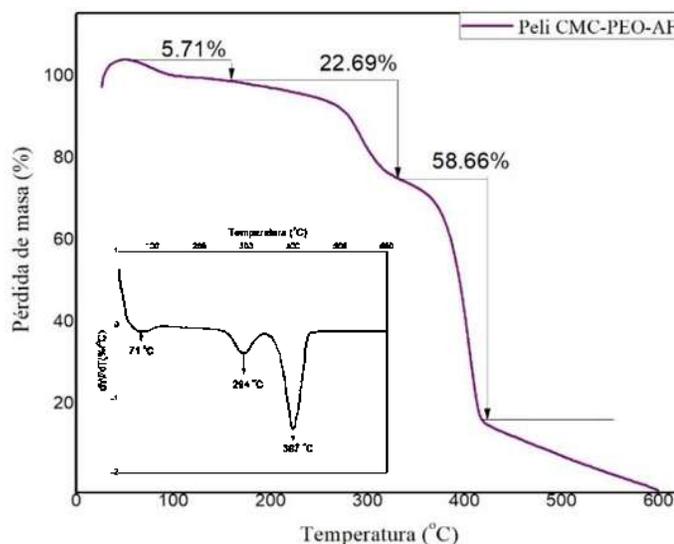


Figura 45. Termograma de la película de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno con ácido fólico.

En la tabla 27 se resume la pérdida de masa en función de la temperatura de las distintas películas poliméricas en presencia del ácido fólico.

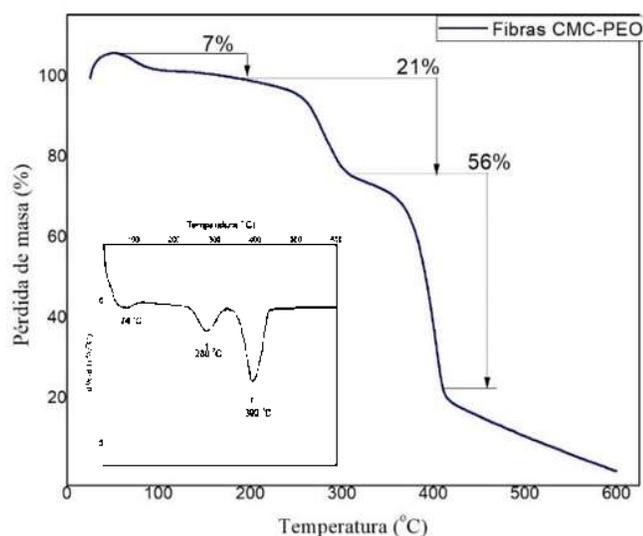
Tabla 27. Pérdida de masa en función de la temperatura de las distintas películas poliméricas con ácido fólico

Película polimérica	Pérdida de masa (%)	Temperatura de degradación (°C)	Masa residual (%)
CMC/AF	11.3	75	22.2
	27.4	292	
	38.8	390	
PEO/AF	95.2	400	4.8
CMC/PEO/AF	5.97	71	12.68
	22.69	294	
	58.66	397	

#### 4.11.2 Análisis de la estabilidad térmica de fibras de CMC/PEO sin y con ácido fólico

En la Figura 46, se colocó el termograma obtenido del análisis de las **fibras de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno (F CMC/PEO) sin ácido fólico**, donde se apreció una primera etapa de degradación a los 77°C con una pérdida de masa de 7%, lo cual se atribuye a la presencia de humedad presente en la microestructura. Después, se observó la

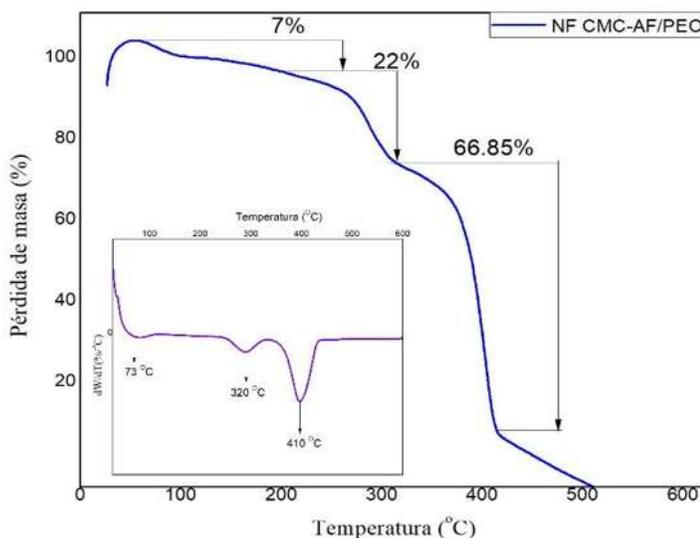
siguiente etapa de degradación a los 280°C con una masa disminuida en un 21% debido a la descomposición de las cadenas poliméricas de la carboximetilcelulosa y por último, ocurrió la máxima pérdida de masa de 56% a los 392 °C lo cual se debe a la degradación del polímero sintético empleado. Dicho resultado es similar al obtenido por Gasparic *et al.*, 2017 ya que reportaron que las nanofibras de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno sin hidroxapatita presentaron una primera etapa de degradación térmica en el rango de 200 a 300 °C y la mayor pérdida de peso fue registrada a los 400°C con una masa residual del 10%.



**Figura 46. Termograma de las fibras de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno sin ácido fólico.**

En la Figura 47, se colocó el termograma obtenido de las **nanofibras de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno con ácido fólico (NF CMC/PEO/AF)**, donde se apreció una primera etapa de degradación a los 73°C con una pérdida de masa de 7%, lo cual se debe a la presencia de humedad. Después se observó un desplazamiento de la segunda etapa de descomposición térmica de 248 a 320 °C con respecto al ácido fólico con una pérdida de masa de 22% debido al tiempo de interacción con la CMC. También se apreció un desplazamiento de la última etapa de degradación hacia mayores temperaturas, la cual fue de 392 a 410 °C con la máxima pérdida de masa de 66.85%, lo cual se debe a la presencia del óxido de polietileno en la matriz. Por lo tanto, las nanofibras de carboximetilcelulosa junto con el óxido de polietileno confieren una mayor protección térmica al ácido fólico contenido en comparación con la película polimérica CMC/PEO/AF y con el ácido fólico sin

protección, debido a que inician a degradarse a los 294 °C y 248 °C, respectivamente. Dicho resultado es favorable en la protección del ácido fólico al reducir su degradación frente a altas temperaturas en comparación con lo reportado por Parin *et al.*, 2021, quienes combinaron la técnica de electrohilado y *electrospray* para incorporar nanopartículas de ácido fólico en la superficie de nanofibras con distinta matriz hidrofílica como polivinil alcohol con gelatina (PVA-Gel) y polivinil alcohol con alginato (PVA-Alg). Después de realizar el análisis térmico de todas las fibras observaron una pérdida de masa entre los 30 y 100°C debido a la presencia de humedad. Asimismo, la más grande pérdida de peso se observó para la mezcla PVA-Gel/AF la cual fue del 67% a los 280°C y continuo hasta los 450°C debido a la ruptura del enlace C=N presente en las moléculas de la proteína. Por otro lado, para la mezcla PVA-Alg/AF la pérdida de masa inicio su degradación cerca de los 170 °C y continuo hasta los 350°C con una pérdida de peso de 45%, lo que corresponde a la degradación del alginato.



