



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

TESIS DOCTORAL

**“REOLOGÍA-FUNCIONALIDAD DE HIDROGELES
PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE
COMPUESTOS BIOACTIVOS DE INTERÉS
ALIMENTARIO Y TERAPÉUTICO”**

**Para obtener el grado de
Doctora en Ciencias Agropecuarias**

PRESENTA

Mtra. Lorena Rivera Hernández

Directora

Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández

Codirector

Dr. Norberto Chavarría Hernández

Tulancingo de Bravo, Hgo., México., mayo 2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

TESIS DOCTORAL

**“REOLOGÍA-FUNCIONALIDAD DE HIDROGELES
PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE
COMPUESTOS BIOACTIVOS DE INTERÉS
ALIMENTARIO Y TERAPÉUTICO”**

**Para obtener el grado de
Doctora en Ciencias Agropecuarias**

PRESENTA

Mtra. Lorena Rivera Hernández

Directora

Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández

Codirector

Dr. Norberto Chavarría Hernández

Comité tutorial

Dr. Alberto Tecante Coronel

Dra. Ma. del Rocío López Cuellar

Dra. Mayra Alejandra López Ortega

Tulancingo de Bravo, Hgo., México., mayo 2023


El Comité Tutorial de la **Tesis** del programa educativo de posgrado titulada **“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”**, realizada por la sustentante **Lorena Rivera Hernández con número de cuenta 162626** perteneciente al programa de **Doctorado en Ciencias Agropecuarias**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN


Por lo que la sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente
“Amor, Orden y Progreso”
Lugar, Hidalgo a 15 de mayo de 2023


El Comité Tutorial



Dra. Adriana Inés
Rodríguez Hernández
Directora



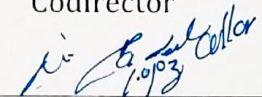
Dr. Alberto Tecante
Coronel
miembro del comité



Dra. Mayra Alejandra
López Ortega
miembro del comité



Dr. Norberto Chavarría
Hernández
Codirector



Dra. Ma del Rocío López
Cuellar
miembro del comité

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme guiado y permitido terminar satisfactoriamente mis estudios de doctorado.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Adriana I. Rodríguez Hernández, por confiar en mí, por compartir su valioso conocimiento, por sus consejos, apoyo, asesoría, sugerencias, paciencia en todo momento y tiempo invertido en desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Norberto Chavarría Hernández por su asesoría, consejos, sugerencias, observaciones y por estar pendiente en todo momento en este trabajo de investigación.

Al Dr. Alberto Tecante Coronel, por sus valiosas observaciones, por su interés, sugerencias y disponibilidad de tiempo en la revisión de este escrito.

A la Dra. Ma del Rocío López Cuellar por su asesoría y tiempo invertido en la determinación de masa molar de pectina mediante HPLC, por sus consejos y sugerencias para la mejora de este proyecto.

A la Dra. Mayra Alejandra López Ortega, por sus aportaciones y sugerencias al proyecto y por su gran ayuda en la determinación de la composición monomérica de pectina mediante HPLC.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de doctorado.

DEDICATORIA

*A toda mi familia,
Donde la vida comienza y el amor nunca termina*

*A mi esposo Isaac Miguel,
El secreto está en dejarlo fluir y que, simplemente ocurra*

*A mi amado hijo, Diego Emiliano,
Esta tesis es un testimonio de mi amor incondicional por ti y mi deseo
por dejar un legado positivo para tu futuro.*

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XII
RESUMEN	XIII
ABSTRACT.....	XIV
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. REFERENCIAS	4
II. JUSTIFICACIÓN	6
1. REFERENCIAS	8
III. HIPÓTESIS.....	9
IV. OBJETIVOS	10
V. ESTUDIO REOLÓGICO Y PROPIEDADES DE RED DE GELANA	11
1. INTRODUCCIÓN	11
2. MATERIALES Y MÉTODOS	13
2.1. pK _a	13
2.2. Preparación de hidrogeles de gelana.....	13
2.3. Reología dinámica.....	15
2.4. Proceso de relajación y parámetros de red	16
3. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	18
3.1. pK _a	18
3.2. Estudio reológico.....	20
3.3. Proceso de relajación y parámetros de red	30
4. CONCLUSIONES	38
5. REFERENCIAS	40

VI. Mixed gels based on low acyl gellan and citrus pectin: A linear viscoelastic analysis	45
ABSTRACT	46
1. INTRODUCTION	47
2. MATERIAL AND METHODS	50
2.1 Materials	50
2.2 Chemical characterization of polysaccharides	50
2.3 Preparation of hydrogels	52
2.4 Viscoelastic properties	53
3. RESULTS AND DISCUSSION	55
3.1. Chemical characterization of polysaccharides	55
3.2 Viscoelastic properties of single gels	58
3.3 Viscoelastic properties of pectin/gellan systems	61
3.4 Relaxation process and network parameters	67
4. CONCLUSIONS	72
CRedit author statement	72
5. REFERENCES	74
VII. RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS	77
ANEXO A	78
ANEXO B	82
ANEXO C	86
ANEXO D	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de a) gelana nativa y b) gelana desacilada (Palumbo et al., 2020).	11
Figura 2. Transición hebra aleatoria-hélice y sol-gel de gelana (Palumbo et al., 2020).	12
Figura 3. a) Reómetro ARES-G2 (TA Instruments, USA); b) geometría placa-placa (diámetro = 40 mm, $\Delta h = 3$ mm).	15
Figura 4. Representación esquemática del Modelo Generalizado de Maxwell con tres elementos.	16
Figura 5. Curva de titulación potenciométrica en solución de gelana	18
Figura 6. Punto de equivalencia, primera y segunda derivada.	19
Figura 7. Variación de G' durante el enfriamiento (0.5 g/100 g gelana – 5 mM CaCl_2). Determinaciones realizadas por duplicado, símbolos rojos= primera réplica; símbolos azules= segunda réplica. Determinaciones realizadas a 1 rad/s dentro de la zona de viscoelasticidad lineal, usando una tasa de enfriamiento de 1 °C/min. R representa la relación Ca^{2+} (meq·L ⁻¹)/gelana (meq·L ⁻¹).	21
Figura 8. Variación de G' durante el enfriamiento de disoluciones de gelana 1 g/100 g con diferentes concentraciones de K^+ , usando una tasa de enfriamiento de 0.6 °C/min (J Tang et al., 1997a).	22
Figura 9. Temperaturas de gelificación determinadas durante el enfriamiento de disoluciones de gelana 0.3, 0.5 y 0.7 g/100 g ; a) en función de la concentración de CaCl_2 , b) en función de R (Relación Ca^{2+} (meq·L ⁻¹)/gelana (meq·L ⁻¹)). Determinaciones realizadas a 1 rad/s dentro de la zona de viscoelasticidad lineal. Valores promedio de dos determinaciones independientes.	24
Figura 10. Variación de G' con el tiempo para sistemas: 0.3, 0.5 y 0.7 g/100 g gelana con 3, 5, 7, 10 y 12 mM CaCl_2 . Los datos fueron obtenidos a 25 °C dentro de la zona de viscoelasticidad lineal. Valores promedio de dos determinaciones independientes.	26
Figura 11. a) Espectros mecánicos para sistemas de 0.3 g/100 g gelana – CaCl_2 . $G'(\omega)$; (símbolos llenos), $G''(\omega)$; (símbolos vacíos); b) Variación de $\tan \delta$ con la	

frecuencia angular para sistemas de gelana. Los datos fueron obtenidos dentro de la zona de viscoelasticidad lineal. Valores promedio de dos determinaciones independientes. 29

Figura 12. Variación de módulo de almacenamiento en función de la concentración de CaCl₂. Los valores representan el promedio de G' a $\omega = 1$ rad/s. Los datos fueron obtenidos dentro de la zona de viscoelasticidad lineal. Valores promedio de dos determinaciones independientes. 30

Figura 13. Módulo de almacenamiento (G'(ω)) a 25 °C de hidrogeles de **0.3, 0.5 y 0.7 g/100 g gelana** – CaCl₂. La línea representa el ajuste del Modelo Generalizado de Maxwell. 32

Figura 14. Tiempo de relajación máximo (λ_1) de hidrogeles de **0.3, 0.5 y 0.7 g/100 g gelana** – CaCl₂ en función de la relación estequiométrica $R = [Ca^{2+}]/[unidad\ tetrasacárida\ de\ gelana]$, ambos en meq·L⁻¹. 35

Figura 15. Tamaño de malla (ξ) en hidrogeles de **0.3, 0.5 y 0.7 g/100 g gelana** – CaCl₂ en función de la concentración iónica total, C_T. 36

Figura 16. Evolución del incremento en G' durante el enfriamiento de disoluciones de **gelana 0.3 g/100 g** en presencia de distintas concentraciones de calcio. Determinaciones realizadas por duplicado, símbolos rojos= primera réplica; símbolos azules= segunda replica. Determinaciones realizadas a 1 rad/s dentro de la zona de viscoelasticidad lineal, usando una tasa de enfriamiento de 1 °C/min. R representa la relación Ca²⁺ (meq·L⁻¹)/gelana (meq·L⁻¹) en cada muestra. 79

Figura 17. Evolución del incremento en G' durante el enfriamiento de disoluciones de **gelana 0.5 g/100 g** en presencia de distintas concentraciones de calcio. Determinaciones realizadas por duplicado, símbolos rojos= primera réplica; símbolos azules= segunda replica. Determinaciones realizadas a 1 rad/s dentro de la zona de viscoelasticidad lineal, usando una tasa de enfriamiento de 1 °C/min. R representa la relación Ca²⁺ (meq·L⁻¹)/gelana (meq·L⁻¹) en cada muestra. 80

Figura 18. Evolución del incremento en G' durante el enfriamiento de disoluciones de **gelana 0.7 g/100 g** en presencia de distintas concentraciones de calcio. Determinaciones realizadas por duplicado, símbolos rojos= primera réplica; símbolos azules= segunda replica. Determinaciones realizadas a 1 rad/s dentro de

la zona de viscoelasticidad lineal, usando una tasa de enfriamiento de 1 °C/min. R representa la relación Ca^{2+} (meq·L⁻¹)/gelana (meq·L⁻¹) en cada muestra. 81

Figura 19. Espectros mecánicos para sistemas de **gelana 0.3 g/100 g** con distintas concentraciones de CaCl₂. Variación de G' (ω); (símbolos azules llenos), G'' (ω); (símbolos azules vacíos) y tan δ (ω); (símbolos verdes) con la frecuencia angular. Los datos fueron obtenidos dentro de la zona de viscoelasticidad lineal. Las barras de error representan la desviación estándar. 83

Figura 20. Espectros mecánicos para sistemas de **gelana 0.5 g/100 g** con distintas concentraciones de CaCl₂. Variación de G' (ω); (símbolos azules llenos), G'' (ω); (símbolos azules vacíos) y tan δ (ω); (símbolos verdes) con la frecuencia angular. Los datos fueron obtenidos dentro de la zona de viscoelasticidad lineal. Las barras de error representan la desviación estándar. 84

Figura 21. Espectros mecánicos para sistemas de **gelana 0.7 g/100 g** con distintas concentraciones de CaCl₂. Variación de G' (ω); (símbolos azules llenos), G'' (ω); (símbolos azules vacíos) y tan δ (ω); (símbolos verdes) con la frecuencia angular. Los datos fueron obtenidos dentro de la zona de viscoelasticidad lineal. Las barras de error representan la desviación estándar. 85

Figura 22. Zona de viscoelasticidad lineal en hidrogeles de **gelana 0.3 g/100 g** con distintas concentraciones de CaCl₂. Determinaciones realizadas por duplicado, símbolos rojos= primera réplica; símbolos azules= segunda réplica. Pruebas realizadas a 25 °C y 6.284 rad/s. 87

Figura 23. Zona de viscoelasticidad lineal en hidrogeles de **gelana 0.5 g/100 g** con distintas concentraciones de CaCl₂. Determinaciones realizadas por duplicado, símbolos rojos= primera réplica; símbolos azules= segunda réplica. Pruebas realizadas a 25 °C y 6.284 rad/s. 88

Figura 24. Zona de viscoelasticidad lineal en hidrogeles de **gelana 0.7 g/100 g** con distintas concentraciones de CaCl₂. Determinaciones realizadas por duplicado, símbolos rojos = primera réplica; símbolos azules = segunda réplica. Pruebas realizadas a 25 °C y 6.284 rad/s. 89

Figura 1S. Variation of G' (solid circles) and G'' (void circles) with angular frequency for gellan-pectin systems with a) 3 mM CaCl₂ and b) 5 mM CaCl₂. Data were obtained

at 25 °C within the linear viscoelastic zone. Error bars represent the standard deviation.c 91

Figura 2S. Strain sweep of a) gellan, b) pectin systems and their mixtures gellan-pectin with c) 3 mM CaCl₂ and d) 5 mM CaCl₂, at 25 °C and 1 Hz..... 92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de R obtenidos en cada sistema gelana – CaCl ₂	14
Tabla 2. Valores de pH obtenidos en cada sistema gelana – CaCl ₂	20
Tabla 3. Módulo de equilibrio (G_e), módulo de cizalla (G), tiempo de relajación máximo (λ_1), densidad de reticulación (ρ_x) y tamaño de malla (ξ) para sistemas de gelana – CaCl ₂	34

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo analizar el comportamiento viscoelástico de hidrogeles a base de pectina cítrica de bajo metoxilo (DE = 30.4 %), gelana de bajo acilo y sus mezclas, en presencia de iones calcio para evaluar el efecto de cada polisacárido en los procesos de gelificación y relajación de los sistemas mixtos. Se aplicó el Modelo Generalizado de Maxwell a los datos experimentales obtenidos en las pruebas de viscoelasticidad lineal para la determinación del tiempo de relajación y el tamaño promedio de malla de la red. En la mayoría de los hidrogeles mixtos, la co-gelificación de gelana y pectina generó hidrogeles más rígidos, en comparación con los hidrogeles elaborados con los polisacáridos solos, con tamaños de mallas de la red polimérica más estrechas (6.1 – 11.7 nm) y reordenamientos de las cadenas poliméricas más lentos. Se obtuvieron tiempos de relajación entre 16.7 – 55.2 s, 12.9 – 38.3 s y 401.9 – 529.6 s en los hidrogeles de pectina-gelana, gelana y pectina, respectivamente. El comportamiento viscoelástico de los hidrogeles mixtos estuvo dominado por la alta afinidad de gelana por los iones calcio, mientras que la pectina contribuyó a reforzar la red mixta. El bajo grado de ramificación (7 % mol) y la presencia del homogalacturonano, considerado el dominio principal en las macromoléculas de pectina, contribuyó a reforzar el comportamiento elástico de los sistemas híbridos a través de puentes de calcio y enlaces de hidrógeno. El análisis reológico proporciona una nueva comprensión sobre las redes híbridas de pectina-gelana útil en el diseño de sistemas biocompatibles para la administración de compuestos con actividad biológica.

Palabras clave: Polisacáridos naturales; Reología; Modelo de Maxwell; Hidrogel; Cizalla oscilatoria de pequeña amplitud.

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

ABSTRACT

This study aimed to analyze the viscoelastic behavior of hydrogels based on low methoxyl citrus pectin (DE = 30.4 %), low acyl gellan, and their mixtures in the presence of calcium ions to assess the effect of each polysaccharide on the gelation and relaxation processes of the mixed systems. The generalized Maxwell model was applied to the experimental data obtained in the linear viscoelasticity tests to obtain the hydrogels' relaxation times and average network mesh size. In most mixed hydrogels, the co-gelation of gellan and pectin provided more rigid hydrogels compared to their individual components, with narrow meshes (6.1 – 11.7 nm) and slower rearrangements of polymer chains, relaxation times were obtained between 16.7 – 55.2 s, 12.9 – 38.3 s and 401.9 – 529.6 s in the pectin-gellan, gellan and pectin hydrogels, respectively. The viscoelastic behavior of the mixed hydrogels was dominated by the high affinity of gellan for calcium ions and pectin contributed to reinforce the mixed network. The low extent of branching (7 % mol) and the presence of homogalacturonan, the main domain in the macromolecules of pectin, contributed to reinforce the elastic behavior of the hybrid systems through calcium bridges and hydrogen bonds. The rheological analysis provides a new understanding concerning the hybrid pectin-gellan networks useful in designing biocompatible systems for the delivery of biologically active compounds.

Keywords: Natural polysaccharides; Rheology; Maxwell model; Hydrogel; Small amplitude oscillatory shear.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales, hidrofílicas, capaces de absorber grandes cantidades de agua o fluidos biológicos (hasta 1000 veces su volumen) dando lugar a redes expandidas (Caló & Khutoryanskiy, 2015). Su capacidad para absorber líquidos se debe a la presencia de grupos funcionales hidrofílicos unidos a las cadenas poliméricas, como grupos amida, amino, carboxilo e hidroxilo, que son capaces de ionizarse en presencia de agua (Ferreira et al., 2018). Se han utilizado diversos criterios para clasificar a los hidrogeles, incluidos su origen: natural o sintético, y tipo de entrecruzamiento entre las macromoléculas: hidrogeles "reversibles" o "físicos" si en la formación de la red participan interacciones moleculares de baja energía, e hidrogeles "permanentes" o "químicos" cuando la reticulación de polímeros se da mediante enlaces covalentes (Caló & Khutoryanskiy, 2015).

Actualmente los hidrogeles tienen diversas aplicaciones, principalmente biomédicas y farmacéuticas. En los últimos diez años ha habido un crecimiento exponencial en las investigaciones científicas referentes a hidrogeles y sus aplicaciones entre las cuales se citan: lentes de contacto, productos de higiene, ingeniería de tejidos, matrices para encapsular células viables, apósitos para heridas y sistemas de administración de fármacos. Entre las aplicaciones de hidrogeles destacan la ingeniería de tejidos y la entrega de fármacos, la mayoría de las publicaciones de hidrogeles desarrollan esos temas (Caló & Khutoryanskiy, 2015; Coviello, Matricardi, Marianecchi, & Alhaique, 2007; Ferreira et al., 2018). Recientemente se han hecho esfuerzos importantes para desarrollar sistemas más eficaces para proteger y liberar moléculas con actividad biológica en el cuerpo humano o en sistemas alimentarios. Actualmente se busca que los hidrogeles respondan a estímulos externos, lo que puede conducir a cambios en diversas propiedades de la matriz polimérica, como hinchamiento, permeabilidad, viscoelasticidad e hidrofobicidad (o hidrofiliidad). Los estímulos externos que pueden provocar tales respuestas incluyen exposición a la luz, cambios en el pH, fuerza iónica y temperatura, así como la exposición a campos magnéticos, agentes

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

biológicos y químicos. Estas características los convierten en una opción para el desarrollo de sistemas inteligentes porque pueden detectar estímulos y responder a través de cambios estructurales, generando matrices biopoliméricas capaces de albergar y liberar agentes bioactivos (Eckmann, Composto, Tsourkas, & Muzykantov, 2014; Ferreira et al., 2018).