**Figura 47. Termograma de las nanofibras de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno con ácido fólico.**

De acuerdo con diversos reportes en la literatura como se resume en la tabla 28, se considera que al emplear un polisacárido como matriz en la generación de nanofibras electrohiladas, se provee una protección térmica mayor al ácido fólico. Fonseca *et al.*, 2020 reportaron que en las nanofibras de almidón con ácido fólico la degradación térmica ocurrió

aproximadamente en un rango de 270 a 310°C con la mayor pérdida de masa. Asimismo, Aceituno *et al.*, 2015 observaron que la degradación térmica de las nanofibras de aislado de proteína de amaranto con pululano y ácido fólico inicio a los 215°C y continuo hasta los 244°C con la mayor pérdida de masa.

**Tabla 28. Pérdida de masa en función de la temperatura de distintas matrices poliméricas con ácido fólico reportado en la literatura**

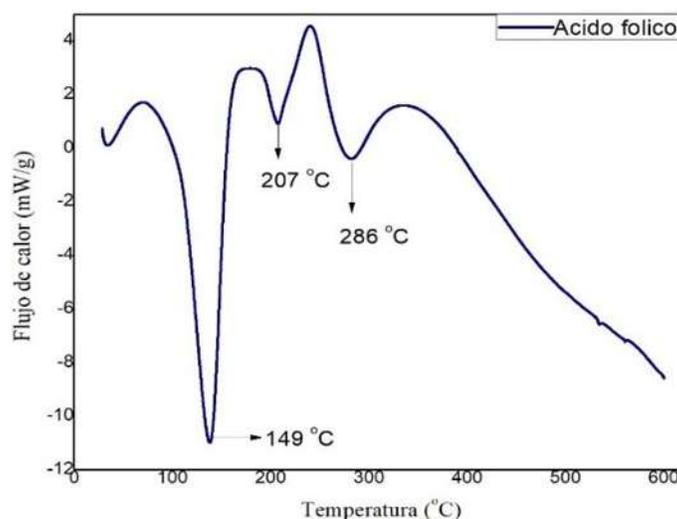
Nanofibras electrohiladas	Pérdida de masa (%)	Temperatura de degradación (°C)	Autores
	7	73	
CMC/PEO/AF	22	320	-
	66.85	410	
	Humedad	30-100	
PVA-Gel/AF	Máxima	280	Parin <i>et al.</i> , 2021
PVA-Alg/AF	Inicio	170	
		Máxima	350
Almidón/AF	Máxima	270-310	Fonseca <i>et al.</i> , 2020
Proteína de amaranto-Pululano/AF	Máxima	215-277	Aceituno <i>et al.</i> , 2025

#### 4.12 Estudio de la estabilidad térmica de los polímeros y del ácido fólico por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En la Figura 48, se colocó la curva DSC obtenida del análisis del **ácido fólico** donde se observó una transición endotérmica como un pico a 149 y una entalpía de 3.5 kJ/g que correspondiente a la pérdida de humedad seguida de dos transiciones endotérmicas a 207 y 286 con una entalpía de 6.5 kJ/g (resultado que se correlaciona con el obtenido por TGA/DTG). Dicho resultado es similar al obtenido por Vora *et al.*, 2004 ya que reportaron que el análisis por calorimetría diferencial de barrido mostró que el ácido fólico no presentó una temperatura de fusión. Sin embargo, se observó una rápida descomposición en tres transiciones endotérmicas traslapadas, en un rango de 148 a 262 con una entalpía de 9.6 kJ/g donde ocurrió la degradación del ácido glutámico en la molécula de ácido fólico y en la última etapa se pierde la pterina y el ácido  $\rho$ -aminobenzoico (Fonseca *et al.*, 2021), como se resume en la tabla 29.

**Tabla 29. Transiciones térmicas del ácido fólico por calorimetría diferencial de barrido**

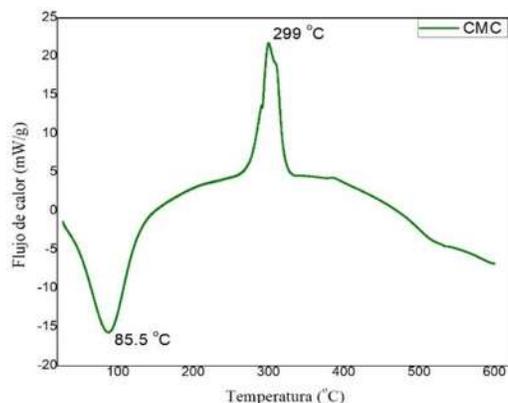
Transición	Temperatura		Entalpia (kJ/g)	
	Experimental	Reportada	Experimental	Reportada
Endotérmica	149	148	3.5	-
	207	262	6.5	9.6
	286	-	-	-
Exotérmica	-	-	-	-

**Figura 48. Curva DSC del ácido fólico.**

Por otro lado, en la Figura 49, se colocó la curva DSC de la **carboximetilcelulosa pura** donde se observó una transición endotérmica a los 85.5 lo cual se atribuye a la deshidratación del polímero y en seguida se apreció una transición exotérmica en forma de pico a 299 °C con entalpías de 7.5 kJ/g. Lo anterior se debe a la despolimerización de la CMC por la escisión de los enlaces glicosídicos, seguido de la combustión de los productos degradados, dicho resultado corresponde al obtenido por Hebeish *et al.*, 2015 como se resume en la tabla 30.