Dentro de los numerosos polímeros que se han propuesto para la preparación de hidrogeles, los polisacáridos naturales han ganado mucha atención en el ámbito de la ciencia y la tecnología debido a la serie de ventajas que presentan frente a otros polímeros, son extraídos de fuentes naturales, y en general son biodegradables, no tóxicos, biocompatibles y solubles en agua (Das & Giri, 2020; de Oliveira Cardoso, Cury, Evangelista, & Gremião, 2017; Florjancic, Zupancic, & Zumer, 2002). Además de que son abundantes y fácilmente disponibles de algas, plantas y cultivos de cepas microbianas seleccionadas, presentan gran variedad en su composición química y sus propiedades fisicoquímicas son distintivas (Coviello et al., 2007; Marras-Marquez, Peña, & Veiga-Ochoa, 2015). Debido a sus múltiples funcionalidades, los polisacáridos han sido ampliamente utilizados en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica e ingeniería biomédica como agentes espesantes, gelificantes, encapsulantes y emulgentes (Wang, Natale, Virgilio, & Heuzey, 2016; J. Zhang, Wang, Liang, Cai, & Zhang, 2019). Sus propiedades gelificantes los convierte en una alternativa prometedora como vehículos de administración de moléculas bioactivas a sistemas biológicos (Das & Giri, 2020). Sin embargo, su resistencia mecánica y elasticidad son dos de los factores determinantes para el uso de estos biomateriales como sistemas de liberación (Caccavo, Cascone, Lamberti, & Barba, 2018; Ferreira et al., 2018). Por lo tanto se han estudiado diversas mezclas de polisacáridos, tanto naturales como modificados químicamente, para el desarrollo de sistemas biocompatibles con propiedades fisicoquímicas adaptadas a los requisitos de una aplicación específica (de Oliveira Cardoso et al., 2017). Los hidrogeles binarios pueden exhibir una gama más amplia de propiedades reológicas debido a la generación de estructuras más complejas, lo cual puede mejorar su aplicabilidad con relación a cada polisacárido usado por separado (Florjancic et al., 2002). Las interacciones entre polisacáridos en un

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

hidrogel binario influyen en su capacidad de gelificación, retención de agua (Chen et al., 2019) y en sus propiedades viscoelásticas; es posible, incluso, la formación de geles más elásticos en comparación con aquellos producidos por un solo polisacárido (Wu, Ding, & He, 2018), lo cual se ha denominado sinergismo. Algunos investigadores han reportado efectos sinérgicos en mezclas de biopolímeros, como la mezcla de pectinas de alto metoxilo (HM) con pectinas de bajo metoxilo (LM) (Löfgren & Hermansson, 2007), gelatina/goma xantana (Wang et al., 2016; Wang, Virgilio, Wood-Adams, & Heuzey, 2017), konjac glucomanano/xantana (Fitzsimons, Tobin, & Morris, 2008), konjac glucomanano/gelana (Mei et al., 2012), xiloglucano/gelana (Nitta et al., 2003), goma de algarrobo/xantana (Sandolo et al., 2010), κ -carragenina/goma de algarrobo (Martins et al., 2012) y polisacáridos de okra con pectina HM (X. Li et al., 2019).

El comportamiento reológico de mezclas de polisacáridos es muy complejo, está fuertemente influenciado por las características estructurales de los polisacáridos (masa molar, ramificaciones y grupos funcionales en su estructura) y factores extrínsecos (pH, temperatura, iones o solutos disueltos) que dan lugar a cambios conformacionales de las cadenas en solución e interacciones inter e intramoleculares que pueden analizarse a través de pruebas de viscoelasticidad lineal. En este proyecto se examinaron las propiedades viscoelásticas lineales de hidrogeles a base de gelana, pectina y sus mezclas, abordando el estudio de la capacidad de formación de red, la densidad de entrecruzamiento de la matriz polimérica y la relajación de ésta para el posterior diseño de sistemas biocompatibles para la administración de compuestos con actividad biológica, lo cual resulta relevante en el desarrollo de biomateriales inteligentes, empaques biodegradables, sistemas de liberación de fármacos, alimentos funcionales, entre otras aplicaciones biotecnológicas. La hipótesis y los objetivos de este proyecto se presentan en las secciones III y IV.

1. REFERENCIAS

- Caccavo, D., Cascone, S., Lamberti, G., & Barba, A. (2018). Hydrogels: experimental characterization and mathematical modelling of their mechanical and diffusive behaviour. *Chemical Society Reviews*, 47(7), 2357-2373.
- Caló, E., & Khutoryanskiy, V. V. (2015). Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*, 65, 252-267.
- Coviello, T., Matricardi, P., Marianecchi, C., & Alhaique, F. (2007). Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *Journal of controlled release*, 119(1), 5-24.
- Chen, J., Chen, W., Duan, F., Tang, Q., Li, X., Zeng, L., . . . Jia, L. (2019). The synergistic gelation of okra polysaccharides with kappa-carrageenan and its influence on gel rheology, texture behaviour and microstructures. *Food Hydrocolloids*, 87, 425-435.
- Das, M., & Giri, T. K. (2020). Hydrogels based on gellan gum in cell delivery and drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 56, 101586.
- de Oliveira Cardoso, V. M., Cury, B. S. F., Evangelista, R. C., & Gremião, M. P. D. (2017). Development and characterization of cross-linked gellan gum and retrograded starch blend hydrogels for drug delivery applications. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 65, 317-333.
- Eckmann, D., Composto, R., Tsourkas, A., & Muzykantov, V. (2014). Nanogel carrier design for targeted drug delivery. *Journal of materials chemistry B*, 2(46), 8085-8097.
- Ferreira, N., Ferreira, L., Cardoso, V., Boni, F., Souza, A., & Gremião, M. (2018). Recent advances in smart hydrogels for biomedical applications: From self-assembly to functional approaches. *European Polymer Journal*, 99, 117-133.
- Fitzsimons, S. M., Tobin, J. T., & Morris, E. R. (2008). Synergistic binding of konjac glucomannan to xanthan on mixing at room temperature. *Food Hydrocolloids*, 22(1), 36-46.
- Florjancic, U., Zupancic, A., & Zumer, M. (2002). Rheological characterization of aqueous polysaccharide mixtures undergoing shear. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 16(3), 105-118.
- Li, X., Dong, Y., Guo, Y., Zhang, Z., Jia, L., Gao, H., . . . Duan, F. (2019). Okra polysaccharides reduced the gelling-required sucrose content in its synergistic gel with high-methoxyl pectin by microphase separation effect. *Food Hydrocolloids*, 95, 506-516.
- Löfgren, C., & Hermansson, A.-M. (2007). Synergistic rheological behaviour of mixed HM/LM pectin gels. *Food Hydrocolloids*, 21(3), 480-486.
- Marras-Marquez, T., Peña, J., & Veiga-Ochoa, M. (2015). Robust and versatile pectin-based drug delivery systems. *International journal of pharmaceutics*, 479(2), 265-276.
- Martins, J. T., Cerqueira, M. A., Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Souza, B. W., & Vicente, A. A. (2012). Synergistic effects between κ-carrageenan and locust

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

- bean gum on physicochemical properties of edible films made thereof. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 280-289.
- Mei, T., Xu, X., Li, B., Li, J., Cui, B., Zhou, B., & Ablaye, W. (2012). Synergistic interaction of konjac glucomannan and gellan gum investigated by rheology and texture analysis. *Journal of applied polymer science*, 125(2), 1363-1370.
- Nitta, Y., Kim, B. S., Nishinari, K., Shirakawa, M., Yamatoya, K., Oomoto, T., & Asai, I. (2003). Synergistic gel formation of xyloglucan/gellan mixtures as studied by rheology, DSC, and circular dichroism. *Biomacromolecules*, 4(6), 1654-1660.
- Sandolo, C., Bulone, D., Mangione, M. R., Margheritelli, S., Di Meo, C., Alhaique, F., . . . Coviello, T. (2010). Synergistic interaction of Locust Bean Gum and Xanthan investigated by rheology and light scattering. *Carbohydrate polymers*, 82(3), 733-741.
- Wang, C.-S., Natale, G., Virgilio, N., & Heuzey, M.-C. (2016). Synergistic gelation of gelatin B with xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 60, 374-383.
- Wang, C.-S., Virgilio, N., Wood-Adams, P., & Heuzey, M.-C. (2017). A mechanism for the synergistic gelation properties of gelatin B and xanthan gum aqueous mixtures. *Carbohydrate polymers*, 175, 484-492.
- Wu, Y., Ding, W., & He, Q. (2018). The gelation properties of tara gum blended with κ -carrageenan or xanthan. *Food Hydrocolloids*, 77, 764-771.
- Zhang, J., Wang, G., Liang, Q., Cai, W., & Zhang, Q. (2019). Rheological and microstructural properties of gelatin B/tara gum hydrogels: effect of protein/polysaccharide ratio, pH and salt addition. *LWT*, 103, 108-115.

II. JUSTIFICACIÓN

Los biopolímeros han recibido gran atención en las últimas décadas debido a su potencial aplicación en el campo de la ciencia de los materiales, especialmente en el diseño de sistemas de administración de fármacos, ofreciendo un novedoso sistema polimérico biodegradable, biocompatible y altamente efectivo para una entrega específica. En décadas pasadas se desarrollaron hidrogeles como sistema de transporte y liberación controlada de moléculas con actividad biológica. Los hidrogeles son redes poliméricas hidrofílicas, capaces de absorber grandes cantidades de agua o fluidos biológicos y dar lugar a una red expandida que puede liberar compuestos bioactivos albergados en su interior. Sin embargo, muchos de ellos son elaborados con polímeros sintéticos, frecuentemente entrecruzados químicamente, en donde en la mayoría de los casos se usan disolventes orgánicos y son frecuentes varias etapas de purificación para eliminar monómeros residuales tóxicos, lo cual puede involucrar tiempos de proceso excesivos. Una alternativa para evitar estos inconvenientes es el desarrollo de hidrogeles a base de polisacáridos, los cuales presentan una serie de ventajas en comparación con los polímeros sintéticos, ya que son biodegradables, biocompatibles y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza ([Coviello et al., 2007](#)).

En este trabajo de investigación se utilizaron dos biopolímeros, pectina y gelana; para generar hidrogeles a través de la co-gelificación en medio acuoso con iones de calcio. Aunque se han reportado muchos hidrogeles a base de gelana o mezclas de ésta con polímeros naturales y sintéticos ([Palumbo, Federico, Pitarresi, Fiorica, & Giammona, 2020](#); [Zia et al., 2018](#)), pocos estudios han abordado la mezcla gelana-pectinas de bajo metoxilo, polisacáridos biocompatibles y aniónicos con gran afinidad a formar redes en presencia de calcio. La gelana de bajo acilo es un polisacárido que forma geles en concentraciones sustancialmente menores (< 0.01 g/ 100 g) a las utilizadas para otros polisacáridos y las propiedades reológicas de este biopolímero dependen fuertemente del contenido de iones presentes, dando lugar a hidrogeles muy rígidos y quebradizos, lo cual ha dado pauta a que este polisacárido se use en mezcla con otros polímeros, principalmente espesantes o

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

débilmente gelificantes, para disminuir la rigidez e incrementar la elasticidad de los geles de gelana (Rodríguez-Hernández, Durand, Garnier, Tecante, & Doublier, 2003). La gelana de bajo acilo es un polisacárido muy estudiado desde el punto de vista reológico, debido a que, en presencia de cationes, principalmente calcio, puede formar desde sistemas fluidos débilmente estructurados hasta geles rígidos, al cambiar la relación gelana/Ca²⁺.

Por otra parte, las pectinas han resurgido en el ámbito del estudio de biomateriales, son polisacáridos de origen vegetal y de estructura muy compleja. Las ramificaciones y contenido de ácido galacturónico en su estructura determinan su funcionalidad. En los últimos años se han incrementado los estudios acerca de las propiedades bioactivas de pectinas o sus oligosacáridos (actividad prebiótica, antiinflamatoria, antioxidante, antimicrobiana, inmunoestimuladora y anticancerígenas) (Freitas, Coimbra, Souza, & Sousa, 2021; D.-Q. Li, Xu, & Li, 2022; Sun et al., 2023; S. Zhang et al., 2021), por lo que este polisacárido vegetal es actualmente uno de los biopolímeros de mayor estudio para el desarrollo de alimentos o ingredientes funcionales, compositos, películas o recubrimientos, nano y microencapsulados, apósitos para heridas e ingeniería de tejidos, entre otros.

Por lo tanto, en este proyecto se examinaron las propiedades viscoelásticas lineales de hidrogeles a base de gelana de bajo acilo, pectina de bajo metoxilo y sus mezclas, abordando los estudios de la capacidad de formación de red y la densidad de entrecruzamiento de la matriz polimérica y su relajación mediante aspectos básicos de reología y fisicoquímica de macromoléculas, con la finalidad de contribuir al desarrollo de plataformas biotecnológicas para sistemas de administración de moléculas bioactivas.

1. REFERENCIAS

- Coviello, T., Matricardi, P., Marianecchi, C., & Alhaique, F. (2007). Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *Journal of controlled release*, 119(1), 5-24.
- Freitas, C. M. P., Coimbra, J. S. R., Souza, V. G. L., & Sousa, R. C. S. (2021). Structure and Applications of Pectin in Food, Biomedical, and Pharmaceutical Industry: A Review. *Coatings*, 11(8). doi: 10.3390/coatings11080922
- Li, D.-Q., Xu, F., & Li, J. (2022). Chapter 4 - Pectin-based micro- and nanomaterials in drug delivery. In S. Jana & S. Jana (Eds.), *Micro- and Nanoengineered Gum-Based Biomaterials for Drug Delivery and Biomedical Applications* (pp. 97-125): Elsevier.
- Palumbo, F. S., Federico, S., Pitarresi, G., Fiorica, C., & Giammona, G. (2020). Gellan gum-based delivery systems of therapeutic agents and cells. *Carbohydrate polymers*, 229, 115430.
- Rodríguez-Hernández, A. I., Durand, S., Garnier, C., Tecante, A., & Doublier, J. L. (2003). Rheology-structure properties of gellan systems: evidence of network formation at low gellan concentrations. *Food Hydrocolloids*, 17(5), 621-628. doi: 10.1016/s0268-005x(02)00123-6
- Sun, R., Niu, Y., Li, M., Liu, Y., Wang, K., Gao, Z., . . . Yuan, Y. (2023). Emerging trends in pectin functional processing and its fortification for synbiotics: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 134, 80-97. doi: 10.1016/j.tifs.2023.03.004
- Zhang, S., Waterhouse, G. I. N., Xu, F., He, Z., Du, Y., Lian, Y., . . . Sun-Waterhouse, D. (2021). Recent advances in utilization of pectins in biomedical applications: a review focusing on molecular structure-directing health-promoting properties. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1-34. doi: 10.1080/10408398.2021.1988897
- Zia, K. M., Tabasum, S., Khan, M. F., Akram, N., Akhter, N., Noreen, A., & Zuber, M. (2018). Recent trends on gellan gum blends with natural and synthetic polymers: A review. *Int J Biol Macromol*, 109, 1068-1087. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.099

III. HIPÓTESIS

La co-gelificación de gelana de bajo acilo y pectina cítrica de bajo metoxilo, en presencia de iones calcio, generará hidrogeles binarios con mayor carácter elástico que los geles de gelana sola y con tiempos de relajación dependientes de la composición gelana/pectina. Esto permitirá avanzar en la comprensión de biomateriales ensamblados para su uso en sistemas de administración de moléculas bioactivas de interés alimentario o terapéutico.

IV. OBJETIVOS

GENERAL

Analizar las propiedades viscoelásticas y propiedades de red de hidrogeles, formulados a base de gelana de bajo acilo, pectina de bajo metoxilo y sus mezclas; para dilucidar el efecto de cada polisacárido en la gelificación y comportamiento de relajación de la red mixta para el desarrollo de biomateriales biocompatibles.

ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar químicamente los biopolímeros; pectina y gelana, a través de técnicas de espectroscopía de infrarrojo, cromatografía de exclusión molecular (masa molar y monosacáridos en pectina), espectroscopía UV-Vis (contenido de ácido galacturónico) y titulación potenciométrica (pK_a).
- 2) Determinar el comportamiento reológico de hidrogeles de gelana, pectina y sus mezclas en función de la concentración de polisacáridos y de iones calcio (ion entrecruzante), mediante pruebas de viscoelasticidad lineal para el estudio de la contribución de cada polisacárido en la formación de gel.
- 3) Analizar el comportamiento y la posible relación entre los parámetros del proceso de relajación (tiempo de relajación, módulo de relajación y módulo de equilibrio) y la nanoestructura de las redes de gelana, pectina y gelana-pectina, determinados mediante el Modelo Generalizado de Maxwell y la teoría de Flory, respectivamente.

V. ESTUDIO REOLÓGICO Y PROPIEDADES DE RED DE GELANA

1. INTRODUCCIÓN

La goma gelana (GG) es un polisacárido extracelular sintetizado por *Sphingomonas elodea* (ATCC 31461) denominada anteriormente *Pseudomonas elodea*; a nivel industrial es producida por *Sphingomonas paucimobilis* (Agnello, Palumbo, Pitarresi, Fiorica, & Giammona, 2018; Fiorica et al., 2020; Graham Sworn & Stouby, 2021). Es un exopolisacárido lineal, aniónico, con una secuencia repetida del tetrasacárido que consta de (1,3-β-D -glucosa, ácido 1,4-β-D -glucurónico, 1,4-β-D -glucosa, 1,4-α-L -ramnosa) (Milivojevic, Pajic-Lijakovic, Bugarski, Nayak, & Hasnain, 2019). En su forma nativa contiene dos tipos de sustituyentes acilo (L - glicerilo y acetilo) (Figura 1a), estos residuos se eliminan mediante hidrólisis alcalina generando gelana desacilada (Figura 1b) (Morris, Nishinari, & Rinaudo, 2012; Osmałek, Froelich, & Tasarek, 2014). La goma gelana con bajo contenido de grupos acilo (LA) genera geles frágiles con alta estabilidad térmica, mientras que con alto contenido de grupos acilo (HA) forma geles suaves, elásticos y termorreversibles (Palumbo et al., 2020).

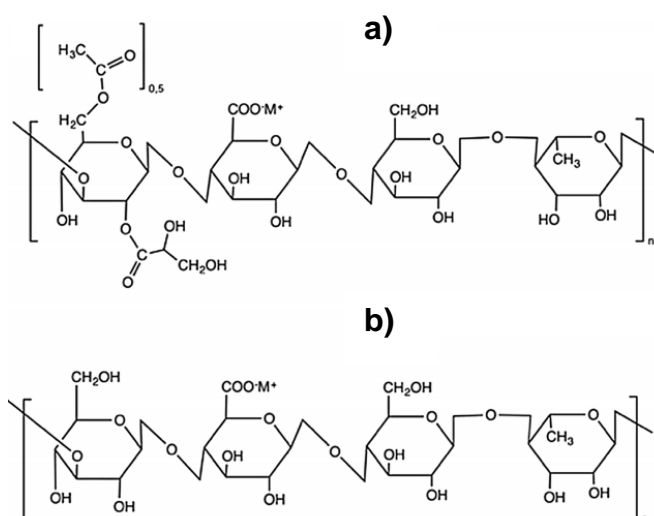


Figura 1. Estructura química de a) gelana nativa y b) gelana desacilada (Palumbo et al., 2020).

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

La gelana es un polisacárido ampliamente utilizado por la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica debido a las propiedades que brinda, tiene la capacidad de absorber grandes cantidades de agua y fluidos biológicos, es biodegradable, biocompatible, no tóxico y mucoadhesivo, tiene un amplio espectro de propiedades reológicas, ha sido utilizado como estabilizador, espesante y gelificante (Palumbo et al., 2020). Los hidrogeles a base de gelana son alternativas prometedores en la encapsulación, transporte y liberación de células y compuestos bioactivos, también ha sido utilizada en ingeniería de tejidos (Das & Giri, 2020), en presencia de cationes tiene la capacidad de formar geles en concentraciones más bajas que otros hidrocoloides como carrageninas, alginato, pectina o gelatina (Pérez-Campos, Chavarría-Hernández, Tecante, Ramírez-Gilly, & Rodríguez-Hernández, 2012). Los geles formados por cationes divalentes como Ca^{2+} y Mg^{2+} son más fuertes en comparación con los que se forman con cationes monovalentes como Na^+ y K^+ (Moxon & Smith, 2016).

La gelificación de gelana es un proceso termorreversible de dos pasos, inicialmente las moléculas de gelana en disolución a temperaturas altas tienen una conformación de ovillo al azar (*random coil*), con la disminución de temperatura ocurre una fase de transición conformacional, estos ovillos o hebras aleatorias producen dobles hélices altamente ordenadas, las cuales involucran interacciones débiles como las fuerzas de van der Waals y enlaces de hidrógeno; posteriormente ocurre una fase de transición sol-gel en presencia de cationes, las dobles hélices se agregan y crean una red tridimensional formando complejos con los cationes presentes (Morris et al., 2012).

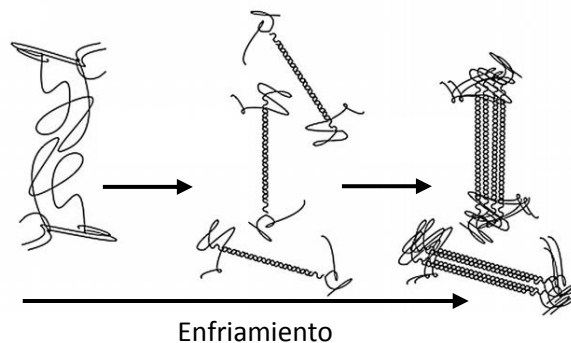


Figura 2. Transición hebra aleatoria-hélice y sol-gel de gelana (Palumbo et al., 2020).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En el estudio reológico se utilizó gelana de bajo acilo (Kelcogel®, CP-Kelco, EE. UU.) sin purificación adicional y cloruro de calcio (J. T Baker, México) como agente de reticulación. En todo el estudio se usó agua destilada ultrapurificada grado HPLC (Thermo Fisher Scientific, Germany).

2.1. pK_a

El valor de pK_a para gelana se determinó mediante titulación potenciométrica utilizando un medidor de pH digital HI 4222 (Hanna, Instruments). Se preparó una disolución de gelana 0.01 g/100 g, disolviendo el polisacárido en agua con agitación magnética durante toda la noche a temperatura ambiente. Las titulaciones se realizaron con pequeños incrementos (20 μ L) de NaOH (0.1 N) en 20 mL de disolución polimérica en el intervalo de pH 3 - 10 a 25 °C. Con los datos obtenidos en la curva de titulación se calcularon la primera y segunda derivadas con la finalidad de obtener el punto de equivalencia y el pK_a (Kaur & Kaur, 2018). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.2. Preparación de hidrogeles de gelana

Se prepararon disoluciones de gelana dispersando el polisacárido en agua (0.3, 0.5 y 0.7 g/100 g). La muestra se mantuvo en agitación magnética durante toda la noche, posteriormente se calentó a 90 °C y se agregó $CaCl_2$ (3, 5, 7, 10, 12 mM) para inducir la gelificación, el volumen final de cada una de las muestras fue de 15 mL. La Tabla 1 muestra las concentraciones de gelana y $CaCl_2$ evaluadas en este trabajo y el valor de R ($R = [Ca^{2+}]/[gelana]$, ambos en $meq \cdot L^{-1}$) para cada uno de los tratamientos analizados, considerando la masa molar del tetrasacárido estructural de gelana (645 g/mol).

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

Tabla 1. Valores de R obtenidos en cada sistema gelana – CaCl₂

		Gelana (g/100 g)		
		0.3	0.5	0.7
		(4.64 meq·L ⁻¹)	(7.74 meq·L ⁻¹)	(10.84 meq·L ⁻¹)
CaCl₂	Ca²⁺	R		
(mM)	(meq·L⁻¹)	Ca²⁺/ Gelana		
		(meq·L⁻¹ / meq·L⁻¹)		
3	6	1.29	0.78	0.55
5	10	2.15	1.29	0.92
7	14	3.01	1.81	1.29
10	20	4.31	2.58	
12	24	5.17	3.10	

2.3. Reología dinámica

Se llevaron a cabo pruebas de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud (SAOS) en un reómetro ARES-G2 (TA Instruments, USA) (Figura 3a), utilizando la geometría placa-placa (diámetro = 40 mm, $\Delta h = 3$ mm) (Figura 3b). Se colocó papel de lija (hoja de lija de agua TENAZ IT®, MAGMA – 80, 230 x 279 mm) en la placa inferior para evitar el deslizamiento de la muestra durante las pruebas reológicas. Se utilizó una trampa de disolvente para evitar la evaporación de la muestra durante los experimentos. La muestra caliente se colocó en la geometría precalentada (85 °C) inmediatamente después de su preparación, posteriormente se realizó un barrido de temperatura de 85 a 25 °C (1 °C/min) logrando la gelificación de la solución polimérica con CaCl_2 , posteriormente se realizó un barrido de tiempo a 1 rad/s y 25 °C, hasta alcanzar el estado estacionario en el módulo de almacenamiento y módulo de pérdida (30 minutos). Después se realizó un barrido de frecuencia de 10^{-2} a 10^2 rad/s a 25 °C a deformación constante (0.3 % - 0.7 %). Finalmente se llevó a cabo un barrido de deformación de 0 a 30 %, a 1 rad/s y 25 °C, para verificar que las pruebas realizadas se llevaron a cabo dentro de la zona de viscoelasticidad lineal (ver anexo C). Todas las muestras se procesaron por duplicado.

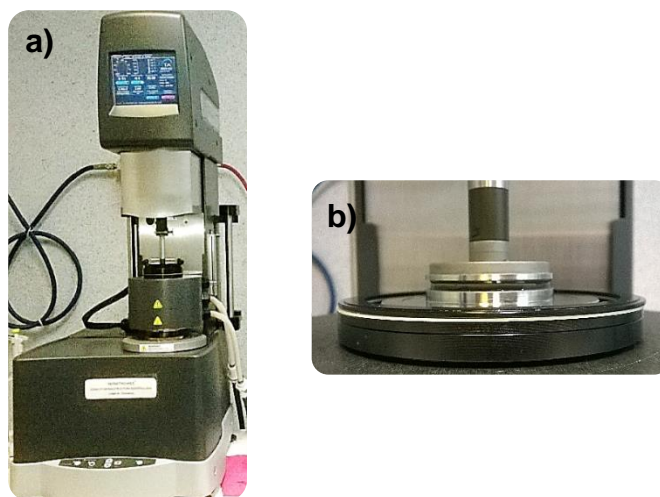


Figura 3. a) Reómetro ARES-G2 (TA Instruments, USA); b) geometría placa-placa (diámetro = 40 mm, $\Delta h = 3$ mm).

2.4. Proceso de relajación y parámetros de red

El tiempo de relajación, módulo de relajación y módulo de equilibrio se determinaron por regresión no lineal a través del Modelo Generalizado de Maxwell para G' (módulo de almacenamiento) ecuación (1), utilizando los datos obtenidos en el barrido de frecuencia realizado en las pruebas de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud.

$$G' = G_e + \sum_{i=1}^n G_i \frac{(\lambda_i \omega)^2}{1 + (\lambda_i \omega)^2} \quad (1)$$

El Modelo Generalizado de Maxwell resulta de la combinación paralela de n elementos de Maxwell (resortes lineales y amortiguadores) y una contribución puramente elástica denominada módulo de equilibrio, G_e (Figura 4), que tiene un valor finito para sólidos viscoelásticos y es nulo para líquidos viscoelásticos (Lapasin & Prici, 2020). Cada i^{th} elemento de Maxwell se caracteriza por un módulo de relajación (G_i) y el tiempo de relajación correspondiente (λ_i). El conjunto completo de G_i y λ_i es el espectro de relajación. En este estudio se usaron tres elementos de Maxwell ($n = 3$) para obtener el mejor ajuste del Modelo Generalizado de Maxwell a los datos experimentales. Los datos se ajustaron a la ecuación (1), utilizando el software SigmaPlot® v. 12.5 (Systat Software Inc.).

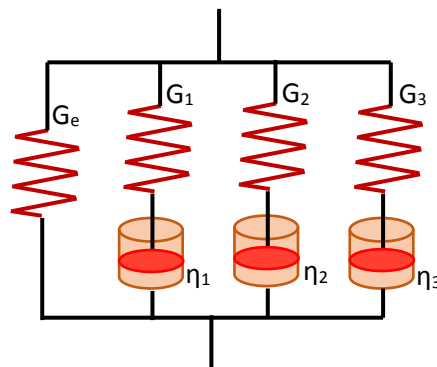


Figura 4. Representación esquemática del Modelo Generalizado de Maxwell con tres elementos.

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

De acuerdo con la teoría de Flory ([Grassi et al., 2009](#)), se determinó el valor del módulo de cizalla (G) como la suma de los valores de G_i obtenidos en cada elemento de Maxwell y G_e (Ecuación 2). Con el valor de G se estimó el valor de la densidad de entrecruzamiento (ρ_x) (Ecuación 3) y el tamaño de malla (ξ) (Ecuación 4).

$$G = G_e + \sum G_i \quad (2)$$

$$\rho_x = \frac{G}{RT} \quad (3)$$

$$\xi = \sqrt[3]{\frac{6}{\pi\rho_x N_A}} \quad (4)$$

Donde R es la constante universal de los gases ideales, T es la temperatura absoluta y N_A es el número de Avogadro.

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. pK_a

El valor de pK_a permite conocer el comportamiento de los grupos ionizables (-COOH) de gelana en disolución y en función del pH. En un valor de pH mayor que el pK_a, los grupos carboxilo permanecen en forma ionizada, favoreciendo la capacidad de absorción de agua, en un valor de pH=pK_a la mitad de los grupos funcionales se encuentran ionizados. El punto de equivalencia se define como la cantidad de NaOH requerida para neutralizar el ácido glucurónico presente en la disolución de gelana (Kaur & Kaur, 2018). En la Figura 5 se observa la variación del pH con la adición de NaOH en la solución de gelana, es posible realizar una estimación del punto de equivalencia de manera visual en la curva de titulación obtenida, para realizar una determinación más precisa, se graficaron las dependencias $(\Delta\text{pH}/\Delta\text{V})=f(\text{V})$ y $\Delta(\Delta\text{pH}/\Delta\text{V})=f(\text{V})$ con los datos obtenidos en la curva de valoración, como aproximaciones a las primera y segunda derivadas correspondientes.

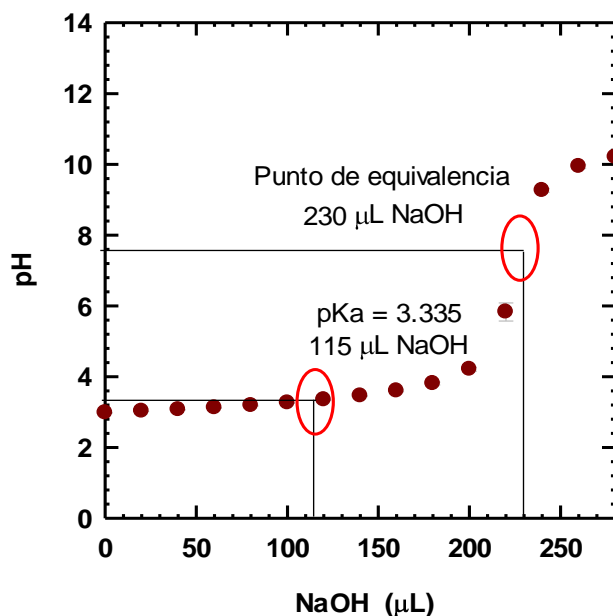


Figura 5. Curva de titulación potenciométrica en solución de gelana

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

En la Figura 6 se muestran los puntos de equivalencia obtenidos en las primera y segunda derivadas (230 μL de NaOH). Con el punto medio de equivalencia (230 $\mu\text{L}/2=115 \mu\text{L}$) se determinó el valor de pK_a (valor de pH correspondiente a 115 μL en la curva de titulación). El valor de pK_a obtenido para gelana fue 3.34 ± 0.02 , dado por el ácido glucurónico presente en su estructura. Se han reportado valores de pK_a para gelana similares al obtenido en este estudio, 3.1-3.5 (Fiorica et al., 2020; Morris et al., 2012; Prezotti, Cury, & Evangelista, 2014; Vleugels, Ricois, Voets, & Tuinier, 2018).

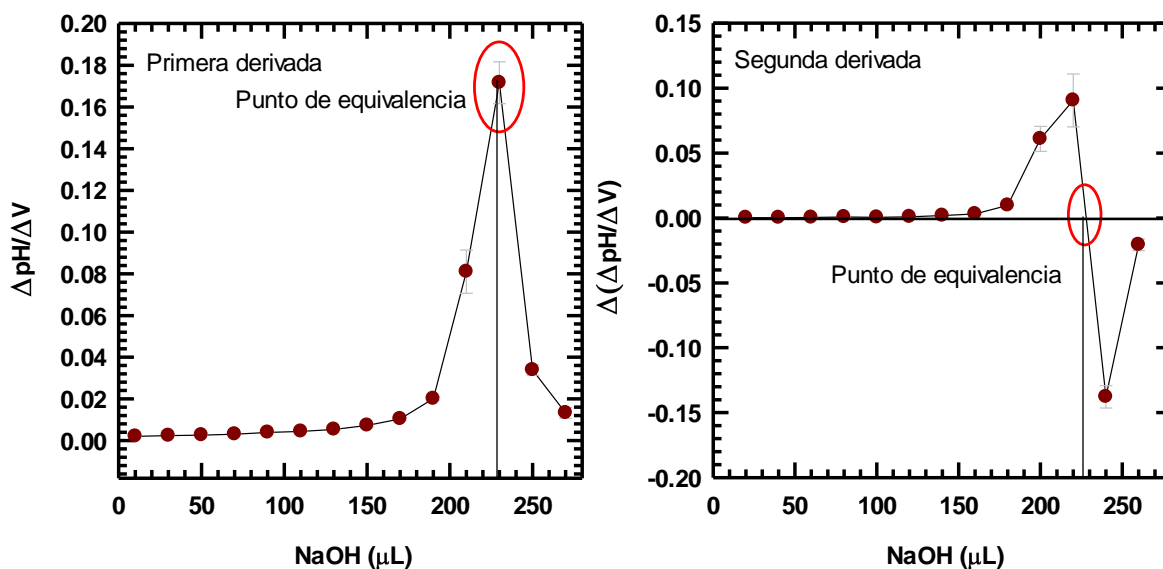


Figura 6. Punto de equivalencia, primera y segunda derivada.

En la Tabla 2 se muestran los valores de pH obtenidos en cada uno de los hidrogeles de gelana estudiados en este trabajo. Todos los hidrogeles presentaron valores de pH mayores al pK_a de gelana (3.34 ± 0.02), estos resultados sugieren la presencia de moléculas de gelana disociadas, lo cual favorece la unión del calcio a los sitios aniónicos de este polisacárido.

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

Tabla 2. Valores de pH obtenidos en cada sistema gelana – CaCl₂

Gelana (g/100 g)	pH				
	CaCl ₂ (mM)				
	3	5	7	10	12
0.3	5.48 ± 0.04	5.39 ± 0.02	5.93 ± 0.00	6.17 ± 0.05	5.83 ± 0.02
0.5	5.19 ± 0.03	5.16 ± 0.03	5.25 ± 0.05	5.34 ± 0.02	5.22 ± 0.07
0.7	5.11 ± 0.02	5.03 ± 0.06	5.19 ± 0.05		

3.2. Estudio reológico

3.2.1. Barrido de temperatura

La temperatura de gelificación (T_{gel}) se fundamentó en observar el punto donde inicia el incremento del módulo de almacenamiento (G'). En la figura 7 se muestra un ejemplo del criterio establecido para la determinación de T_{gel} , en esta figura se observa la variación de G' durante el enfriamiento de una disolución 0.5 gelana – 5 mM, de 85 a 34.8 °C, el valor del módulo de almacenamiento es muy cercano a cero, debido a que a temperaturas altas previo a la transición sol-gel, la gelana en disolución se encuentra en forma desordenada como cadenas aleatorias (Nickerson, Paulson, & Speers, 2003), a partir de 34.8 °C hay un incremento abrupto en G' , lo que sugiere el inicio de la gelificación, efectuándose un cambio conformacional desorden-orden con la formación de dobles hélices y la asociación de estas mediante interacciones iónicas y enlaces de hidrógeno, formando un sistema de redes tridimensionales estables (Nickerson et al., 2003; Paulsson, Hägerström, & Edsman, 1999). Tang, Tung, & Zeng (1997a) establecieron un criterio similar al de este estudio para la determinación de la temperatura de gelificación en muestras de gelana con diferentes concentraciones iónicas de cationes monovalentes y divalentes, estos autores dibujaron una línea tangente en el punto donde la pendiente de la curva G' era más pronunciada y extendieron esta línea para interceptar el eje horizontal, este punto de intercepción marca, de acuerdo a los autores, la temperatura de transición sol-gel (ver figura 8). Por otro lado, García,

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

Alfaro, Calero, & Muñoz en 2011, determinaron la temperatura de transición de muestras de gelana con diferentes concentraciones de NaCl y establecieron la temperatura de transición al observar un aumento rápido en el valor del módulo de almacenamiento.

Se determinó T_{gel} para todos los tratamientos de gelana propuestos en este estudio, las temperaturas de gelificación se analizarán a continuación, pero en general se obtuvo un comportamiento similar al descrito en la figura 7. El anexo A presenta los barridos de temperatura de todos los sistemas examinados y el valor de T_{gel} determinado en cada caso.

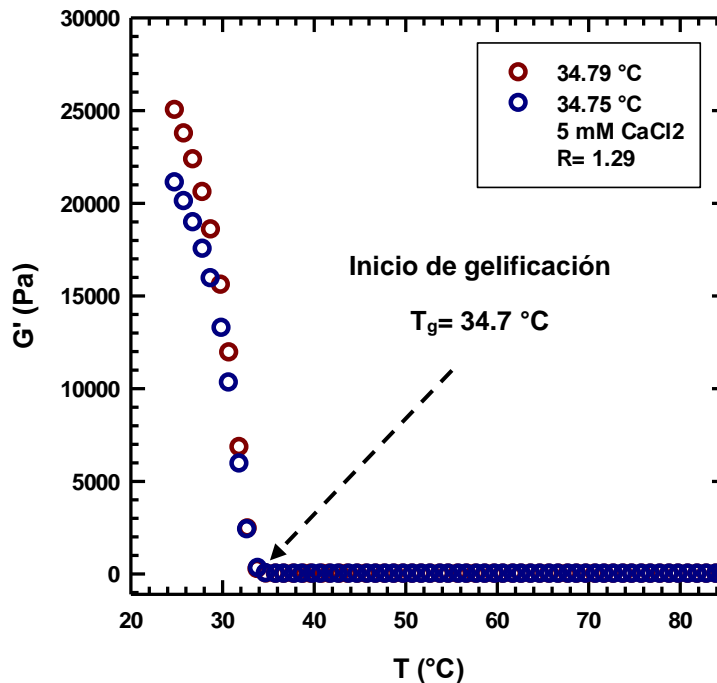


Figura 7. Variación de G' durante el enfriamiento (0.5 g/100 g gelana – 5 mM $CaCl_2$). Determinaciones realizadas por duplicado, símbolos rojos= primera réplica; símbolos azules= segunda réplica. Determinaciones realizadas a 1 rad/s dentro de la zona de viscoelasticidad lineal, usando una tasa de enfriamiento de 1 °C/min. R representa la relación Ca^{2+} (meq·L⁻¹)/gelana (meq·L⁻¹).