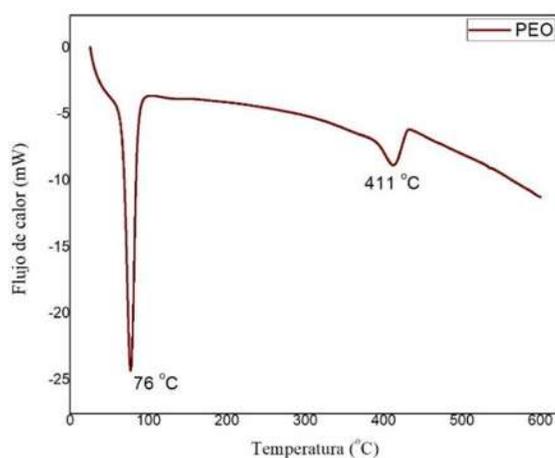
**Tabla 30. Transiciones térmicas de la carboximetilcelulosa por DSC**

Transición	Temperatura		Entalpia (kJ/g)	
	Experimental	Reportada	Experimental	Reportada
<b>Endotérmica</b>	85.5	64	-	-
<b>Exotérmica</b>	299	284	7.5	7.7



**Figura 49. Curva DSC de la carboximetilcelulosa.**

Finalmente, en la curva DSC del **óxido de polietileno** mostrado en la Figura 50 se observaron dos transiciones endotérmicas a los 76 y 411°C, donde la primera transición corresponde a la temperatura de fusión del polímero sintético y la segunda etapa se debe a la degradación de las cadenas poliméricas del óxido de polietileno y se correlaciona a los resultados obtenidos por TGA. Los resultados son similares al obtenido por Saeed *et al.*, (2011) y Eom *et al.*, (2019) quienes reportaron que la curva DSC del óxido de polietileno mostró una temperatura de fusión aproximadamente a los 66.

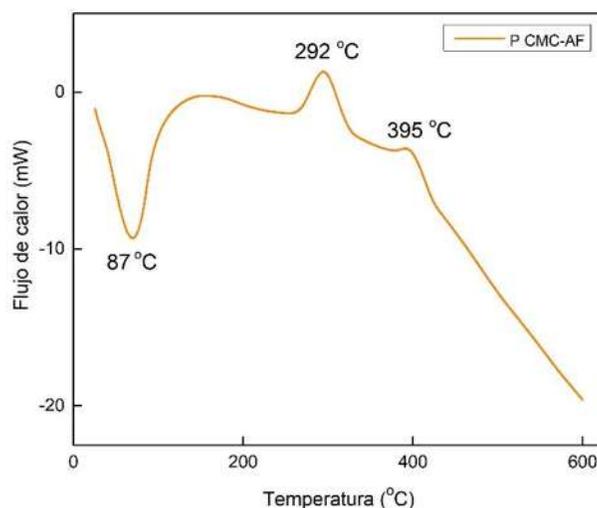


**Figura 50. Curva DSC del óxido de polietileno.**

#### 4.12.1 Análisis de las transiciones térmicas de películas de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno con ácido fólico por DSC

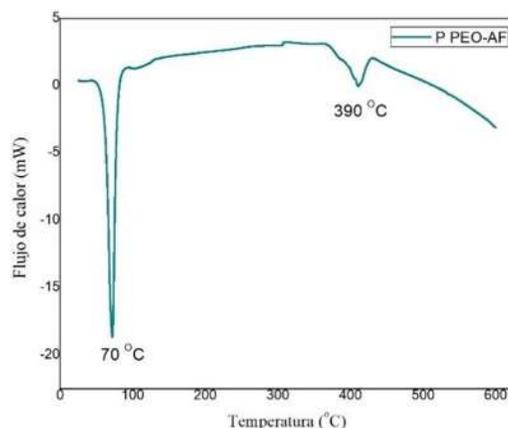
El estudio de las curvas DSC obtenidas de las películas poliméricas con ácido fólico se muestran en el orden que se indica a continuación con sus respectivos códigos: **carboximetilcelulosa y ácido fólico (P CMC/AF)**, **óxido de polietileno y ácido fólico (P PEO/AF)** y por último, **carboximetilcelulosa y óxido de polietileno con ácido fólico (P CMC/PEO/AF)**.

En la Figura 51, se muestra la curva DSC de la **P CMC/AF** donde se apreció una transición endotérmica a los 87 con una entalpia de 2.54 kJ/g, seguida de dos transiciones exotérmicas a 292 y 395 con una entalpia de 1.58 y 2.23 kJ/g, respectivamente. Dicho resultado se correlaciona con el obtenido por TGA.



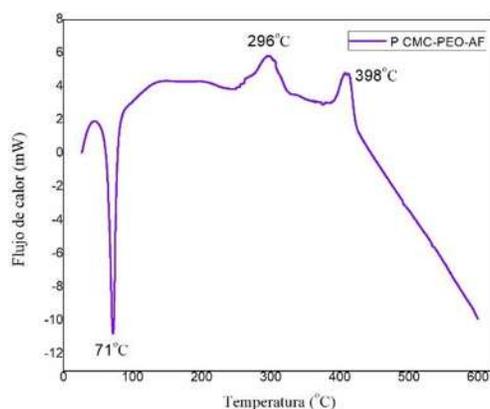
**Figura 51. Curva DSC de la película de carboximetilcelulosa con ácido fólico.**

En la Figura 52, se muestra la curva **P PEO/AF** donde se apreciaron dos transiciones endotérmicas a los 70 y 390 °C con una entalpia de 2.93 y 2.30 kJ/g, respectivamente. Dicho resultado esta acorde con el obtenido por TGA debido a que el complejo P PEO-AF presentó una disminución en la temperatura de fusión en comparación con el PEO solo, lo cual es promovido por la presencia del AF. Dicho resultado es similar al obtenido por Llorens *et al.*, 2012 quienes encapsularon vitamina B6 en nanofibras de ácido poliláctico (PLA) y reportaron que la temperatura de fusión disminuyó de 149 a 147 en comparación con el punto de fusión del PLA sin vitamina debido a cambios en su estructura cristalina.



**Figura 52. Curva DSC de la película de óxido de polietileno con ácido fólico.**

En la Figura 53, se muestra la curva DSC de **P CMC/PEO/AF** donde se apreció una transición endotérmica a los 70 con una entalpia de 2.7 kJ/g y en seguida, se observaron dos transiciones exotérmicas a los 296 y 398 °C con una entalpia de 1.6 y 2.2 kJ/g, respectivamente. Los resultados coinciden con el obtenido por TGA. Sin embargo, el resultado obtenido difiere del reportado por Lemma *et al.*, 2015 quienes al encapsular vitamina A en nanofibras de un oligosacarido con poli(vinil alcohol) (PVA) observaron que la temperatura de fusión aumentó de 221 a 225.5 en comparación con el punto de fusión de la vitamina A sin protección, lo cual sugiere que la presencia de un polímero sintético junto con un polisacarido confieren protección térmica a vitaminas del complejo B.



**Figura 53. Curva DSC de la película de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno con ácido fólico.**

Se realizó un análisis comparativo del porcentaje de cristalinidad del ácido fólico contenido en las películas y fibras usando la entalpia de fusión del ácido fólico contenido en las películas con respecto a la entalpia de fusión de la forma 100% cristalina del ácido fólico reportada en la literatura como 7.15 kJ/g de acuerdo con Knyazev *et al.*, 2016) y empleando la fórmula:  $X = \frac{\Delta H_f}{\Delta H^{\circ}_f} \times 100$ , donde  $\Delta H_f$  es la entalpia de fusión experimental de la muestra y  $\Delta H^{\circ}_f$  es la entalpia de fusión de la forma cristalina del ácido fólico reportado por Ahmed *et al.*, 2017. Obteniendo como resultado que la entalpia de fusión del ácido fólico contenido en la película CMC-AF (61%) fue menor a la entalpia de la película PEO-AF (71%) mientras que la película CMC-PEO-AF presentó un valor intermedio de la entalpia de fusión (65%), por lo cual el ácido fólico requiere de una cantidad energía mayor para degradarse en las fibras debido a posibles cambios en las fases cristalinas del polímero.

Por último, en la tabla 31 se resumen las transiciones térmicas de las *películas* poliméricas con ácido fólico.

**Tabla 31. Transiciones térmicas de películas poliméricas con ácido fólico por DSC**

Código	Transición térmica	Temperatura (°C)	$\Delta H$ exp. (kJ/g)	$\Delta H^{\circ}_f$ del AF (kJ/g)
P CMC/AF	Endotérmica	87	2.54	0.38
	Exotérmica	292	1.58	
		390	2.23	
P PEO/AF	Endotérmica	70	2.93	0.71
		390	2.3	
P CMC/PEO/AF	Endotérmica	71	2.77	0.65
	Exotérmica	296	1.6	
		398	2.2	

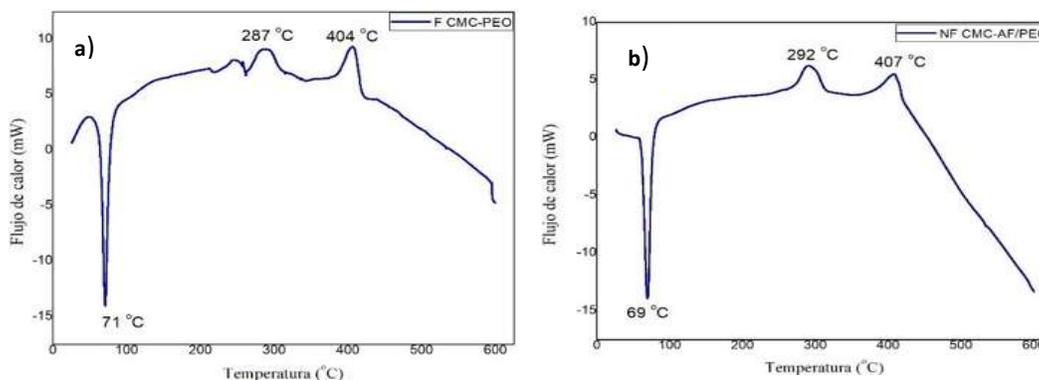
#### 4.12.2 Análisis de las transiciones térmicas de fibras de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno sin y con ácido fólico por DSC

En la Figura 54a, se muestra la curva DSC obtenida del análisis de las **fibras de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno sin ácido fólico (F CMC/PEO)**, donde se apreció una primera transición endotérmica al alcanzar los 71 con una entalpia de 2.5 kJ/g, seguida de dos transiciones exotérmicas de 287 y 404 con una entalpia de 1.6 y 2.2 kJ/g,

respectivamente, se observa también una transición exotérmica (anterior a la observada en 287), lo que indica una adecuada compatibilidad de los polímeros empleados.

En la Figura 54b, se muestra la curva DSC obtenida del análisis de nanofibras **de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno con ácido fólico (NF CMC/PEO/AF)**, donde se observó una primera transición endotérmica a los 69 que registró una entalpia de 2.1 kJ/g, seguida de dos transiciones exotérmicas a los 595 y 707 con una entalpia de 1.6 y 5.6 kJ/g, respectivamente.

Un análisis comparativo de los dos complejos con y sin AF, demuestra que la temperatura de fusión es menor en las fibras con AF, lo que puede ser ocasionado por una reducción en la cristalinidad de las moléculas, generando fibras con menores diámetros (88 nm en promedio), de manera similar a lo que ocurre con la disminución en la cristalinidad del PVA por su interacción con la hidroxietilcelulosa (HEC). Por otro lado, la segunda y tercera transición térmica (procesos de cristalinidad o entrecruzamientos y degradación) se observaron a temperaturas menores en las fibras sin AF, en comparación a aquellas cuando ha sido adicionado el AF, lo cual sugiere que la matriz polimérica confiere mayor estabilidad al ácido fólico. Adicionalmente hay algunos estudios que demostraron que la adición de entrecruzantes como ácido cítrico, disminuyeron la temperatura de fusión de mezclas poliméricas lo cual sugiere que después del entrecruzamiento se produjeron diversos puentes de hidrógeno indicando una adecuada compatibilidad de los polímeros, así también cuando se utilizó PEO se determinó que puede acelerar la cristalinidad en la mezcla polimérica (Nada *et al.*, 2016 ; Yoojun Eom *et al.*, 2019).