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

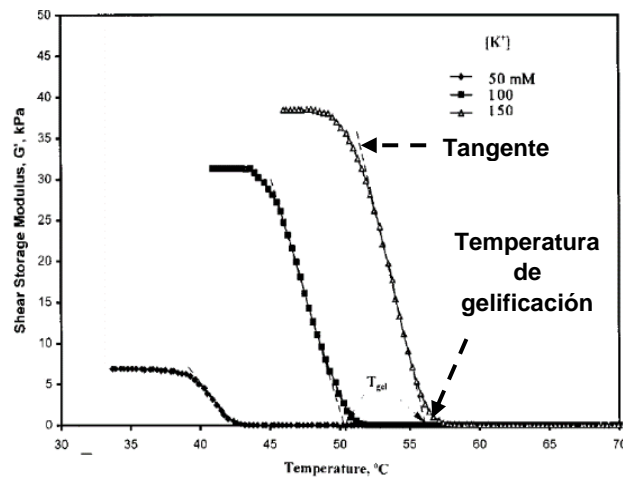


Figura 8. Variación de G' durante el enfriamiento de disoluciones de gelana 1 g/100 g con diferentes concentraciones de K⁺, usando una tasa de enfriamiento de 0.6 °C/min (J Tang et al., 1997a).

En la figura 9a se muestran las temperaturas de gelificación para cada una de las concentraciones de gelana 0.3, 0.5, 0.7 g/100 g y CaCl₂ (mM): 3, 5, 7, 10, y 10. En este gráfico se observa que la temperatura de gelificación aumenta notablemente con el incremento en la concentración polimérica y la concentración de CaCl₂. En el tratamiento de 0.5 g/100 g gelana se observa que en 10 y 12 mM CaCl₂ hay una disminución de la pendiente donde las temperaturas de gelificación son similares. En la figura 9b se observa que la temperatura de gelificación aumenta al aumentar R en cada una de las concentraciones de gelana.

Se han reportado diversos estudios sobre temperaturas de transición sol-gel en disoluciones de gelana con un amplio intervalo de concentraciones iónicas y poliméricas (Dai, Liu, Liu, & Tong, 2008; Dai, Liu, & Tong, 2010; Paulsson et al., 1999; Pérez-Campos et al., 2012; G Sworn, Sanderson, & Gibson, 1995; J Tang et al., 1997a; J Tang, Tung, & Zeng, 1997b), en algunos de estos estudios se evaluaron condiciones similares a las establecidas en este trabajo. Tang et al. (1997b) determinaron temperaturas de gelificación de disoluciones de gelana 0.4 y 0.6 g/100 g y concentraciones iónicas de 2 a 8 mM Ca²⁺, estos autores obtuvieron temperaturas de gelificación entre 30 y 44 °C, resultados similares a los obtenidos en este estudio ya que con concentraciones de 0.3 a 0.7 g/100 g gelana y de 3 a 10

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

mM de CaCl_2 (6 a 12 mM Ca^{2+}) se obtuvieron temperaturas de gelificación de 29 a 44°C.

Paulsson et al., 1999, estudiaron el comportamiento reológico de disoluciones de gelana con diferentes concentraciones iónicas, simulando el fluido lagrimal, parte de sus estudios fue la determinación de la temperatura de cambio configuracional como la temperatura donde ocurre la transición de solución polimérica con cadenas desordenadas a dobles hélices, el barrido de temperatura se realizó de 90 a 5 °C, estos autores reportan una temperatura de cambio configuracional en disoluciones poliméricas 0.5 g/100 g de 28°C con 0.6 mM de Ca^{2+} y 30.5°C con 1.7 mM de Ca^{2+} , en el presente estudio se obtuvo una temperatura cercana a 31 °C con 0.5 g/100 g gelana y 3 mM de CaCl_2 , temperatura ligeramente mayor a la obtenida por estos autores debido a una mayor concentración iónica.

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

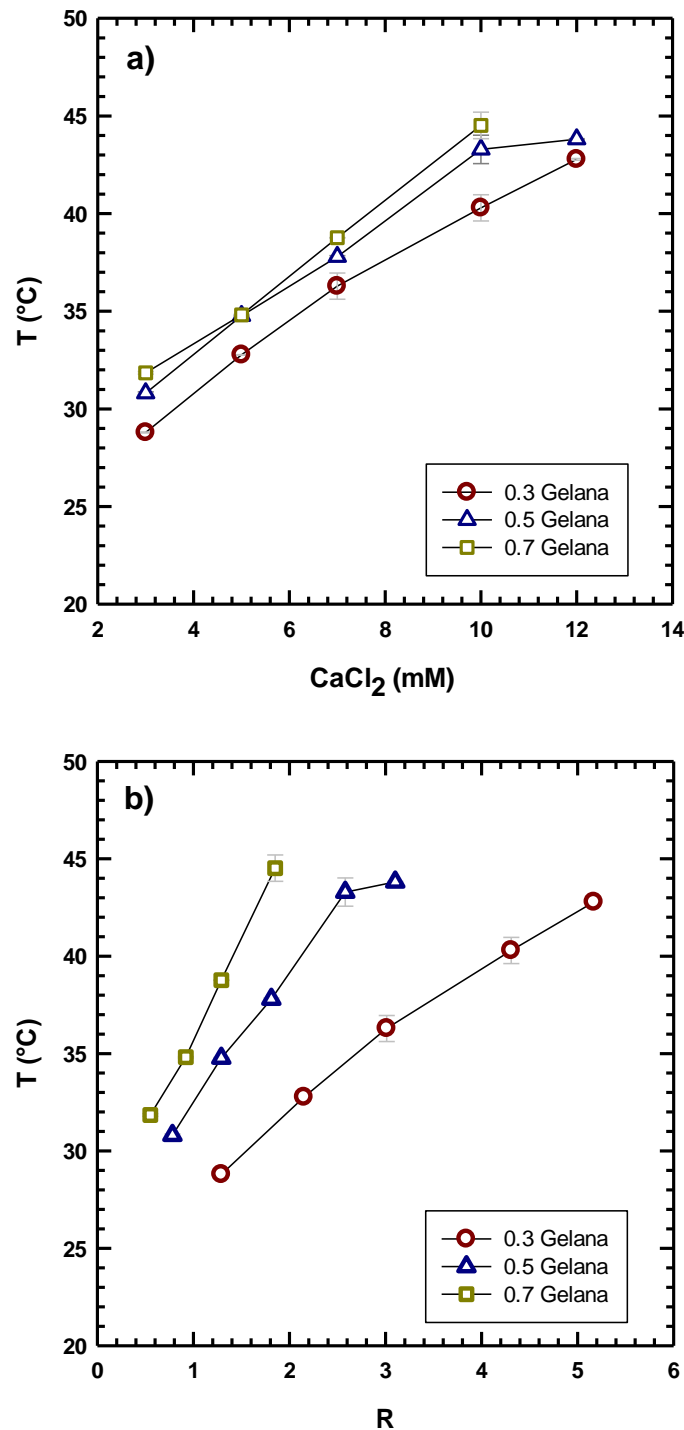


Figura 9. Temperaturas de gelificación determinadas durante el enfriamiento de disoluciones de **gelana 0.3, 0.5 y 0.7 g/100 g**; a) en función de la concentración de CaCl_2 , b) en función de R (Relación Ca^{2+} ($\text{meq}\cdot\text{L}^{-1}$)/gelana ($\text{meq}\cdot\text{L}^{-1}$)). Determinaciones realizadas a 1 rad/s dentro de la zona de viscoelasticidad lineal. Valores promedio de dos determinaciones independientes.

3.2.2. Barrido de tiempo

En el barrido de tiempo o “curado de gel” se monitorea la evolución de los módulos dinámicos con el tiempo, debido a los posibles cambios estructurales presentes en la muestra antes de llegar a un estado de equilibrio. La Figura 10 muestra la variación de $G'(1 \text{ rad/s})$ en función del tiempo después del enfriamiento de 85 a 25 °C de los sistemas gelana – CaCl_2 evaluados en este estudio (Tabla 1). En el tratamiento 0.3 gelana – 3 mM (Figura 10a) se observa una zona de transición en los primeros 400 s, indicando la continua formación y reordenamiento de las zonas de unión entre los iones calcio y los grupos carboxilo presentes en gelana, logrando llegar a un estado de pseudoequilibrio a los 1800 s, este comportamiento disminuyó al aumentar la concentración de CaCl_2 y la concentración de gelana (Figura 10). [Pérez-Campos et al., \(2012\)](#) estudiaron el proceso de gelificación de diferentes sistemas gelana – CaCl_2 , estos autores reportaron que la formación de gel en los sistemas que evaluaron estuvo dominada por la cinética de agregación de las dobles hélices de gelana, la cual se hizo progresivamente más lenta al disminuir la concentración de CaCl_2 , aumentando el comportamiento transitorio de G' . Por su parte, [Mohammed, Hember, Richardson, & Morris \(1998\)](#) reportaron un comportamiento similar con la disminución en la concentración polimérica en geles de agarosa al obtener una cinética de agregación hélice-hélice más lenta con la reducción en la concentración del polisacárido. En los demás tratamientos la concentración iónica y polimérica en el medio fueron suficientes para lograr una cinética de gelificación rápida, se considera que las concentraciones de CaCl_2 evaluadas en este trabajo son relativamente altas en comparación con otros estudios (0.25 – 2.5 mM CaCl_2) ([Dai et al., 2010](#); [Nickerson et al., 2003](#); [Paulsson et al., 1999](#); [Pérez-Campos et al., 2012](#)). Los sistemas correspondientes a 5, 7, 10 y 12 mM CaCl_2 mantuvieron prácticamente un estado de equilibrio durante los 30 minutos de envejecimiento del gel. Incluso, las concentraciones más altas de CaCl_2 en 0.7 g/100 g gelana generaron una gelificación instantánea, aún a temperaturas altas (>80 °C), por lo tanto, fueron excluidas de este estudio por las dificultades

técnicas para evaluar sus propiedades reológicas siguiendo el protocolo experimental que se ha descrito.

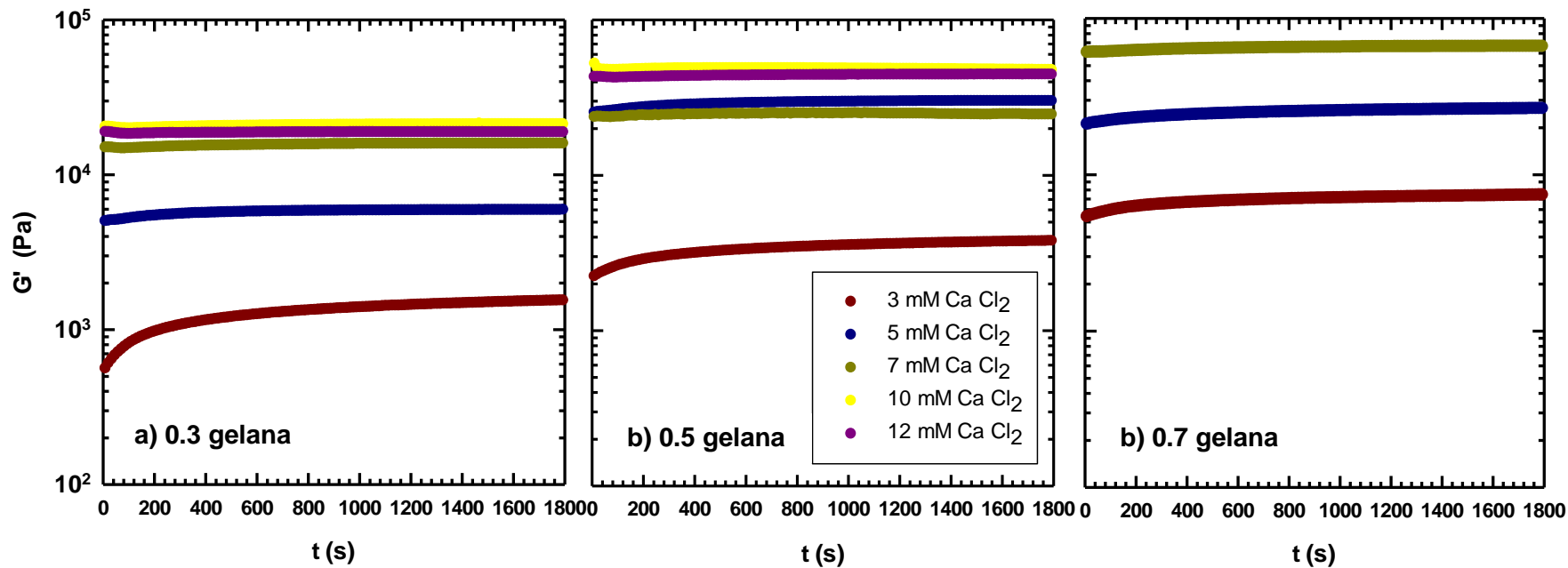


Figura 10. Variación de G' con el tiempo para sistemas: **0.3, 0.5 y 0.7 g/100 g gelana** con 3, 5, 7, 10 y 12 mM CaCl_2 . Los datos fueron obtenidos a 25 °C dentro de la zona de viscoelasticidad lineal. Valores promedio de dos determinaciones independientes.

3.2.3. Barrido de frecuencia

En la figura 11a se muestran los espectros mecánicos para los sistemas de 0.3 g/100 g gelana con las distintas concentraciones de CaCl₂ que se examinaron (3, 5, 7, 10 y 12 mM CaCl₂), en todos los sistemas se obtuvieron hidrogeles con apariencia física de “sólido autosostenible”, en todos los tratamientos se muestra claramente el comportamiento de un sólido viscoelástico típico de un gel fuerte, ya que el módulo de almacenamiento (G') es mayor al módulo de pérdida (G'') en más de una orden de magnitud. G' se mantuvo prácticamente independiente de la frecuencia en el rango experimental estudiado. Los valores más altos en los módulos dinámicos (valor a 1 rad/s) fueron G'= 20,527.55 Pa y G''= 258.87 Pa correspondientes a 0.3 gelana – 10 mM y los más bajos fueron G'= 1,672.64 Pa y G''= 16.45 Pa para 0.3 gelana – 3 mM, la diferencia del valor de los módulos dinámicos entre estas muestras es de 18,854.91 Pa para el módulo de almacenamiento y 242.42 Pa para el módulo de pérdida, diferencia significativa, sin embargo tan δ (= G''/G') mostró valores bajos y similares en todas las muestras (0.009 < tan δ < 0.044) (figura 11b), lo que confirma la naturaleza sólida-viscoelástica de los hidrogeles analizados. Los sistemas 0.5 g/100 g gelana y 0.7 g/100 g gelana presentaron características de gel similares a las descritas anteriormente para 0.3 g/100 g gelana, los valores más bajos y altos en los módulos dinámicos correspondientes a los sistemas 0.5 gelana – CaCl₂ corresponden a 3 mM CaCl₂ (G'= 3,883.62 Pa, G''= 44.05) y 10 mM CaCl₂ (G'= 45,565.9 Pa, G'' =777.71 Pa) respectivamente y 3 mM CaCl₂ (G'= 7,761.03 Pa, G''= 84.14 Pa) y 7 mM CaCl₂ (G'= 64,710 Pa, G'' = 734.47 Pa) para los sistemas 0.7 gelana – CaCl₂. En el anexo B se muestran los espectros mecánicos de los sistemas correspondientes a 0.5 gelana – CaCl₂ y 0.7 gelana – CaCl₂, llama la atención el valor de G' en sistemas con CaCl₂ > 5 mM, este módulo alcanzó valores superiores a 10⁴ Pa, lo cual confirma la habilidad de gelana de bajo acilo para interactuar con iones calcio y formar geles rígidos.

La figura 12 muestra la variación de G' (valor a 1 rad/s) para 0.3, 0.5 y 0.7 g/100 g gelana en función de la concentración de CaCl₂ (3, 5, 7, 10 y 12 mM). El

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

valor del módulo de almacenamiento aumentó aproximadamente 12 veces con el incremento en el contenido iónico de 3 a 10 mM CaCl₂ en los sistemas con 0.3 y 0.5 g/100 g gelana, este mismo comportamiento ha sido reportado por diferentes autores en sistemas de gelana (García, Trujillo, Muñoz, & Alfaro, 2018; Paulsson et al., 1999; Pérez-Campos et al., 2012).

En el mecanismo de gelificación de gelana las cadenas simples forman dobles hélices, las cuales se agregan para formar redes tridimensionales, los cationes divalentes estabilizan las redes entrecruzando las dobles hélices directamente mediante enlaces iónicos (doble hélice - Ca²⁺ - doble hélice) (Chandrasekaran & Thailambal, 1990). La formación de uniones diméricas mediadas por Ca²⁺ entre hélices dobles de gelana tienen simetría triple, por lo tanto, se requeriría la presencia de 1/3 de equivalencia estequiométrica de cationes unidos al sitio (Morris et al., 2012). De acuerdo con los valores de R (ver Tabla 1), en todos los tratamientos hay suficiente cantidad de iones para favorecer los sitios de unión con los grupos carboxilo de gelana, logrando una gelificación rápida y generando la formación de una red tridimensional estable y permanente. En la figura 12 se observa un aumento gradual en el carácter elástico con el incremento en la concentración iónica reflejado en una disminución de la pendiente hasta llegar a un estado de meseta de 10 a 12 mM CaCl₂ en los sistemas con 0.3 y 0.5 g/100 g gelana, este último comportamiento sugiere la formación de fuerzas repulsivas en las zonas de unión de gelana por un exceso de iones en las inmediaciones de grupos carboxilo de gelana, generando un gel debilitado (Pérez-Campos et al., 2012; Juming Tang, Tung, & Zeng, 1996). Otros autores han informado que un exceso en el contenido de cationes reduce el valor de los módulos dinámicos (Morris et al., 2012), debido a que la solubilidad del polisacárido disminuye y la posible generación de agregados insolubles del polímero que actúan como núcleos heterogéneos formando microgeles que se interconectan creando una red debilitada (Paulsson et al., 1999).