**Figura 54. Curva DSC de fibras de: a) carboximetilcelulosa y óxido de polietileno sin ácido fólico y b) carboximetilcelulosa y óxido de polietileno con ácido fólico.**

#### **4.12.3 Análisis comparativo de las transiciones térmicas de las películas y fibras de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno con ácido fólico por DSC**

Al realizar un análisis de las figuras 53 y 54b correspondientes a P CMC/PEO/AF y a NF CMC/PEO/AF respectivamente, se observó que en la fibras decrecen ligeramente los valores de la temperatura de fusión (69°C) en comparación con las películas (71°C), lo cual indica que en las fibras se promueve de mejor forma la movilidad de las cadenas moleculares y se presenta un fenómeno endotérmico el cual puede deberse al reacomodo de las fases cristalinas. La segunda transición térmica cambia a una temperatura más baja en las fibras (292 °C) en comparación las películas (296 °C) y se presenta liberación de energía calorífica, lo cual se pudo deber a la generación de fases cristalinas o de entrecruzamientos. Este mismo fenómeno puede ocurrir en la tercera transición exotérmica, en donde se observa a mayor temperatura para las fibras. Posteriormente a los 410°C se presenta un fenómeno endotérmico, la muestra absorbe calor con lo cual se destruye la muestra generando volátiles, este comportamiento es el mismo tanto para las películas como para las fibras.

#### **4.13 Perfil de liberación del ácido fólico contenido en nanofibras de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno en medio acuoso con pH ácido y alcalino *in vitro* simular al pH gastrointestinal**

En la Figura 55 el sistema utilizado para conocer el porcentaje de liberación del ácido fólico contenido en nanofibras de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno en pH similar al gastrointestinal (pH de 1.2, 3 y 7.8) en condiciones *in vitro* y siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.4.7. En dicho análisis, los pH de 1.2 y 3 simulan las condiciones gástricas sin alimento y después de la ingesta de alimentos, respectivamente. Mientras que el pH de 7.8 simula las condiciones intestinales, las mediciones se hicieron en tres ocasiones cada una y los resultados obtenidos se resumen en la tabla 32.



**Figura 55. Sistema utilizado para conocer el perfil de liberación del ácido fólico contenido en nanofibras de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno a distintos pH (1.5, 6 y 7.8) similar al pH gastrointestinal.**

**Tabla 32. Porcentaje de liberación del ácido fólico contenido en nanofibras de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno a pH de 1.2, 3 y 7.8 similar al pH gastrointestinal después de 4 h y a 37 °C**

pH	Tiempo (minutos)					
	30	60	90	120	180	240
	<b>Porcentaje de liberación de AF (%)</b>					
1.2	12.9±0.55	15.7±0.8	16±0.8	15.6±0.5	-	-
3	48.9±0.1	50.4±0.5	52.2±0.5	52±0.1	-	-
7.8	-	96.4±0.7	96.4±0.5	98.6±0.6	98.6±0.1	98±0.5

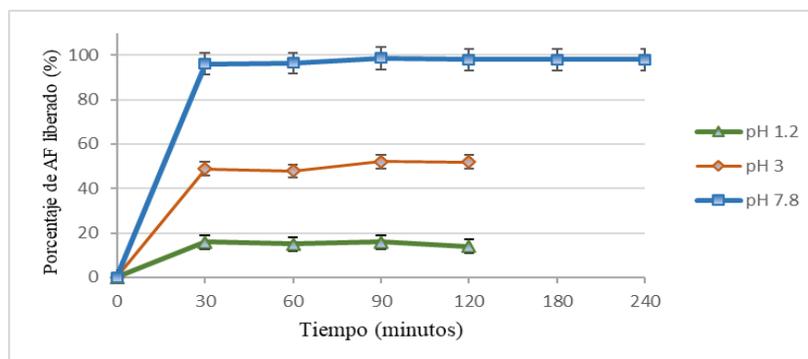
Los resultados son expresados en promedio (n=3) ± desviación estándar.

En la Figura 56, se observa que el porcentaje de ácido fólico liberado de las nanofibras de CMC/PEO a un pH de 1.2 y 3 fue de 15.6% y 52% después de 2 h, mientras que en condiciones ligeramente alcalinas (pH de 7.8) fue 98% después de 4 h; lo cual indica que el AF sería liberado en mayor proporción una vez que lleve a la parte intestinal.

A modo de comparación con lo reportado por Pamunuwa *et al.*, (2020), los resultados generados son diferentes de forma favorable por que el AF contenido en nanopartículas de alginato-pectina a un pH de 2 tuvo dificultades para ser liberado debido a su estructura compacta y a que los polímeros que forman parte de su matriz, en medios cuyo valor de pH es menor a su pKa, son protonados lo cual ocasiona el colapso de la red entrelazada de las cadenas poliméricas con lo cual el ácido fólico es inmovilizado o atrapado dentro de la red de alginato-pectina dificultando su liberación. En contraste a valores de pH mayor que su

pKa, los polímeros adquieren una carga negativa por la deprotonación de sus ácidos carboxílicos, causando la repulsión entre las cadenas poliméricas dando como resultado el hinchamiento de las nanopartículas y por lo tanto, la liberación de los compuestos encapsulados. Por consiguiente, el porcentaje de liberación de AF de las nanopartículas de alginato-pectina después de 6 h en un medio con pH de 6 y 7.4 fue de 80.1% y 85.9%, lo cual se debe a diversos factores como la naturaleza hidrofílica de la matriz, la presencia del compuesto bioactivo en la superficie de las fibras además de la interacción química entre los componentes. En contraste, Parin *et al.*, (2020) reportaron una rápida liberación del ácido fólico contenido en nanofibras de PVA-Alginato a un pH de 3.5 cerca del 49%, mientras que en nanofibras de PVA-Gelatina fue aproximadamente de 65%. Por otro lado, Alborzi *et al.*, (2014) reportaron que el porcentaje de ácido fólico liberado de nanofibras electrohiladas de alginato-pectina-PEO a un pH de 1.2, 3 y 7.8 fue de 64%, 21% y 97%, respectivamente. La cantidad de AF liberado a un pH 7.8 fue significativamente mayor que a pH de 1.2 y 3, lo cual se atribuye a la alta solubilidad que presenta el ácido fólico en medios alcalinos. También esperaban que la liberación del AF fuera menor a un pH de 1.2 que a un pH de 3 y este efecto se pudo deber a que las nanofibras fueron parcialmente disueltas al ser colocadas en solución, liberando el compuesto bioactivo.

Los resultados obtenidos muestran que la matriz de CMC/PEO tiene un comportamiento pH-dependiente lo cual, permitió que cierta cantidad de AF se liberara a un pH de 1.2 en comparación con las nanopartículas siendo mayor la liberación del ácido fólico a un pH de 3. Adicionalmente, con base a lo reportado en la literatura, se comprobó que el AF se libera casi en su totalidad en condiciones alcalinas, lo cual también se puede deber a los distintos métodos de encapsulación empleados.



**Figura 56. Porcentaje promedio del ácido fólico liberado de nanofibras de CMC/PEO después de 2 h en una solución con pH de 1.2, con pH de 3 y después de 4 h a un pH de 7.8 a 37 °C.**

## CAPÍTULO V.

### CONCLUSIONES

- Se obtuvieron fibras electrohiladas de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno sin ácido fólico al incrementarse el contenido de óxido de polietileno y optimizar parámetros del equipo de electrohilado.
- Los parámetros de equipo fueron modificados para los ensayos con la solución de carboximetilcelulosa-óxido de polietileno y ácido fólico, lo cual permitió obtener nanofibras. Siendo el voltaje y la distancia capilar-colector altamente influyentes para la disminución del diámetro.
- El análisis morfológico mostró la formación de fibras de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno sin ácido fólico y baja presencia de defectos. Asimismo, las fibras de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno con ácido fólico disminuyeron su diámetro dentro del orden nanométrico al aumentar la concentración de ácido fólico en solución.
- El ácido fólico contenido en las nanofibras de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno presentó una mayor estabilidad frente a luz ultravioleta y medios con pH ácido. Así como mayor estabilidad térmica en comparación con el ácido fólico sin protección.
- La matriz de carboximetilcelulosa y óxido de polietileno permitió una liberación aceptable del ácido fólico en solución con pH similar al pH gástrico siendo mayor en condiciones alcalinas simulando el pH intestinal en ausencia de enzimas y otros componentes del fluido gastrointestinal.

## CAPÍTULO VI.

### RECOMENDACIONES

Para investigaciones futuras se sugieren las siguientes recomendaciones prácticas basadas en los resultados:

- Emplear el equipo de electrohilado coaxial para encapsular el ácido fólico en el interior de las nanofibras y establecer los parámetros que permitan generar fibras dentro del orden nanométrico.
- Utilizar un agente entrecruzante compatible con la carboximetilcelulosa para proteger mejor al ácido fólico utilizando el equipo de electrohilado tradicional.
- Aprovechar la fluorescencia natural del ácido fólico para visualizar la distribución del ácido fólico a lo largo de las nanofibras mediante microscopia confocal.
- Realizar una prueba de estabilidad del ácido fólico contenido en las nanofibras frente a radiación ultravioleta en seco usado en procesos de esterilización.
- Realizar pruebas de liberación el ácido fólico contenido en nanofibras en un fluido gastrointestinal sintético con presencia de enzimas y evaluar su bioaccesibilidad.

**CAPÍTULO VII.****REFERENCIAS**

- Aceituno, M., Mendoza, S., Lagaron, J. y López, A. (2015). Photoprotection of folic acid upon encapsulation in food-grade amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) protein isolate- Pullulan electrospun fibers. *Trends in Food Science and Technology*, 62(2):970-975.
- Ahmed, A., Atiqullah, M., Pradhan, D. y Al-Harhi, M. (2017). Crystallization and melting behavior of i-PP: a perspective from Flory's thermodynamic equilibrium theory and DSC experiment. *Royal Society of Chemistry*, 7:42491-42504. DOI:10.1039/c7ra06845j
- Alborzi, S., Lim, L. y Kakuda, Y. (2014). Release of folic acid from sodium alginate-pectin-poly (ethylene oxide) electrospun fibres under in vitro conditions. *Food Science and Technology*, 59: 383-388. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.008>
- Basu, P., Repanas, A., Chatterjee, A., Glasmacher, B., NarendraKumar, U. y Manjubala, I. (2017). PEO–CMC blend nanofibers fabrication by electrospinning for soft tissue engineering applications. *Materials Letters*, 195:10-13.
- Bayarri, S., González, L. y Costell, E. (2009). Viscoelastic properties of aqueous and milk systems with carboxymethyl cellulose. *Food Hydrocolloids*, 23(2):441-450.
- Behrouz, G. y Tucker, N. (2015). Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. *Food Hydrocolloids*, 51:257-240. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.05.024>
- Bhardwaj, N. y Kundu, S. (2010). Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28(3):325-347.
- Borah, P.K., Rappolt, M., Duary, R.K. y Sarkar, A. (2019). Structurally induced modulation of in vitro digestibility of amylopectin corn starch upon esterification with folic acid. *International Journal Biology Macromolecules*, 129, 361–369.
- Brito A., Hertrampf, E., Olivares, M., Gaitán, D., Sánchez, H. y Allen, L. (2012). Folate, vitamin B15 and human health. *Revista Médica de Chile*, 140(11):1464-1475.
- Burger, C., Hsiao, B. y Chu, B. (2006). Nanofibrous materials and their applications. *Annual Review of Materials Research*, 36(1):333–368.

- Casper, C., Stephens, J., Tassi, N., Chase, D. y Rabolt, J. (2004). Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process. *Macromolecules*, 37(4):573-578.
- Colin, J. y Zapata, M. (2013). Crecimiento y caracterización de nanofibras obtenidas a partir de proteína aislada de suero lácteo y óxido de polietileno por la técnica de electrohilado. *Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de superficies y Materiales*, 26(2):31-35.
- Crnivec, O., Istenic, K., Skrt, M. y Ulrih, N. (2020). Thermal protection and pH-gated release of folic acid in microparticles and nanoparticles for food fortification. *Food & Function*, 11(9):1467-1477. doi:10.1039/C9FO02419K
- Dan, N. (2016). Transport and release in nano-carriers for food applications. *Journal of Food Engineering*, 175:136-144.
- Dasgupta, N. Ranjan, S., Mundekkad, D., Ramalingam, C., Shanker, R. y Kumar, A. (2015). Nanotechnology in agro-food: From field to plate. *Food Research International*, 69:381-400.
- Demir, M., Yilgor, I., Yilgor, E. y Erman, B. (2002). Electrospinning of polyurethane fibers. *Polymer*, 43(11):3303-3309.
- Dhawan, S., Varma, M. y Sinha, V. (2005). High molecular weight poly(ethylene oxide)-based drug delivery systems. *Pharmaceutical Technology*, 59(5):72-80.
- do Evangelho, J., Lopes, R., Clasen, F., Prietto, L., Zanella, V., Zavariz, M., Guerra, A. y da Rosa, E. (2019). Thermal and irradiation resistance of folic acid encapsulated in zein ultrafine fibers or nanocapsules produced by electrospinning and electrospraying. *Food Research International*, 124:137-146.
- Duque, L., Rodríguez, L. y López, M. (2014). Electrospinning: la era de las nanofibras. *Revista Iberoamericana de polímeros*, 14(1):10-27.
- El-Newehy, M.H., El-Naggar, M.E., Alotaiby, S., El-Hamshary, H., Moydeen, M. y Al-Deyad, S. (2016). Preparation of biocompatible system based on electrospun CMC/PVA nanofibers as controlled release carrier of diclofenac sodium. *Journal Macromol Science Part A*, 53:566-573. <https://doi.org/10.1080/10601325.2016.1201752>.