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

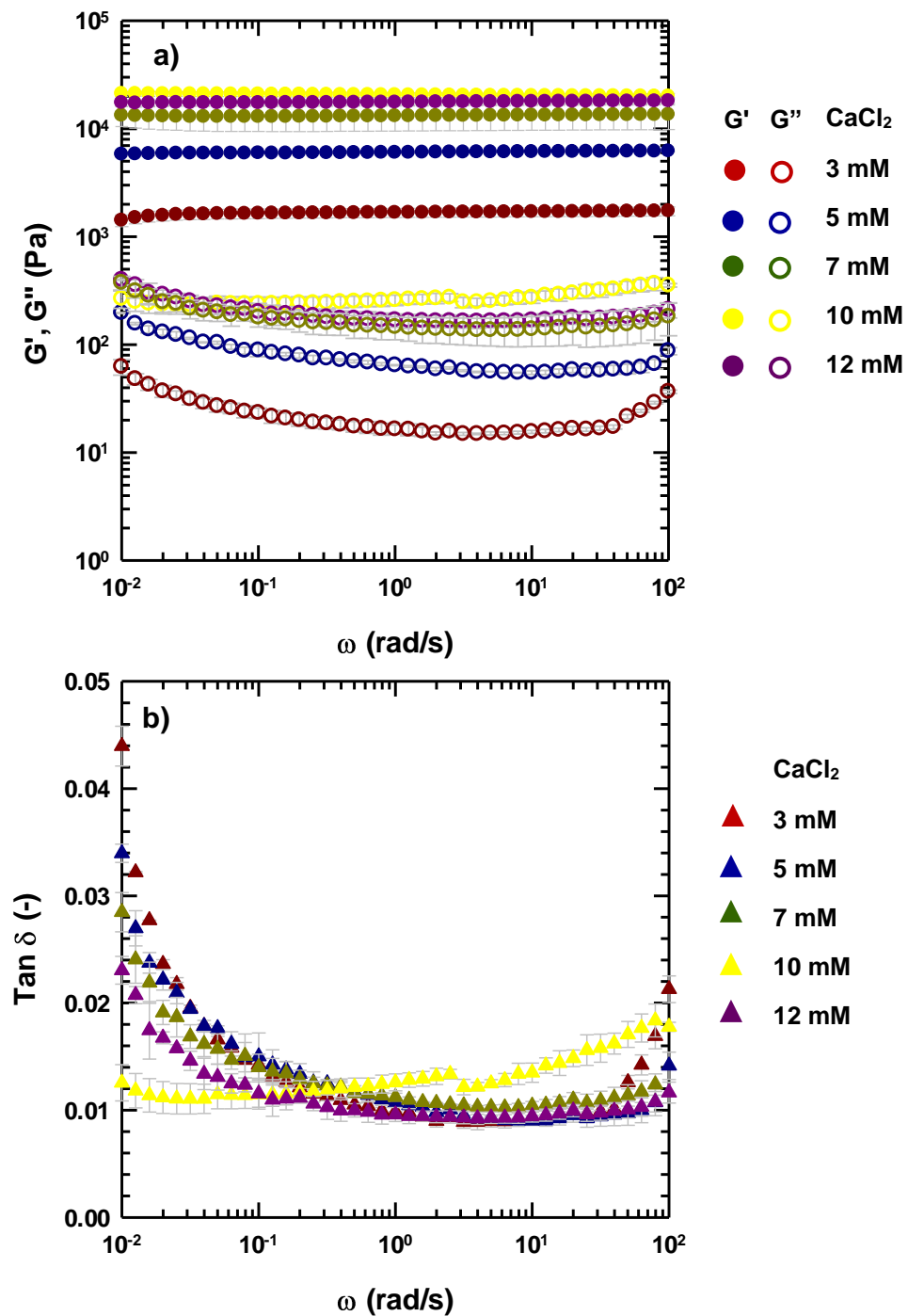


Figura 11. a) Espectros mecánicos para sistemas de 0.3 g/100 g gelatina – CaCl₂. G' (ω); (símbolos llenos), G'' (ω); (símbolos vacíos); b) Variación de $\tan \delta$ con la frecuencia angular para sistemas de gelatina. Los datos fueron obtenidos dentro de la zona de viscoelasticidad lineal. Valores promedio de dos determinaciones independientes.

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

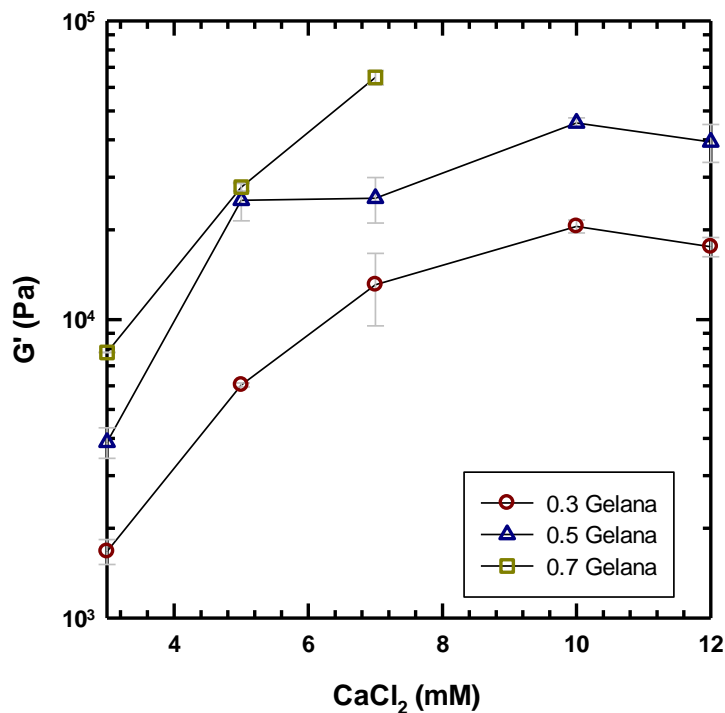


Figura 12. Variación de módulo de almacenamiento en función de la concentración de CaCl_2 . Los valores representan el promedio de G' a $\omega = 1 \text{ rad/s}$. Los datos fueron obtenidos dentro de la zona de viscoelasticidad lineal. Valores promedio de dos determinaciones independientes.

3.3. Proceso de relajación y parámetros de red

La viscoelasticidad es la combinación de propiedades viscosas y elásticas, describe el comportamiento de la mayoría de materiales reales (Malkin & Malkin, 1994), puede ser estudiada mediante pruebas de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud (SAOS); con los resultados obtenidos en estas pruebas y con la información obtenida de teorías moleculares poliméricas, como la teoría de Flory descrita anteriormente (Grassi et al., 2009), es posible inferir la organización e interacción macromolecular de hidrogeles a base de polímeros con estructura química conocida como los estudiados en el presente trabajo de investigación. La formación de redes tridimensionales en hidrogeles de gelana se debe a la presencia de interacciones físicas, principalmente interacciones ion-dipolo (puentes de calcio) y enlaces de hidrógeno. Debido al predominio de enlaces físicos, la formación y

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

ruptura de las zonas de unión suelen ser reversibles generando un reordenamiento dinámico de la red y durante los cambios conformacionales de la estructura, la energía puede disiparse generando un comportamiento viscoelástico. El Modelo Generalizado de Maxwell permite analizar e interpretar los resultados obtenidos en las pruebas de SAOS, este modelo está representado por un elemento puramente viscoso (η_i) y un cuerpo perfectamente elástico (G_i), por lo que el tiempo de relajación del elemento i definido como $\lambda_i = \eta_i/G_i$ es una medida del tiempo requerido para la relajación de la tensión (Ferry, 1980; Rivera-Hernández et al., 2023).

El tiempo de relajación es el tiempo requerido para que los esfuerzos internos de un material se disipen al dejar de aplicar un esfuerzo externo, la estructura del material se relaja hacia un estado estable (Caccavo et al., 2018; Lorenzo, Zaritzky, & Califano, 2013). Los resultados obtenidos en los barridos de frecuencia se analizaron satisfactoriamente aplicando el Modelo Generalizado de Maxwell y fue necesaria una combinación paralela de tres elementos de Maxwell para obtener un ajuste estadísticamente confiable ($R^2 = 0.99$) a los módulos de almacenamiento (G') en los barridos de frecuencia mostrados en la figura 13.

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

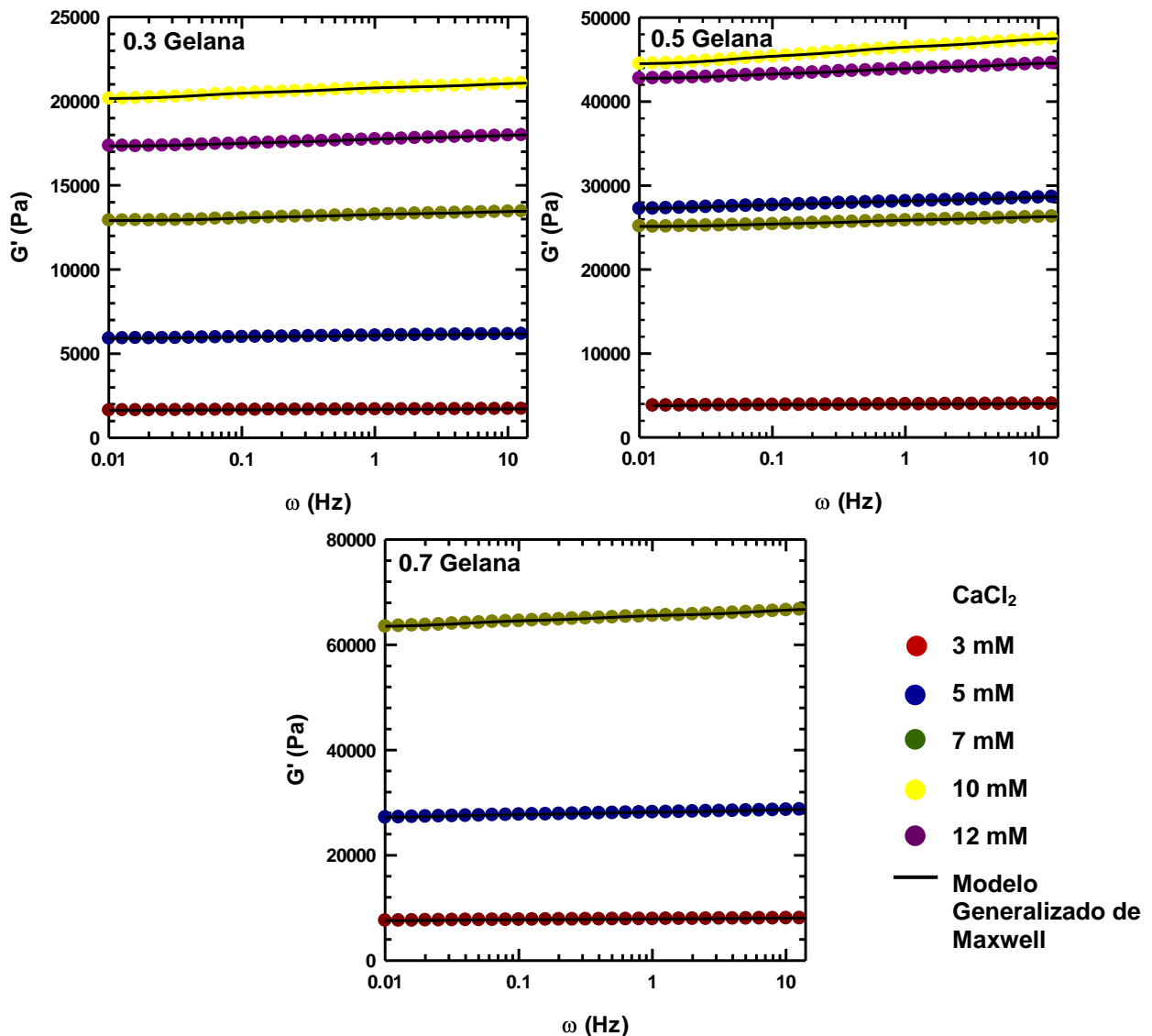


Figura 13. Módulo de almacenamiento ($G'(\omega)$) a 25 °C de hidrogeles de 0.3, 0.5 y 0.7 g/100 g gelatina – CaCl_2 . La línea representa el ajuste del Modelo Generalizado de Maxwell.

Los valores de los parámetros del proceso de relajación: módulo de equilibrio (G_e), módulo de cizalla (G), tiempo máximo de relajación o del primer elemento de Maxwell (λ_1), y los parámetros que caracterizan a la red de gelatina: densidad de entrecruzamiento (ρ_x) y tamaño de malla (ξ) se reportan en la Tabla 3. Los tiempos de relajación (λ_1) para los hidrogeles de gelatina fueron del orden de 10^1 s, $12.92 < \lambda_1 < 38.34$ s.

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

La figura 14 presenta los valores de λ_1 en función del valor R (Ca^{2+} /gelana) de los hidrogeles de gelana evaluados en el presente estudio, los cuales se caracterizaron por ser rígidos y estables (G' con valores grandes e independientes de la frecuencia de oscilación) debido a la formación de una estructura altamente ordenada. Los resultados sugieren reordenamientos de cadenas que se llevan a cabo en tiempos cada vez más cortos (de 38.34 s a 17.53 s) con el incremento de R (de 0.55 a 1.81), se ha reportado que en hidrogeles muy rígidos el tiempo de relajación tiende a disminuir debido al predominio de la elasticidad sobre las disipaciones viscosas ($\lambda = \eta/G$) (Caccavo et al., 2018). Aparentemente a partir de $R=1.81$ no se observan cambios importantes en el tiempo de relajación (entre 12.92 y 21.75 s), esto podría deberse a una disminución en la rigidez de los hidrogeles evaluados por el exceso de iones Ca^{2+} , incluso se esperaría que, al evaluar valores de R aún más altos, el tiempo de relajación aumentara debido a la debilidad en la red.

Los estudios relacionados con el tiempo de relajación de polímeros y específicamente en polímeros naturales aún son limitados. Se han reportado algunos estudios sobre el tiempo de relajación en hidrogeles de polímeros naturales tales como; alginato entrecruzado con CaCl_2 ($\lambda = 2.5 \times 10^{-2}$ s) (Abrami et al., 2014), goma guar y escleroglucano entrecruzado con bórax ($\lambda = 7.7 \times 10^{-3}$ s y $\lambda = 81.7 \times 10^{-3}$ s, respectivamente) (Coviello et al., 2013), xantana ($\lambda = 1.29 \times 10^3$ s), glucomanos ($\lambda = 0.46$ s), goma tara ($\lambda = 0.28$ s) y gelana sin agente de entrecruzamiento ($\lambda = 0.66$ s) (Fagioli et al., 2019). Evidentemente los resultados obtenidos en este estudio no son comparables a lo reportado en la literatura debido a las diferencias en las condiciones experimentales, principalmente la naturaleza y concentración de polímero, así como el agente entrecruzante, temperatura, pH, medio de disolución y modelo utilizado en la obtención del tiempo de relajación.

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

Tabla 3. Módulo de equilibrio (G_e), módulo de cizalla (G), tiempo de relajación máximo (λ_1), densidad de reticulación (ρ_x) y tamaño de malla (ξ) para sistemas de gelana – CaCl_2 .

	CaCl_2 (mM)	G_e (Pa)	G (Pa)	λ_1 (s)	ρ_x (mol/m³)	ξ (nm)
Gelana (g/100 g)						
0.3	3	1632.62	1729.19	27.01	0.698	16.57
0.3	5	5905.36	6182.09	18.40	2.494	10.83
0.3	7	12908.35	13505.77	12.92	5.448	8.35
0.3	10	20146.03	21129.22	20.71	8.523	7.19
0.3	12	17328.86	18034.69	16.50	7.275	7.58
0.5	3	3788.58	4032.32	29.31	1.627	12.49
0.5	5	27218.41	28728.58	25.72	11.589	6.49
0.5	7	25117.57	26367.08	17.35	10.636	6.68
0.5	10	44462.21	47604.21	21.75	19.203	5.49
0.5	12	42742.82	44695.25	19.45	18.030	5.60
0.7	3	7529.74	8052.10	38.34	3.248	9.92
0.7	5	27124.45	28751.00	32.64	11.598	6.49
0.7	7	63454.43	66949.83	26.33	27.007	4.90

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

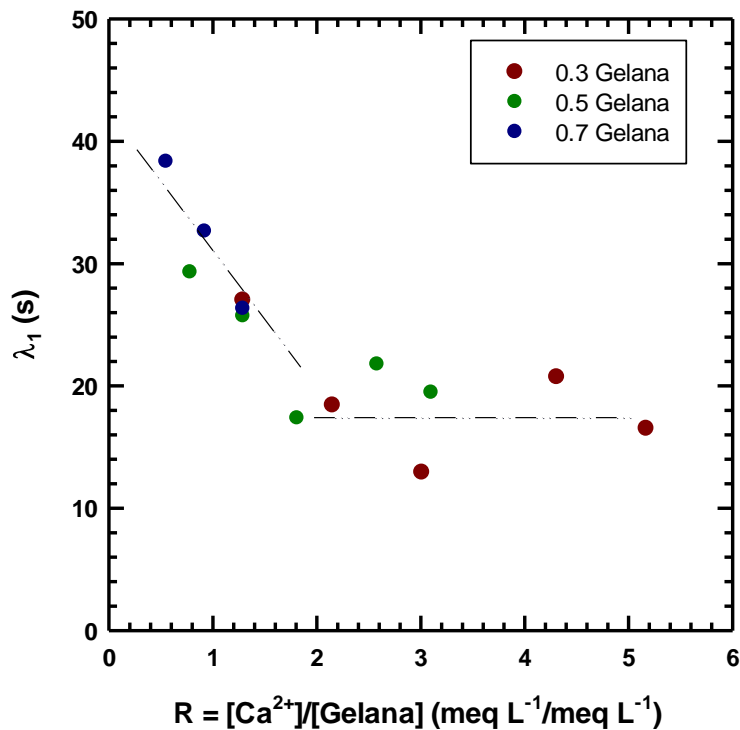


Figura 14. Tiempo de relajación máximo (λ_1) de hidrogeles de **0.3, 0.5 y 0.7 g/100 g gelatina** – CaCl_2 en función de la relación estequiométrica $R = [\text{Ca}^{2+}]/[\text{unidad tetrasacárida de gelatina}]$, ambos en $\text{meq}\cdot\text{L}^{-1}$.

La distribución del tamaño de malla en una red polimérica es uno de los factores más importantes a controlar en sistemas de liberación de compuestos activos. El tamaño de malla (ξ) se describe como la distancia lineal entre dos puntos de entrecruzamiento en la red, es una medida del espacio disponible entre las cadenas macromoleculares y está influenciado por la densidad de entrecruzamiento (ρ_x) (Caccavo et al., 2018). Fue posible determinar los parámetros de red mediante las ecuaciones descritas en la teoría de Flory (Ecuación 2). En la Tabla 3 se observa una disminución en el tamaño de malla (16.57 nm a 4.90nm) y valores cada vez más altos en la densidad de reticulación (0.698 mol/m³ a 27.007 mol/m³), módulo de equilibrio (1,632.62 Pa a 63,454.43 Pa) y módulo de corte (1729.19 Pa a 66,949.83 Pa) con el aumento en la concentración de CaCl_2 y gelatina, se ha reportado que

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

cuanto mayor sea ρ_x , menor será ξ y generalmente más rígido será el hidrogel (Caccavo et al., 2018).

En la figura 15 se presenta el comportamiento del tamaño de malla en función de la concentración iónica total del hidrogel (C_T), la cual fue calculada con la ecuación (5):

$$C_T = \gamma C_P + C_S \quad (5)$$

En donde C_P es la concentración de gelana ($\text{meq}\cdot\text{L}^{-1}$), C_S es la concentración de iones calcio adicionados ($\text{meq}\cdot\text{L}^{-1}$) y γ es el coeficiente de actividad para Ca^{2+} -gelana. En estudios previos (Pérez-Campos et al., 2012) se determinó $\gamma = 0.53$ a partir de estudios de la transición sol-gel de gelana (Milas & Rinaudo, 1996; Milas, Shi, & Rinaudo, 1993).

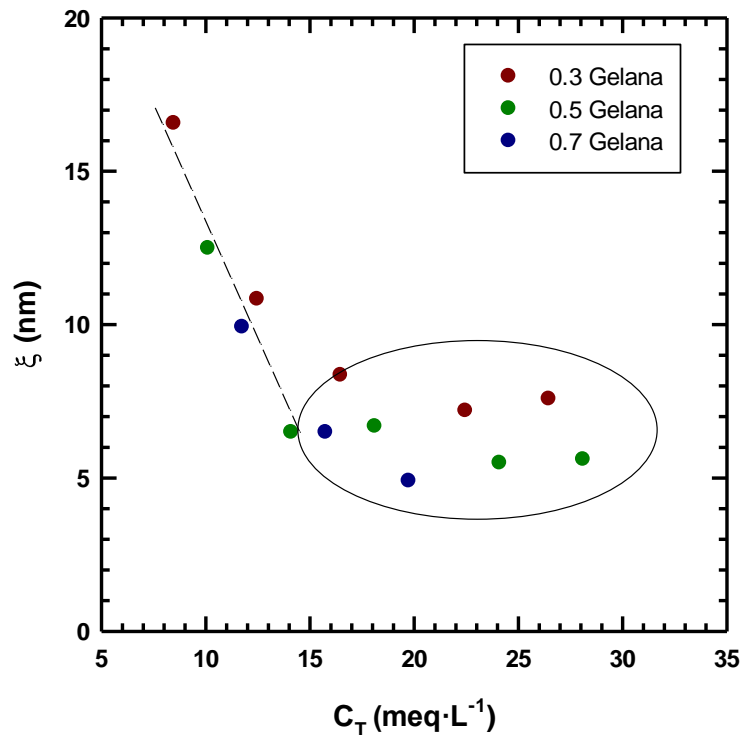


Figura 15. Tamaño de malla (ξ) en hidrogeles de **0.3, 0.5 y 0.7 g/100 g gelana** – CaCl_2 en función de la concentración iónica total, C_T .

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

La figura 15 muestra una evidente disminución en el tamaño de malla (de 16.57 a 6.49 nm) con el incremento en la concentración iónica total (de 8.45 a 14.1 meq·L⁻¹), valores superiores a 14.1 meq·L⁻¹, dieron lugar a sistemas donde el tamaño de malla no muestra un cambio notable y se mantiene en valores similares, entre 4.9 y 8.35 nm, estos resultados sugieren la formación de hidrogeles cada vez más densos al contener una mayor concentración iónica en el medio, con este comportamiento se confirma que el tamaño de malla está directamente relacionado con la densidad de entrecruzamiento y la rigidez de los hidrogeles. Sin embargo, el tamaño de malla se mantiene prácticamente igual al llegar a una concentración iónica total “crítica” en donde los valores de ξ ya no muestran un cambio importante, estos resultados sugieren un exceso de iones calcio presentes en el sistema y por lo tanto aunque la concentración iónica total sea mayor, los grupos carboxilo de gelatina no pueden interactuar con la cantidad total de iones calcio presentes en el medio, este hecho imposibilita la formación de una red más entrecruzada. Estos resultados coinciden con los espectros mecánicos obtenidos en las pruebas viscoelásticas, por ejemplo, en los barridos de frecuencia observados en la figura 11a correspondientes a 0.3 g/100 g gelatina, el cambio más sobresaliente en el módulo de almacenamiento es de 3 a 5 mM, posteriormente en 7, 10 y 12 mM, G' parece mantener valores similares, incluso una ligera disminución de 10 a 12 mM CaCl₂ por el exceso de iones calcio presentes en el medio como se ha discutido anteriormente.

La caracterización de hidrogeles permite obtener información valiosa acerca de su estructura y de esta manera obtener las propiedades deseadas para alguna aplicación en específico. [Kopač, Abrami, Grassi, Ručigaj, & Krajnc \(2022\)](#) evaluaron hidrogeles a base de mezclas de LAP (laponita)–ALG (alginato de sodio), LAP–TOCNF (nanocelulosa modificada), SCLG (escleroglucano)–ALG para la liberación de teofilina y DNA GT15H, estos autores observaron un incremento en la densidad de entrecruzamiento, alcanzando valores de 1 a 5 × 10⁻⁶ mol/cm³, con el aumento en la concentración de Ca²⁺ (0.25 a 1 g/100 g). Otros estudios han descrito la caracterización de hidrogeles a base de polímeros naturales como alginato (2 g/100 g)–CaCl₂ (ξ : 12 nm, ρ_x : 18.6×10⁻⁷ mol/cm³, G: 67099 Pa) ([Abrami et al., 2014](#)), goma

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

guar (0.7 g/100 mL)–bórax (ξ : 36.5 nm, ρ_x : 6.5×10^{-8} mol/cm³, G: 162 Pa) y escleroglucano (0.7 g/100 mL)–bórax (ξ : 61.6 nm, ρ_x : 1.4×10^{-8} mol/cm³, G: 33.6 Pa) (Coviello et al., 2013) con la finalidad de diseñar sistemas de liberación de fármacos.

4. CONCLUSIONES

Con base a los resultados se puede concluir lo siguiente:

El estudio reológico permitió dar respuesta al interés por conocer las propiedades viscoelásticas lineales de hidrogeles de gelana entrecruzados con CaCl₂, las concentraciones iónicas y poliméricas evaluadas generaron la formación inmediata de redes tridimensionales estables y permanentes, de acuerdo con el análisis de los espectros mecánicos, se pudo apreciar el efecto detonante del CaCl₂ en la estructuración de hidrogeles, a partir de 7 mM CaCl₂ no se observó un aumento notable en los módulos dinámicos de 0.3 y 0.5 g/100 g gelana, incluso, se pudo apreciar una ligera disminución de G' y G'' con 12 mM CaCl₂, este es un indicativo de las altas concentraciones de CaCl₂ analizadas en este estudio, por esta razón se eligieron 3 y 5 mM CaCl₂ como concentraciones iónicas para la evaluación de hidrogeles binarios, gelana-pectina. Se comprobó que el Modelo Generalizado de Maxwell predice satisfactoriamente los datos viscoelásticos de los hidrogeles evaluados con la aplicación de tres elementos, valores útiles en la determinación del tiempo de relajación.

Los hidrogeles de gelana presentaron tiempos de relajación de 12.92 a 38.34 s. Se observó una disminución en su tamaño de malla (16.57 nm a 4.90 nm) y un incremento en la densidad de reticulación (0.698 mol/m³ a 27.007 mol/m³) al aumentar la concentración iónica total (Ca⁺² + gelana). Es altamente recomendable fortalecer el estudio de los parámetros antes mencionados con análisis de microscopía para poder interpretar la organización estructural de las redes de gelana, lo cual se sugiere para trabajos posteriores.

En este estudio se avanzó con el diseño de hidrogeles de gelana que sirvan como plataformas tecnológicas para el desarrollo de sistemas de entrega en los

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

campos de la tecnología alimentaria, farmacéutica, biomédica y de envasado biodegradable, en los cuales es posible incorporar un compuesto activo a la matriz polimérica, los conocimientos obtenidos en este trabajo de investigación son determinantes para la selección de un compuesto activo con un tamaño molecular adecuado de acuerdo a las necesidades de cada aplicación.

5. REFERENCIAS

- Abrami, M., D’Agostino, I., Milcovich, G., Fiorentino, S., Farra, R., Asaro, F., . . . Grassi, M. (2014). Physical characterization of alginate–Pluronic F127 gel for endoluminal NABDs delivery. *Soft Matter*, *10*(5), 729-737.
- Agnello, S., Palumbo, F. S., Pitarresi, G., Fiorica, C., & Giammona, G. (2018). Synthesis and evaluation of thermo-rheological behaviour and ionotropic crosslinking of new gellan gum-alkyl derivatives. *Carbohydrate polymers*, *185*, 73-84.
- Caccavo, D., Cascone, S., Lamberti, G., & Barba, A. (2018). Hydrogels: experimental characterization and mathematical modelling of their mechanical and diffusive behaviour. *Chemical Society Reviews*, *47*(7), 2357-2373.
- Caló, E., & Khutoryanskiy, V. V. (2015). Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*, *65*, 252-267.
- Coviello, T., Matricardi, P., Alhaique, F., Farra, R., Tesei, G., Fiorentino, S., . . . Grassi, M. (2013). Guar gum/borax hydrogel: rheological, low field NMR and release characterizations. *Express Polymer Letters*, *7*(9), 733-746.
- Coviello, T., Matricardi, P., Marianecchi, C., & Alhaique, F. (2007). Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *Journal of controlled release*, *119*(1), 5-24.
- Chandrasekaran, R., & Thailambal, V. (1990). The influence of calcium ions, acetate and L-glycerate groups on the gellan double-helix. *Carbohydrate polymers*, *12*(4), 431-442.
- Chen, J., Chen, W., Duan, F., Tang, Q., Li, X., Zeng, L., . . . Jia, L. (2019). The synergistic gelation of okra polysaccharides with kappa-carrageenan and its influence on gel rheology, texture behaviour and microstructures. *Food Hydrocolloids*, *87*, 425-435.
- Dai, L., Liu, X., Liu, Y., & Tong, Z. (2008). Concentration dependence of critical exponents for gelation in gellan gum aqueous solutions upon cooling. *European Polymer Journal*, *44*(12), 4012-4019.
- Dai, L., Liu, X., & Tong, Z. (2010). Critical behavior at sol–gel transition in gellan gum aqueous solutions with KCl and CaCl₂ of different concentrations. *Carbohydrate polymers*, *81*(2), 207-212.
- Das, M., & Giri, T. K. (2020). Hydrogels based on gellan gum in cell delivery and drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *56*, 101586.
- de Oliveira Cardoso, V. M., Cury, B. S. F., Evangelista, R. C., & Gremião, M. P. D. (2017). Development and characterization of cross-linked gellan gum and retrograded starch blend hydrogels for drug delivery applications. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *65*, 317-333.
- Eckmann, D., Composto, R., Tsourkas, A., & Muzykantov, V. (2014). Nanogel carrier design for targeted drug delivery. *Journal of materials chemistry B*, *2*(46), 8085-8097.
- Fagioli, L., Pavoni, L., Logrippo, S., Pelucchini, C., Rampoldi, L., Cespi, M., . . . Casettari, L. (2019). Linear viscoelastic properties of selected polysaccharide

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

- gums as function of concentration, pH, and temperature. *Journal of food science*, 84(1), 65-72.
- Ferreira, N., Ferreira, L., Cardoso, V., Boni, F., Souza, A., & Gremião, M. (2018). Recent advances in smart hydrogels for biomedical applications: From self-assembly to functional approaches. *European Polymer Journal*, 99, 117-133.
- Ferry, J. D. (1980). *Viscoelastic properties of polymers*: John Wiley & Sons.
- Fiorica, C., Pitarresi, G., Palumbo, F. S., Mauro, N., Federico, S., & Giammona, G. (2020). Production and physicochemical characterization of a new amine derivative of gellan gum and rheological study of derived hydrogels. *Carbohydrate polymers*, 236, 116033.
- Fitzsimons, S. M., Tobin, J. T., & Morris, E. R. (2008). Synergistic binding of konjac glucomannan to xanthan on mixing at room temperature. *Food Hydrocolloids*, 22(1), 36-46.
- Florjancic, U., Zupancic, A., & Zumer, M. (2002). Rheological characterization of aqueous polysaccharide mixtures undergoing shear. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 16(3), 105-118.
- Freitas, C. M. P., Coimbra, J. S. R., Souza, V. G. L., & Sousa, R. C. S. (2021). Structure and Applications of Pectin in Food, Biomedical, and Pharmaceutical Industry: A Review. *Coatings*, 11(8). doi: 10.3390/coatings11080922
- García, M. C., Alfaro, M. C., Calero, N., & Muñoz, J. (2011). Influence of gellan gum concentration on the dynamic viscoelasticity and transient flow of fluid gels. *Biochemical engineering journal*, 55(2), 73-81.
- García, M. C., Trujillo, L. A., Muñoz, J., & Alfaro, M. C. (2018). Gellan gum fluid gels: influence of the nature and concentration of gel-promoting ions on rheological properties. *Colloid and Polymer Science*, 296, 1741-1748.
- Grassi, M., Lapasin, R., Coviello, T., Matricardi, P., Di Meo, C., & Alhaique, F. (2009). Scleroglucan/borax/drug hydrogels: Structure characterisation by means of rheological and diffusion experiments. *Carbohydrate polymers*, 78(3), 377-383.
- Kaur, J., & Kaur, G. (2018). Optimization of pH conditions and characterization of polyelectrolyte complexes between gellan gum and cationic guar gum. *Polymers for Advanced Technologies*, 29(12), 3035-3048.
- Kopač, T., Abrami, M., Grassi, M., Ručigaj, A., & Krajnc, M. (2022). Polysaccharide-based hydrogels crosslink density equation: A rheological and LF-NMR study of polymer-polymer interactions. *Carbohydrate polymers*, 277, 118895.
- Lapasin, R., & Pricl, S. (2020). *Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications*: Springer.
- Li, D.-Q., Xu, F., & Li, J. (2022). Chapter 4 - Pectin-based micro- and nanomaterials in drug delivery. In S. Jana & S. Jana (Eds.), *Micro- and Nanoengineered Gum-Based Biomaterials for Drug Delivery and Biomedical Applications* (pp. 97-125): Elsevier.
- Li, X., Dong, Y., Guo, Y., Zhang, Z., Jia, L., Gao, H., . . . Duan, F. (2019). Okra polysaccharides reduced the gelling-required sucrose content in its synergistic gel with high-methoxyl pectin by microphase separation effect. *Food Hydrocolloids*, 95, 506-516.

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

- Löfgren, C., & Hermansson, A.-M. (2007). Synergistic rheological behaviour of mixed HM/LM pectin gels. *Food Hydrocolloids*, 21(3), 480-486.
- Lorenzo, G., Zaritzky, N., & Califano, A. (2013). Rheological analysis of emulsion-filled gels based on high acyl gellan gum. *Food Hydrocolloids*, 30(2), 672-680.
- Malkin, A., & Malkin, A. Y. (1994). *Rheology fundamentals*: ChemTec publishing.
- Marras-Marquez, T., Peña, J., & Veiga-Ochoa, M. (2015). Robust and versatile pectin-based drug delivery systems. *International journal of pharmaceutics*, 479(2), 265-276.
- Martins, J. T., Cerqueira, M. A., Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Souza, B. W., & Vicente, A. A. (2012). Synergistic effects between κ-carrageenan and locust bean gum on physicochemical properties of edible films made thereof. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 280-289.
- Mei, T., Xu, X., Li, B., Li, J., Cui, B., Zhou, B., & Ablaye, W. (2012). Synergistic interaction of konjac glucomannan and gellan gum investigated by rheology and texture analysis. *Journal of applied polymer science*, 125(2), 1363-1370.
- Milas, M., & Rinaudo, M. (1996). The gellan sol-gel transition. *Carbohydrate polymers*, 30(2), 177-184. doi: [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(96\)00090-2](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(96)00090-2)
- Milas, M., Shi, X., & Rinaudo, M. (1993). On the Physicochemical properties of gellan gum. *Biopolymers*, 30, 451-464.
- Milivojevic, M., Pajic-Lijakovic, I., Bugarski, B., Nayak, A. K., & Hasnain, M. S. (2019). Gellan gum in drug delivery applications. *Natural polysaccharides in drug delivery and biomedical applications*, 145-186.
- Mohammed, Z. H., Hember, M., Richardson, R., & Morris, E. (1998). Kinetic and equilibrium processes in the formation and melting of agarose gels. *Carbohydrate polymers*, 36(1), 15-26.
- Morris, E. R., Nishinari, K., & Rinaudo, M. (2012). Gelation of gellan—A review. *Food Hydrocolloids*, 28(2), 373-411.
- Moxon, S. R., & Smith, A. M. (2016). Controlling the rheology of gellan gum hydrogels in cell culture conditions. *International journal of biological macromolecules*, 84, 79-86.
- Nickerson, M., Paulson, A., & Speers, R. (2003). Rheological properties of gellan solutions: effect of calcium ions and temperature on pre-gel formation. *Food Hydrocolloids*, 17(5), 577-583.
- Nitta, Y., Kim, B. S., Nishinari, K., Shirakawa, M., Yamatoya, K., Oomoto, T., & Asai, I. (2003). Synergistic gel formation of xyloglucan/gellan mixtures as studied by rheology, DSC, and circular dichroism. *Biomacromolecules*, 4(6), 1654-1660.
- Osmalek, T., Froelich, A., & Tasarek, S. (2014). Application of gellan gum in pharmacy and medicine. *International journal of pharmaceutics*, 466(1-2), 328-340.
- Palumbo, F. S., Federico, S., Pitarresi, G., Fiorica, C., & Giammona, G. (2020). Gellan gum-based delivery systems of therapeutic agents and cells. *Carbohydrate polymers*, 229, 115430.

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

- Paulsson, M., Hägerström, H., & Edsman, K. (1999). Rheological studies of the gelation of deacetylated gellan gum (Gelrite®) in physiological conditions. *European journal of pharmaceutical sciences*, 9(1), 99-105.
- Pérez-Campos, S. J., Chavarría-Hernández, N., Tecante, A., Ramírez-Gilly, M., & Rodríguez-Hernández, A. I. (2012). Gelation and microstructure of dilute gellan solutions with calcium ions. *Food Hydrocolloids*, 28(2), 291-300.
- Prezotti, F. G., Cury, B. S. F., & Evangelista, R. C. (2014). Mucoadhesive beads of gellan gum/pectin intended to controlled delivery of drugs. *Carbohydrate polymers*, 113, 286-295.
- Rivera-Hernández, L., Chavarría-Hernández, N., Tecante, A., López-Ortega, M. A., Cuellar, M. d. R. L., & Rodríguez-Hernández, A.-I. (2023). Mixed gels based on low acyl gellan and citrus pectin: A linear viscoelastic analysis. *Food Hydrocolloids*, 137, 108353.
- Rodríguez-Hernández, A. I., Durand, S., Garnier, C., Tecante, A., & Doublier, J. L. (2003). Rheology-structure properties of gellan systems: evidence of network formation at low gellan concentrations. *Food Hydrocolloids*, 17(5), 621-628. doi: 10.1016/s0268-005x(02)00123-6
- Sandolo, C., Bulone, D., Mangione, M. R., Margheritelli, S., Di Meo, C., Alhaique, F., . . . Coviello, T. (2010). Synergistic interaction of Locust Bean Gum and Xanthan investigated by rheology and light scattering. *Carbohydrate polymers*, 82(3), 733-741.
- Sun, R., Niu, Y., Li, M., Liu, Y., Wang, K., Gao, Z., . . . Yuan, Y. (2023). Emerging trends in pectin functional processing and its fortification for synbiotics: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 134, 80-97. doi: 10.1016/j.tifs.2023.03.004
- Sworn, G., Sanderson, G., & Gibson, W. (1995). Gellan gum fluid gels. *Food Hydrocolloids*, 9(4), 265-271.
- Sworn, G., & Stouby, L. (2021). Gellan gum *Handbook of hydrocolloids* (pp. 855-885): Elsevier.
- Tang, J., Tung, M., & Zeng, Y. (1997a). Gelling properties of gellan solutions containing monovalent and divalent cations. *Journal of food science*, 62(4), 688-712.
- Tang, J., Tung, M., & Zeng, Y. (1997b). Gelling temperature of gellan solutions containing calcium ions. *Journal of food science*, 62(2), 276-280.
- Tang, J., Tung, M. A., & Zeng, Y. (1996). Compression strength and deformation of gellan gels formed with mono-and divalent cations. *Carbohydrate polymers*, 29(1), 11-16.
- Vleugels, L. F., Ricois, S., Voets, I. K., & Tuinier, R. (2018). Determination of the ‘apparent pKa’ of selected food hydrocolloids using ortho-toluidine blue. *Food Hydrocolloids*, 81, 273-283.
- Wang, C.-S., Natale, G., Virgilio, N., & Heuzey, M.-C. (2016). Synergistic gelation of gelatin B with xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 60, 374-383.
- Wang, C.-S., Virgilio, N., Wood-Adams, P., & Heuzey, M.-C. (2017). A mechanism for the synergistic gelation properties of gelatin B and xanthan gum aqueous mixtures. *Carbohydrate polymers*, 175, 484-492.