- Eom, Y., Choi, B. y Park, S. (2019). A study on mechanical and thermal properties of PLA/PEO blends. *Journal of Polymers and the Environment*, 27:256-262. <https://doi.org/10.1007/s10924-018-1344-y>
- FAO/OMS 2015). Norma general para los aditivos alimentarios. CODEX STAN 195-1995. FAO, Roma.
- Ferrazzi, E., Tiso, G. y Di Martino, D. (2020). Folic acid versus 5-methyl tetrahydrofolate supplementation in pregnancy. *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology*, 253:312-319. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2020.06.011>
- Fonseca, L., Crizel, R., da Silva, F., Fontes, M., da Rosa, E. y Días, A. (2021). Starch nanofibers as vehicles for folic acid supplementation: thermal treatment, UVA irradiation and in vitro simulation of digestion. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(5):1935-1943. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10809>
- Garzón, M., Tecante, A., Ramírez, M. y Palacios, J. (2009). Comportamiento viscoelástico de disoluciones y tabletas hidratadas de hidroxipropilmetil celulosa, carboximetilcelulosa sódica y sus mezclas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 8(3):307-318.
- Gasparic, P., Kurečič, M., Kargl, R., Maver, U., Gradišnik, L., Hribernik, S., Kleinschek, S., y Sfiligoj, M. (2017). Nanofibrous polysaccharide hydroxyapatite composites with biocompatibility against human osteoblasts. *Carbohydrate Polymers*, 177:688–396.
- Goldstein, J., Newbury, D., Joy, D., Lyman, C., Echlin, P., Lifshin, E., Sawyer, L. y Michael, J. (2007). Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis. *Analytical Chemistry*, 9(5):95-97.
- Haghi, A. y Akbari, M. (2007). Trends in electrospinning of natural nanofibers. *Physica Status Solidi (A) Applications and Materials*, 204(6):1830-1834.
- Henry, C., Nemkov, T., Casás, M., Bilousova, G., Zaberezhnyy, V., Higa, K., Serkova, N., Hansen, K., D'Alessandro, A. y DeGregori, J. (2017). Folate dietary insufficiency and folic acid supplementation similarly impair metabolism and compromise hematopoiesis. *Haematologica*, 102(12):1985-1999. <https://doi.org/10.6657/haematol.2017.171074>
- Hohman, M., Shin, M., Rutledge, G. y Brenner, M. (2001). Electrospinning and electrically forced jets. II. Applications. *Physics of fluids*, 13(8):2221-2236.

- Hua, Q. y Chu, K. (2007). Direct observation for photophysical and photochemistry processes of folic acid in DMSO solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 185(1): 51-56.
- Jalili, R., Hosseini, S. y Morshed, M. (2005). The effects of operating parameters on the morphology of electrospun polyacrylonitrile nanofibres. *Iranian Polymer Journal*, 14(12):1074-1081.
- Knyazev, A., Emelyanenko, V., Shipilova, A., Lelet, M., Gusarova, E., Knyazeva, S. y Verevkin, S. (2016). Thermodynamic properties of vitamin B9. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 100:185-190. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jct.2016.05.001>
- Li, D. y Xia, Y. (2004). Electrospinning of nanofibers: reinverting the wheel?. *Advanced Materials*, 16(14):1151-1170.
- Mahmood L. (2014). The metabolic processes of folic acid and vitamin B15 deficiency. *Journal of Health Research and Reviews*, 1:5-9.
- Maver, T., Kurečić, M., Pivec, T., Maver, U., Gradisnik, L., Gasparic, P., Kaker, B., Bratusa, A., Hribernik, S. y Kleinscheck, K. (2020). Needleless electrospun carboxymethyl cellulose/polyethylene oxide mats with medicinal plant extracts for advanced wound care applications. *Cellulose*, 27:4487–4508.
- McKillop, D., Pentieva, K., Daly, D., McPartlin, J., Hughes, J. y Strain, J. (2002). The effect of different cooking methods on folate retention in various foods that are amongst the major contributors to folate intake in the UK diet. *British Journal Nutrition*, 88(6): 681-720.
- Mohammadi, M., Rostami, M., Raeisi, M. y Azar, M. (2020). Production of electrospun nanofibers from food proteins and polysaccharides and their applications in food and drug sciences. *Jorjani Biomedicine Journal*, 6(4), 62-77. doi:10.29252/JORJANIBIOMEDJ.6.4.62
- Naderi, N. y House, J. (2018). Recent developments in folate nutrition. *Advances in Food and Nutrition Research*, 86:195-213. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2017.12.006>
- Najafipour, R., Moghbelinejad, S., Aleyasin, A. y Jalilvand, A. (2017). Effect of B9 and B12 vitamin intake on semen parameters and fertility of men with MTHFR polymorphisms. *Andrology*, 5(4):704-710. doi: 10.1111/andr.12351

- Nesterenko, A., Alric., I., Silvestre, F. y Durrieu, V. (2013). Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*, 42:469-479.
- Neves, D.A., Lobato, K., Simoes, R., Teixeira, J., Pisanelli, G. y Teixeira, H. (2019). Thermal and in vitro digestion stability of folic acid in bread. *Journal of Food Composition and Analysis*, 84:103311. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103311>
- Off, M., Steindal, A., Porojnicu, A., Juzeniene, A., Vorobey, A., Johnsson, A. y Moan, J. (2005). Ultraviolet photodegradation of folic acid. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 80(1),77-55. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2005.06.001>
- Okutan, N., Terzi, P. y Altay, F. (2014). Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers. *Food Hydrocolloids*, 39:19-26.
- OMS. Directriz: Administración diaria de suplementos de hierro y ácido fólico en el embarazo. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 5017.
- Pamunuwa, G., Anjalee, N., Kukulewa, D., Edirisinghe, C., Shakoor, F. y Karunaratne, D. (2020). Tailoring of release properties of folic acid encapsulated nanoparticles via changing alginate and pectin composition in the matrix. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 1: 1123-1134. DOI:10.1016/j.carpta.2020.100008
- Pamunuwa, G., Nilakshi, H., Rajapaksha, G., Shakoor, F. y Karunaratne, D. (2021). Sensory and physicochemical properties and stability of folic acid in a pineapple ready-to-serve beverage fortified with encapsulated folic acid. *Journal of Food Quality*, 2021: 1-9. <https://doi.org/10.1155/2021/9913884>
- Parin, F., Aydemir, C., Taner, y Yildirim, K. (2021). Co-electrospun-electrosprayed PVA/folic acid nanofibers for transdermal drug delivery:preparation, characterization and in vitro cytocompatibility. *Journal of Industrial Textiles*, 15:1323-1347. DOI: 10.1177/1528083721997185
- Parin, F., Aydemir, C., Taner, G. y Yildirim, K. (2020). Folic acid-containing nanofibers by simultaneous process for transdermal drug delivery: preparation, characterization and in vitro biocompatibility. *Research Square*, 1:269-277. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-33973/v1>