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

- Wu, Y., Ding, W., & He, Q. (2018). The gelation properties of tara gum blended with κ -carrageenan or xanthan. *Food Hydrocolloids*, 77, 764-771.
- Zhang, J., Wang, G., Liang, Q., Cai, W., & Zhang, Q. (2019). Rheological and microstructural properties of gelatin B/tara gum hydrogels: effect of protein/polysaccharide ratio, pH and salt addition. *LWT*, 103, 108-115.
- Zhang, S., Waterhouse, G. I. N., Xu, F., He, Z., Du, Y., Lian, Y., . . . Sun-Waterhouse, D. (2021). Recent advances in utilization of pectins in biomedical applications: a review focusing on molecular structure-directing health-promoting properties. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1-34. doi: 10.1080/10408398.2021.1988897
- Zia, K. M., Tabasum, S., Khan, M. F., Akram, N., Akhter, N., Noreen, A., & Zuber, M. (2018). Recent trends on gellan gum blends with natural and synthetic polymers: A review. *Int J Biol Macromol*, 109, 1068-1087. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.099

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

VI. Mixed gels based on low acyl gellan and citrus pectin: A linear viscoelastic analysis

Food Hydrocolloids 137 (2023) 108353



Contents lists available at ScienceDirect

Food Hydrocolloids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodhyd



Mixed gels based on low acyl gellan and citrus pectin: A linear viscoelastic analysis

Lorena Rivera-Hernández^a, Norberto Chavarría-Hernández^a, Alberto Tecante^b,
Mayra Alejandra López-Ortega^a, Ma del Rocío López Cuellar^a,
Adriana-Inés Rodríguez-Hernández^{a,*}

^a Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Av. Universidad km 1, Rancho Universitario, Tulancingo de Bravo, Hidalgo, 43600, Mexico

^b Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química “E”, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Natural polysaccharides
Rheology
Maxwell model
Hydrogel
Small amplitude oscillatory shear

ABSTRACT

This research aimed to analyze the viscoelastic behavior of mixed hydrogels based on low methoxyl citrus pectin (DE = 30.4%) and low acyl gellan, in the presence of calcium ions to assess the effect of each polysaccharide on the gelation and relaxation processes of the mixed systems. Linear viscoelastic properties were determined, and the experimental data were used to fit the generalized Maxwell model to obtain the hydrogels' relaxation times and average network mesh size. In most mixed gels, the co-gelification of gellan and pectin provided more rigid hydrogels characterized by narrow meshes (6.1–11.7 μm) and slower rearrangements of polymer chains (relaxation times (λ) between 16.7 and 55.2 s) compared to gellan gels (λ = 18.4–29.3 s). The viscoelastic behavior of the pectin-gellan gels suggests a macromolecular network organization where gellan junction zones predominate, and pectin contributes to reinforcing the mixed network. That organization generates more macromolecular interactions via calcium bridges and hydrogen bonds, promoted by the accessibility of anionic sites in both biopolymers and the low extent of branching (7 mol%) of pectin. The rheological analysis provides a new understanding concerning the hybrid pectin-gellan networks, which can be used to design new natural hydrogels for diverse applications such as biocompatible biomaterials and delivery vehicles.

1. Introduction

Natural polysaccharides are biodegradable, non-toxic, biocompatible, and widely available. They exhibit distinctive physicochemical properties and have gained a great deal of attention in science and technology. They are used extensively in food, pharmaceutical, biomedical, and bioengineering products as rheology modifiers, hydrogels, biological scaffold materials, and delivery vehicles for various molecules of current biotechnological interest (Das & Giri, 2020). Gellan is one of the most extensively studied polysaccharides for biotechnological applications. On the industrial scale, gellan is produced by *Sphingomonas elodea* ATCC 31461 (originally designated *Pseudomonas elodea*; also referred to as *Sphingomonas paucimobilis*) (Gai et al., 2011). Gellan is a linear and anionic exopolysaccharide with a tetrasaccharide repeating sequence which consists of (1,3-β-D-glucose, 1,4-β-D-glucuronic acid, 1,4-β-D-glucose, 1,4-α-L-rhamnose). Its native

form contains L-glycerol and acetyl with one glycerate and a half acetate group present per repeating tetrasaccharide unit. Both types of substituent can be removed by treating the fermentation broth with hot alkali, resulting in low acyl gellan (LAG) (Milivojevic, Pajic-Lijakovic, Bugarski, Nayak, & Hasnain, 2019; Morris, Nishinari, & Rinaudo, 2012). Gellan is a water-soluble polysaccharide widely used as a stabilizer, viscosifier, gelling, film-forming, and encapsulating agent (Palumbo, Federico, Pitarresi, Florica, & Giammona, 2020; Pérez-Campos, Chavarría-Hernández, Tecante, Ramírez-Gilly, & Rodríguez-Hernández, 2012). The gellan gelation mechanism has been studied in detail (Huang, Singh, Tang, & Swanson, 2004; Milas & Rinaudo, 1996; Morris et al., 2012). LAG generates hard, brittle, and translucent gels with high thermal stability, while high acyl gellan (HAG) forms soft and flexible gels (Palumbo et al., 2020). Earlier rheological studies evidenced that LAG forms gels at low gellan concentrations (0.005–0.07 g/100 g) in the presence of calcium ions. It was proved through rheological and

* Corresponding author.

E-mail address: inesr@useh.edu.mx (A.-I. Rodríguez-Hernández).

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108353>

Received 11 September 2022; Received in revised form 18 November 2022; Accepted 22 November 2022

Available online 23 November 2022

0268-005X/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108353>

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

ABSTRACT

This research aimed to analyze the viscoelastic behavior of mixed hydrogels based on low methoxyl citrus pectin (DE=30.4 %) and low acyl gellan, in the presence of calcium ions to assess the effect of each polysaccharide on the gelation and relaxation processes of the mixed systems. Linear viscoelastic properties were determined, and the experimental data were used to fit the generalized Maxwell model to obtain the hydrogels' relaxation times and average network mesh size. In most mixed gels, the co-gelification of gellan and pectin provided more rigid hydrogels characterized by narrow meshes (6.1 to 11.7 nm) and slower rearrangements of polymer chains (relaxation times (λ) between 16.7 and 55.2 s) compared to gellan gels ($\lambda = 18.4 - 29.3$ s). The viscoelastic behavior of the pectin-gellan gels suggests a macromolecular network organization where gellan junction zones predominate, and pectin contributes to reinforcing the mixed network. That organization generates more macromolecular interactions via calcium bridges and hydrogen bonds, promoted by the accessibility of anionic sites in both biopolymers and the low extent of branching (7 mol %) of pectin. The rheological analysis provides a new understanding concerning the hybrid pectin-gellan networks, which can be used to design new natural hydrogels for diverse applications such as biocompatible biomaterials and delivery vehicles.

Keywords: Natural polysaccharides; Rheology; Maxwell model; Hydrogel; Small amplitude oscillatory shear.

1. INTRODUCTION

Natural polysaccharides are biodegradable, non-toxic, biocompatible, and widely available. They exhibit distinctive physicochemical properties and have gained a great deal of attention in science and technology. They are used extensively in food, pharmaceutical, biomedical, and bioengineering products as rheology modifiers, hydrogels, biological scaffold materials, and delivery vehicles for various molecules of current biotechnological interest (Das & Giri, 2020). Gellan is one of the most extensively studied polysaccharides for biotechnological applications. On the industrial scale, gellan is produced by *Sphingomonas elodea* ATCC 31461 (originally designated *Pseudomonas elodea*; also referred to as *Sphingomonas paucimobilis*) (Gai et al., 2011). Gellan is a linear and anionic exopolysaccharide with a tetrasaccharide repeating sequence which consists of (1,3- β -D-glucose, 1,4- β -D-glucuronic acid, 1,4- β -D-glucose, 1,4- α -L-rhamnose). Its native form contains L-glyceryl and acetyl with one glycerate and a half acetate group present per repeating tetrasaccharide unit. Both types of substituent can be removed by treating the fermentation broth with hot alkali, resulting in low acyl gellan (LAG) (Milivojevic, Pajic-Lijakovic, Bugarski, Nayak, & Hasnain, 2019; Morris, Nishinari, & Rinaudo, 2012). Gellan is a water-soluble polysaccharide widely used as a stabilizer, viscosifier, gelling, film-forming, and encapsulating agent (Palumbo, Federico, Pitarresi, Fiorica, & Giammona, 2020; Pérez-Campos, Chavarría-Hernández, Tecante, Ramírez-Gilly, & Rodríguez-Hernández, 2012). The gellan gelation mechanism has been studied in detail (Huang, Singh, Tang, & Swanson, 2004; Milas & Rinaudo, 1996; Morris et al., 2012). LAG generates hard, brittle, and translucent gels with high thermal stability, while high acyl gellan (HAG) forms soft and flexible gels (Palumbo et al., 2020). Earlier rheological studies evidenced that LAG forms gels at low gellan concentrations (0.005 to 0.07 g/100 g) in the presence of calcium ions. It was proved through rheological and microscopical examination that the network connection and the reinforcement of the solid-like behavior were dependent on gellan and ion contents. According to those studies, even at very low

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

LAG concentrations, it is possible to create a broad spectrum of viscoelastic behaviors going from structured liquids to strong gels through the specific combinations of LAG and calcium concentrations (Pérez-Campos et al., 2012; Rodríguez-Hernández, Durand, Garnier, Tecante, & Doublier, 2003). Although LAG gels properties provide many different applications in food technology, pharmaceutical, and biomedical research, in recent years, various binary hydrogels based on gellan-polysaccharide blends have been studied to improve the functionality of gellan hydrogels (Zia et al., 2018).

Pectin is considered the most complex polysaccharide in plant cell walls. Its main component is galacturonic acid (GalA) which can be methyl-esterified and O-acetyl-esterified (Fraeye et al., 2009). The macromolecular structure of pectin contains three central regions or domains: 1) the homogalacturonan (HG); 2) the rhamnogalacturonan I (RGI), and 3) the rhamnogalacturonan II (RGII). HG is a negatively charged homopolymer consisting of α -1,4-linked GalA. RGI is a structurally complex polysaccharide with repeating units of the disaccharide α -1,2-L-rhamnose- α -1,4-D-GalA, which is partly branched with neutral sugars at O-4 or O-3 positions of α -L-rhamnose residues. RGII has a backbone of HG with complex side chains attached to the GalA residues. RGI and RGII are the branched domains of pectin (Yapo & Gnakri, 2015). The molar ratio of GalA units esterified with methyl alcohol groups in the HG skeleton represents the degree of methyl-esterification (DM). According to DM values, pectins are classified as high-degree of methoxylation pectins (HMP) (DM > 50 %) or low-degree of methoxylation pectins (LMP) (DM < 50 %) (Yapo & Gnakri, 2015). The gelation of pectins strongly depends on their structure and extrinsic factors such as co-solutes (sugars, cross-linking agents), temperature, and pH. The mechanism of gel formation is different for HMP and LMP. HMP forms gels at pH < 3.5, where the dissociation of carboxyl groups is reduced, and the repulsive forces are minimized between pectin chains. In contrast, gelation of LMP occurs by forming junction zones between two chains in which several successive GalA units are not methoxylated, and it involves ionic linkages

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

via calcium bridges between carboxyl groups. Thus, the gel strength of LMP depends on both the extension and distribution of blocks of successive GalA units (Fraeye et al., 2009).

The rheological behavior of mixed polysaccharide gels is enormously complex, and it is dependent on structural parameters and extrinsic factors that can result in diverse interactions among polysaccharide chains, which influence their gelation kinetic, viscoelastic behavior and mechanical properties. Although various studies concerning gellan blends with natural polymers have been reported (Palumbo et al., 2020; Zia et al., 2018), there are limited studies on the mixed gels based on LMP and LAG (Prezotti, Cury, & Evangelista, 2014), two gelling polysaccharides with high affinity for calcium ions but with rheological properties quite different. The particular interest in the viscoelastic study of pectin-gellan gels is mainly due to the outstanding gelling behavior, ion sensitivity, mucoadhesion, and biocompatibility of low acyl gellan, as well as the bioactive properties of pectin (i.e., prebiotic activity, immune enhancement, anticancer, mucoadhesion, anti-inflammatory, antimicrobial and antimutagenic potential) (Freitas, Coimbra, Souza, & Sousa, 2021). Thus, this research aims to analyze the viscoelastic properties of low methoxyl pectin and low acyl gellan mixtures in the presence of calcium ions, and assess each polysaccharide's effect on the elastic behavior and relaxation process of the mixed networks. The rheological analysis of the systems examined in the current research provides a new understanding concerning the hybrid pectin-gellan networks, which can be used to design new natural hydrogels for applications such as delivery systems, pH-responsive biomaterials, and biocompatible biomaterials.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Materials

Citrus pectin (GENU® Pectin, type LM-12 CG, CP Kelco, USA) and low acyl gellan gum (Kelcogel®, CP Kelco, USA) were used without further purification for rheological tests. Calcium chloride (J. T Baker, Mexico) was used as a cross-linking agent. Monosaccharides (galactose, arabinose, rhamnose, glucose, mannose, rhamnose, and ribose) and galacturonic acid used as standards were purchased from Sigma Aldrich, Mexico. Water used throughout the experiments was distilled and purified on an ultrapure water system (Thermo Fisher Scientific, Germany). Other chemicals and solvents used were of analytical purity or HPLC grade.

2.2 Chemical characterization of polysaccharides

The chemical structure of pectin and gellan was confirmed through Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy using an FTIR spectrometer (Cary 630, Agilent Technologies Inc. USA) equipped with a single bounce diamond ATR accessory. Spectra were collected by co-adding 32 scans at a resolution of 4 cm⁻¹ in the spectral region of 4000–650 cm⁻¹.

Pectin was characterized by total uronic acid content, degree of esterification (DE), monomeric composition, and molar mass. The total uronic acid content was determined by the m-hydroxy diphenyl assay reported by [Filisetti-Cozzi and Carpita \(1991\)](#). A standard curve of D-galacturonic acid (Fluka, BioChemika 48289) was constructed at 0 to 100 µg/mL concentrations. The pectin sample's degree of esterification (DE) was determined by titration, as previously reported ([Lira-Ortiz et al., 2014](#)). The monosaccharide composition of pectin was determined after hydrolysis with 2 mol/L trifluoroacetic acid (TFA) (2 h, 121 °C). The hydrolyzed sample was dried in a SpeedVac® concentrator (Thermo Scientific, USA) at 46 °C

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

and 853 Pa, re-suspended in HPLC-grade water, neutralized, and filtered through a 0.45 μm membrane before HPLC analysis. The monosaccharide analysis was performed by an Agilent 1260 Infinity HPLC system (Agilent Technologies Inc. USA) equipped with a refractive index detector (RID) and a Bio-Rad Aminex HPX-87P column (7.8 \times 300 mm), using water as the mobile phase (0.6 mL/min). The injection volume was 30 μL , and the temperatures of the column and detector were maintained at 85 $^{\circ}\text{C}$ and 50 $^{\circ}\text{C}$, respectively. Standard sugars from Sigma-Aldrich were used to identify and quantify the monosaccharides of pectin.

The pK_a values for pectin and gellan were determined by potentiometric titration using a digital pH meter HI 4222 (Hanna, Instruments). Gellan (0.01 g/100 g) and pectin solutions (0.1 g/100 g) were prepared by dispersing the polysaccharide in deionized water under magnetic stirring overnight at room temperature. Titrations were performed with NaOH (0.1 N) in 20 mL of polymer solution for pH 3 to 10 at 25.0 $^{\circ}\text{C}$. The pK_a of each polymer was determined from the equivalence point in its titration curve (Kaur & Kaur, 2018).

The weight-average molar mass (M_w), number-average molar mass (M_n), and polydispersity index (M_w/M_n) of pectin were determined following the procedure reported by Morales-Martínez, López-Cuellar, Chavarría-Hernández, and Rodríguez-Hernández (2018). A high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC) was carried out in an Agilent 1260 Infinity HPLC system (Agilent Technologies Inc. USA) coupled with a refractive index detector. Chromatographic separation was performed on a column set of two PL aquagel-OH MIXED-H (8 μm , 300 \times 7.5 mm, Agilent Technologies®) at 50 $^{\circ}\text{C}$. The mobile phase was 0.2 M NaNO_3 + 0.01 M NaH_2PO_4 , pH = 7, with 0.02 g/100 g sodium azide (NaN_3) as an antimicrobial agent. The pectin sample (2 mg/mL) dissolved in the mobile phase and filtered through 0.45 μm nylon membranes was injected into the HPLC system. The injection volume was 400 μL , and the flow rate of the mobile phase was 1 mL/min. A calibration curve of dextran standards from 50 to 670 kDa (Sigma-Aldrich; St.

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

Louis, MO, USA) was constructed using GPC/SEC Data Analysis software (Agilent Technologies®, Inc.). The M_w value for gellan (Kelcogel) has been previously determined using light scattering techniques (Noda et al., 2008), and the reported value for its disordered conformation was considered for this research ($M_w=190\ 000$ g/mol, Table 2). All the determinations were performed in triplicate.

2.3 Preparation of hydrogels

Gellan (G) (0.3 and 0.5 g/100 g), pectin (P) (0.3 and 0.5 g/100 g), and pectin-gellan (P – G) blends were prepared by overnight dispersing the polysaccharides in deionized water at room temperature under magnetic stirring. The solutions were heated to 90 °C, and the necessary amount of a CaCl_2 stock solution (40 mM) was added to the hot solutions, stirred for 30 s, and poured directly onto the preheated rheometer baseplate. All samples were prepared into small flasks with lids to prevent water evaporation. Table 1 shows the systems studied in this work.