- Pérez, R., López, R., Periago, M., Ros, G., Lagaron, J. y López, A. (2015). Encapsulation of folic acid in food hydrocolloids through nanospray drying and electrospraying for nutraceutical applications. *Food Chemistry*, 168:124–133.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.051>
- Pettignano, A., Charlot, A. y Fleury, E. (2019). Carboxyl-functionalized derivatives of carboxymethylcellulose: towards advanced biomedical applications. *Polymer Reviews*, 59(3):510-560. <https://doi.org/10.1080/15583724.2019.1579226>
- Pham, Q., Sharma, U. y Mikos, A. (2006). Electrospun poly(epsilon-caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration. *Biomacromolecules*, 2796-2805.
- Reyes, M., Martín, E., González, V. y Martínez, L. (2011). Uso de carboximetilcelulosa como matriz polimérica en la síntesis de nuevos materiales híbridos. *Ciencia UANL*. 14(4):459-465.
- Rodríguez, E. y Villegas, E. (2012). Caracterización de polímeros aplicando el método termogravimétrico. *Métodos y materiales*, 2:25-30.
- Rogina, A. (2014). Electrospinning process: versatile preparation method for biodegradable and natural polymers and biocomposite systems applied in tissue engineering and drug delivery. *Applied Surface Science*, 296:221-230.
- Rosado, J., Camacho, R. y Bourges, H. (1999). Adición de vitaminas y minerales a harinas de maíz y de trigo en México. *Salud pública México*, 41(2):130-135.
- Rostamabadi, H., Assadpour, E., Tabarestani, H.S., Falsafi, S.R. y Jafari, A.M. (2020). Electrospinning approach for nanoencapsulation of bioactive compounds; recent advances and innovations. *Trends in Food Science y Technology*, 100:190-509.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.015>
- Rouessac, F. y Rouessac, A. (2003). Análisis químico, métodos y técnicas instrumentales modernas. Editorial McGraw Hill, España.
- Saadiah, M., Zhang, D., Nagao, Y., Muzakir, S. y Samsudin, A. (2019). Reducing crystallinity on thin film based CMC/PVA hybrid polymer for application as a host in polymer electrolytes. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 511:201-211.  
<https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2018.11.032>

- Saeed, K., Ishaq, M. y Ilyas, M. (2011). Preparation, morphology and thermomechanical properties of coal asd/polyethylene oxide composites. *Turkish Journal of Chemistry*, 35(2):237-243. <https://doi.org/10.6906/vet-1110-57>.
- Santosh, C., Rupesh, D., Gajanan, D., Anant, D. y Madhav, P. (2020). Nanoparticle formation by nanospray dryinh y its application in nanoencapsulation of food bioactive ingredients. *Journal of Agriculture and Food Research*, 5(1):100085. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.5050.100085>
- Seneida, C. y Gallardo, C. (2009). Estudio de la fotodegradación de ácido fólico encapsulado en microesferas de goma arábica y maltodextrina. *Revista Cubana de Farmacia*, 44(4):446-455.
- Skoog, D. y Leary, J. (1995). Análisis instrumental. Editorial McGraw-Hill. Cuarta edición. México.
- Solmaz, A., Loong, T. y Yukio, K. (2013). Encapsulation of folic acid and its stability in sodium alginate-pectin-poly(ethylene oxide) electrospun fibres. *Journal of Microencapsulation*, 30(1):64-71.
- Son, W., Youk, J., Lee, T. y Park, W. (2004). The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer*, 45(9):2959-2966.
- Soto, G. y López, A. (2011). Nanotecnología en alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 5(1):11-21.
- Sperling, L.H. (2006). Introduction to physical polymer science. Fourth edition. Jhon Wiley and Sons Publications.
- Suárez de Ronderos, M. (2003). Ácido fólico: nutriente redescubierto. *Acta Médica Costarricense*, 45(1): 5-9.
- Suriñach, S., Baro, M., Bordas, S., Clavaguera, N. y Clavaguera, M. (1992). La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la ciencia de materiales. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 31(1):11-17.
- Vora, A., Riga, A., Dollimore, D. y Alexander, K. (2002). Thermal stability of folic acid. *Thermochimica Acta*, 392:209–220.

- Vora, A., Riga, A., Dollimore, D. y Alexander, K. (2004). Thermal stability of folic acid in the solid-state. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 75:709-717. <https://doi.org/10.1023/B:JTAN.0000027167.14746.28>
- Wang, Y., Yan, B., Abbaspourrad, A. y Cheng, Y. (2021). Improved photostability of acid folic by the radical-scavenging effect of tannic acid. *Food Science and Technology* 142:111050.
- Wongsasulak, S., Kit, K., McClements, D., Yoovidhya, T. y Weiss, J. (2007). The effect of solution properties on the morphology of ultrafine electrospun egg albumen-PEO composite fibers. *Polymer*, 48(2):448-457.
- Yuan, H., Zhao, K., Zang, Y., Liu, C., Hu, Z., Wei, J., Zhou, T., Li, Y. y Zhang, H. (2017). Effect of folate deficiency on promoter methylation and gene expression of Esr1, Cav1, and Elavl1 and its influence on spermatogenesis. *Oncotarget*, 8(15):24130–24141. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15731>
- Yuan, X., Zhang, Y., Dong, C. y Sheng, J. (2004). Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning. *Polymer*, 1704-1710.
- Zhang, C., Yuan, X., Wu, L., Han, Y. y Sheng, J. (2005). Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats. *European Polymer Journal*, 41(3):423-432.