Table 1. Single and mixed gels studied in this work

System	Pectin (g/100 g)	Gellan (g/100 g)	CaCl_2 (mM)
0.3 P – 3 mM	0.3	-	3
0.3 P – 5 mM	0.3	-	5
0.5 P – 3 mM	0.5	-	3
0.5 P – 5 mM	0.5	-	5
0.3 G – 3 mM	-	0.3	3
0.3 G – 5 mM	-	0.3	5
0.5 G – 3 mM	-	0.5	3
0.5 G – 5 mM	-	0.5	5
0.3 P – 0.3 G – 3 mM	0.3	0.3	3
0.3 P – 0.3 G – 5 mM	0.3	0.3	5
0.3 P – 0.5 G – 3 mM	0.3	0.5	3
0.3 P – 0.5 G – 5 mM	0.3	0.5	5
0.5 P – 0.3 G – 3 mM	0.5	0.3	3
0.5 P – 0.3 G – 5 mM	0.5	0.3	5

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

0.5 P – 0.5 G – 3 mM	0.5	0.5	3
0.5 P – 0.5 G – 5 mM	0.5	0.5	5

P = pectin; G = gellan

2.4 Viscoelastic properties

Small amplitude oscillatory shear tests (SAOS) were carried out in an ARES-G2 rheometer (TA Instruments, USA) using the parallel plate fixture (diameter = 40 mm, $\Delta h = 3$ mm). Sandpaper was placed on the lower plate to avoid slipping the sample during oscillation. A solvent trap was used to prevent solvent evaporation during rheological tests. The hot solutions were poured into the preheated geometry (85 °C) immediately after preparation and then cooled to 25 °C (1 °C/min) to achieve the in situ gelation in the rheometer. Subsequently, a time sweep was performed at 1 rad/s and 25 °C until the stationary state of dynamic moduli was attained. Then, a frequency sweep from 10^{-2} to 10^2 rad/s was carried out at constant strain and 25 °C. Finally, strain sweeps (Fig 1S, supplementary material) were performed to verify that all measurements were completed within the region of linear viscoelasticity (Pérez-Campos et al., 2012; Rodríguez-Hernández et al., 2003).

The results of frequency sweeps were used to obtain the discrete relaxation spectra for gellan, pectin, and their blends. The generalized Maxwell model was used to obtain the best fit model to the experimental data, storage moduli ($G'(\omega)$) and loss moduli ($G''(\omega)$), as follows:

$$G' = G_e + \sum_{i=1}^n G_i \frac{(\lambda_i \omega)^2}{1 + (\lambda_i \omega)^2} \quad (1)$$

$$G'' = \sum_{i=1}^n G_i \frac{\lambda_i \omega}{1 + (\lambda_i \omega)^2} \quad (2)$$

Non-linear regression analysis was done using SigmaPlot® software version 12.5 (Systat Software Inc). The generalized Maxwell model results from the parallel

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

combination of n Maxwell elements (linear springs and dashpots) and a purely elastic contribution named equilibrium modulus, G_e , which has a finite value for viscoelastic solids and is null for viscoelastic liquids (Baumgaertel & Winter, 1989; Goodwin & Hughes, 2008; Lapasin & Prici, 1995). Each i^{th} Maxwell element is characterized by a relaxation modulus (G_i) and the corresponding relaxation time (λ_i). The complete set of G_i and λ_i is the discrete relaxation spectrum, and that spectrum is valid in a time window corresponding to the input data's frequency range (Winter, 1997). The choice of the number of Maxwell elements (n) was according to the frequency range of the mechanical spectra and following the criteria: $n < 1.5$ per frequency decade (Baumgaertel & Winter, 1989; Winter, 1997). Thus, due to the relatively small number of relaxation modes, the values of G_i and λ_i were not be pre-set. We carried out the non-linear regression analysis using 3 and 4 Maxwell elements to obtain the discrete relaxation spectra, but the best fit to the experimental data was obtained with $n = 3$. The shear modulus (G) was estimated from the sum of the G_i values and G_e (equation 3). According to Flory's theory (Grassi, Lapasin, Coviello, Matricardi, & Di Meo, 2009), G values were used to estimate the polymeric network structure through the cross-link density (ρ_x) (moles of junctions between different polymeric chains per unit volume), and the mesh size (ξ) that represents the average distance between two cross-linking points.

$$G = G_e + \sum G_i \quad (3)$$

$$\rho_x = \frac{G}{RT} \quad (4)$$

$$\xi = \sqrt[3]{\frac{6}{\pi \rho_x N_A}} \quad (5)$$

where R is the universal gas constant, T is the absolute temperature, and N_A is the Avogadro number.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Chemical characterization of polysaccharides

The main physicochemical properties of the polysaccharides used in this study are shown in Table 2. The citrus pectin used in this work is low esterified pectin (DE = 30.4 %) with a high galacturonic acid content (95 g/100 g), which leads to a pK_a value of 4.40 ± 0.03. This value agrees with that reported for citrus pectins (3.5-4.5) (Maciel, Yoshida, & Franco, 2015). On the other hand, gellan has a lower pK_a value (3.34 ± 0.02), given by the glucuronic acid in its structure, which is in agreement with that reported before (3.4 - 3.5) (Morris et al., 2012; Prezotti et al., 2014). The major neutral sugars in the citrus pectin structure were galactose, rhamnose, and arabinose. Based on the chemical composition of pectin, some sugar molar ratios were calculated according to Alba et al. (2018). Compositional analysis reveals that homogalacturonan (HG) is the predominant sequence in citrus pectin (93 % mol). The (Gal+Ara)/Rha molar ratio suggests a low extent of the branching of the RGI domain, which represents scarcely 7 mol % in the pectin structure. Besides, citrus pectin is a highly heterogeneous polysaccharide with a broad molar mass distribution (M_w/M_n = 4.43).

Table 2. Physico-chemical characterization of citrus pectin and gellan.

<i>Pectin</i>	
pK _a (-)	4.40 ± 0.03
Galacturonic acid (g/100 g dry basis)	95 ± 1
Galactose (g/100 g dry basis)	5.3 ± 0.3
Arabinose (g/100 g dry basis)	0.030 ± 0.002
Rhamnose (g/100 g dry basis)	0.6 ± 0.1
(Ara+Gal)/Rha (molar ratio)	8.3
HG (mol %)(GalA(mol %) – Rha(mol %))	93
RG-I (mol %)	7
(2Rha(mol %) + Ara(% mol) + Gal(mol %))	

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

HG/RG-I	13.3
Esterification degree (DE, %)	30.4 ± 0.4
Weight-average molar mass (M_w , 10^3 g/mol)	108.5 ± 3.5
Number-average molar mass (M_n , 10^3 g/mol)	24.5 ± 0.1
Polydispersity index (M_w/M_n)	4.4 ± 0.1
Gellan	
pK _a (-)	3.34 ± 0.02
Weight-average molar mass (M_w , 10^3 g/mol) ^a	190

^a Disordered conformation (Noda et al., 2008).

Values are mean ± standard deviation (n=3).

Figure 1 shows the FTIR spectra of citrus pectin (Fig 1a) and gellan (Fig 1b) used in this work. Broad and intense bands were exhibited between 3000 and 3600 cm^{-1} , which are attributed to O-H stretching. The smaller broad bands near 2900 cm^{-1} are assigned to the C-H stretching vibration of the CH_2 and CH_3 groups present in pectin and gellan structures. The peaks at 1600 cm^{-1} (gellan) and 1592 cm^{-1} (pectin) are attributed to the absorption of the asymmetric stretching of carboxylate anions which denote the presence of glucuronic and galacturonic acids in the structure of gellan and pectin, respectively; The bands at about 1400 cm^{-1} , which are related to the symmetric $-\text{COO}^-$ stretching vibrations, corroborate the presence of uronic acids in both samples. The band centered at 1733 cm^{-1} (Fig 1a) corresponds to the absorption of the C=O stretching vibration of esterified carboxylic groups of the pectin molecules. It has been reported that the intensity of the absorbance of this peak increases with the increase in DE of pectins, whereas the absorbance intensity of the carboxylate stretching band (ca. 1600 cm^{-1}) decreases (Chatjigakis et al., 1998). Thus, according to the relative intensity of 1592 and 1733 peaks in pectin's FT-IR spectrum, the low esterification degree is corroborated. The 1200 – 800 cm^{-1} region gives information about the backbone polysaccharide composition, and the side chain constituents can strongly influence it. The bands at 1140, 1073, 1006, and 950 cm^{-1} are assigned to ring vibrations overlapped with stretching vibrations of

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

C–OH side groups and C–O–C glycosidic bond vibration (Kačuráková, Capek, Sasinková, Wellner, & Ebringerová, 2000).

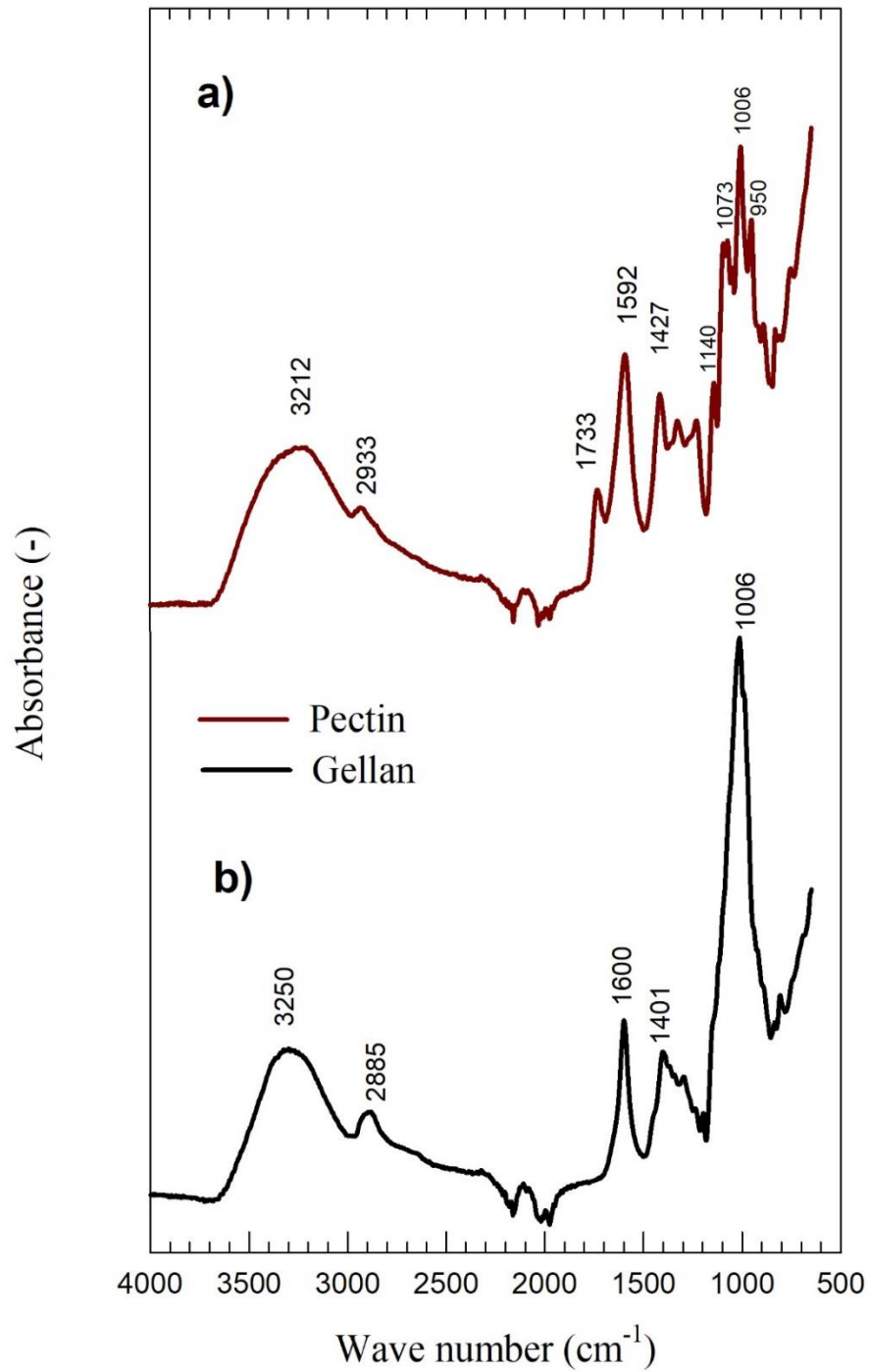


Fig. 1 FTIR spectra for a) citrus pectin and b) gellan.

3.2 Viscoelastic properties of single gels

Figure 2a shows the mechanical spectra of 0.3 and 0.5 g/100 g gellan in the presence of 3 and 5 mM CaCl_2 . All systems were self-supporting gels with a classic gel-like behavior. The storage modulus, $G'(\omega)$, was independent of frequency and higher than the loss modulus, $G''(\omega)$. Although gellan gels with higher $G'(\omega)$ values were generated at 5 mM CaCl_2 , the loss tangent values of all systems were low and essentially the same (Fig 2b), $0.009 < \tan \delta < 0.044$, equivalent to loss angles of 0.57 to 2.23 degrees, confirming the elastic character of the gellan gels. The values of loss tangent of 0.5 G – 5 mM, slightly higher, describe an attenuation of the elastic character of gellan, which can be the result of saturation of the anionic sites on gellan due to the high total ionic concentration (gellan and calcium concentrations).

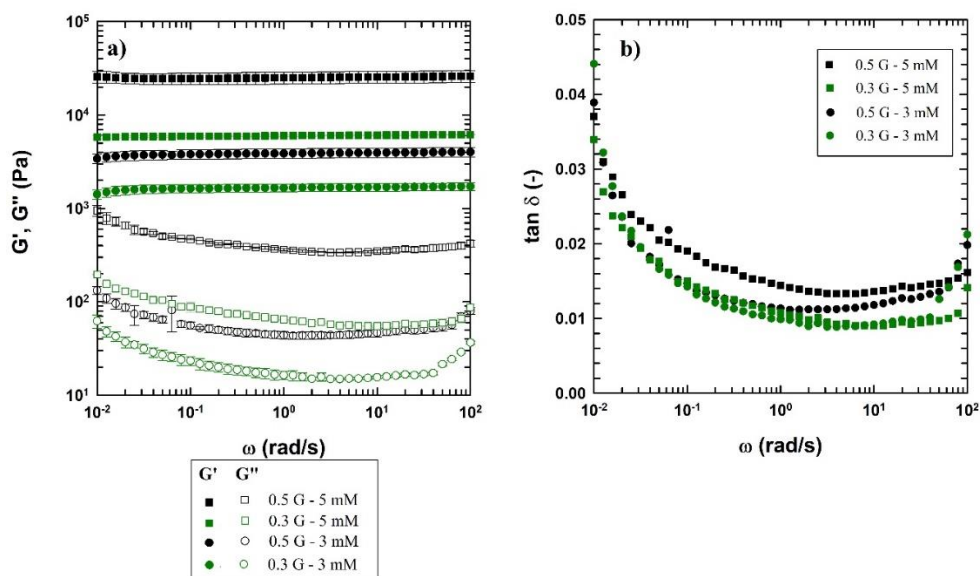


Fig. 2 a) Mechanical spectra of gellan systems. $G'(\omega)$ (solid symbols) and $G''(\omega)$ (void symbols); **b)** Variation of loss tangent ($\tan \delta$) with angular frequency for gellan systems. Data were obtained at 25 °C within the linear viscoelastic zone (strain = 0.3 % - 0.7 %). Data correspond to the mean values of two independent measurements.

According to the interpretation of gellan gelation with divalent cations, Ca^{2+} or Mg^{2+} ions have direct bridging between pairs of carboxylate groups on neighboring

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

gellan helices. Thus, the complete formation of Ca^{2+} - dimeric junctions between gellan double helices, which have 3-fold symmetry, would require only the presence of 1/3 of the stoichiometric equivalence of site-bound cations (Morris et al., 2012). Based on the above, we can express the stoichiometric ratio for calcium ion concentration required for gellan gelation as $R_{\text{gellan}} = [\text{Ca}^{2+}]/[\text{gellan}]$, both in $\text{meq}\cdot\text{L}^{-1}$. Considering a molar mass of 645 g/mol for the anionic tetrasaccharide repeating unit of gellan, the R_{gellan} values for the gellan- Ca^{2+} systems studied in this work were 1.29, 2.15, 0.77, and 1.29 for 0.3 G – 3 mM CaCl_2 , 0.3 G – 5 mM CaCl_2 , 0.5 G – 3 mM CaCl_2 and 0.5 G – 5 mM CaCl_2 , respectively. According to the gellan gelation mechanism and R values, calcium ions were high enough to carry out fast gelation, yielding elastic gellan gels. Moreover, previous studies have demonstrated that although the progressive increase of the gellan concentration (C_P) and the divalent cation content (C_S) enhances the elastic character of gellan gels, the total ionic concentration ($C_T = \gamma C_P + C_S$, being γ the mean activity coefficient for Ca^{2+} – gellan) is the triggering and the critical factor for the gelation and elasticity of gellan systems (Pérez-Campos et al., 2012). That earlier study, using lower gellan concentrations (0.02 – 0.07 %), evidenced that the dependence of G' on total ionic concentration (C_T) showed a maximum in G' at $C_T = 9.3 \pm 1.2$ meq/L, followed by a progressive G' diminution as total ionic concentration increased. The C_T values of the gellan systems in this work were 8.46, 10.11, 12.46 and 14.11 meq/L for 0.3 G – 3 mM, 0.5 G – 3 mM, 0.3 G – 5 mM and 0.5 G – 5 mM, respectively. Accordingly, the 0.5 G – 5 mM system was the system with the highest C_T value, 1.30 greater than reported as the critical value by Pérez-Campos et al. (2012), and that high C_T value resulted in an attenuation of the gellan elastic character (Fig 2b). The effect of excess salt on the gel strength of gellan has been also reported in other studies (Morris et al., 2012; Tang, Tung, & Zeng, 1996). It has been hypothesized that the excess ions force gellan to self-associate in a progressively less well-formed three-dimensional network, leading to an excessive aggregation and the gel structure's collapse.

The frequency sweeps of pectin systems are shown in Fig 3. All systems exhibited a solid-like rheological behavior after 30-min gel curing (time sweep, data

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

not shown), $G'(\omega)$ was higher than $G''(\omega)$, and both moduli with slight frequency dependence ($G' \propto \omega^{0.06-0.09}$; $G'' \propto \omega^{0.06-0.11}$). Loss tangents (Fig 3c) showed an increase from 0.1 to 0.42 as frequency decreased in the range of 10^{-1} to 10^{-2} rad/s; a plateau was observed beyond 10^{-1} rad/s with values close to 0.2 (11.3 degrees) for 0.3 P – 3 mM CaCl_2 and 0.1 (5.7 degrees) for the rest of the pectin-calcium systems, values notably higher than those obtained in gellan systems (Fig 2b). The viscoelastic behavior can be described as soft-gel-like. The gelation mechanism for LMP is the well-known "egg-box model", which states that two-fold symmetrical, antiparallel polyuronate helices are bound through Ca^{2+} ions packed in the interstices of the twisted chains of LMP. However, the gelation of LMP and their gel properties strongly depend on their complex chemical structure (Cao et al., 2020). Some studies have described the effect of Ca^{2+} concentration on the rheological gel behavior of LMP using the stoichiometric ratio, $R_{\text{pectin}}=2[\text{Ca}^{2+}]/[\text{COO}^-]$ rather than the Ca^{2+} concentration, where $[\text{Ca}^{2+}]$ and $[\text{COO}^-]$ denote molar concentrations of calcium ions and carboxyl groups, respectively (Díaz-Rojas et al., 2004; Gigli, Garnier, & Piazza, 2009; Ngouemazong et al., 2012). Accordingly, a high concentration of Ca^{2+} led to a fast ion diffusion, generating an elastic gel structure. It has been reported that pectin gel strength increases with increasing Ca^{2+} concentrations when $R_{\text{pectin}} \leq 3.0$. However, R_{pectin} values higher than 3.0 can be excessive and cause electrostatic repulsion between pectin chains (Cao et al., 2020). In this work, the examined concentrations of pectin and CaCl_2 resulted in R_{pectin} values between 0.35 and 0.97, higher than the saturation value reported for Ca-pectin gels (i.e., $R = 0.3$) (Cao et al., 2020) and enough to intensify the cross-links, giving rise to higher values of viscoelastic moduli as pectin and calcium ions increased into the gel.

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

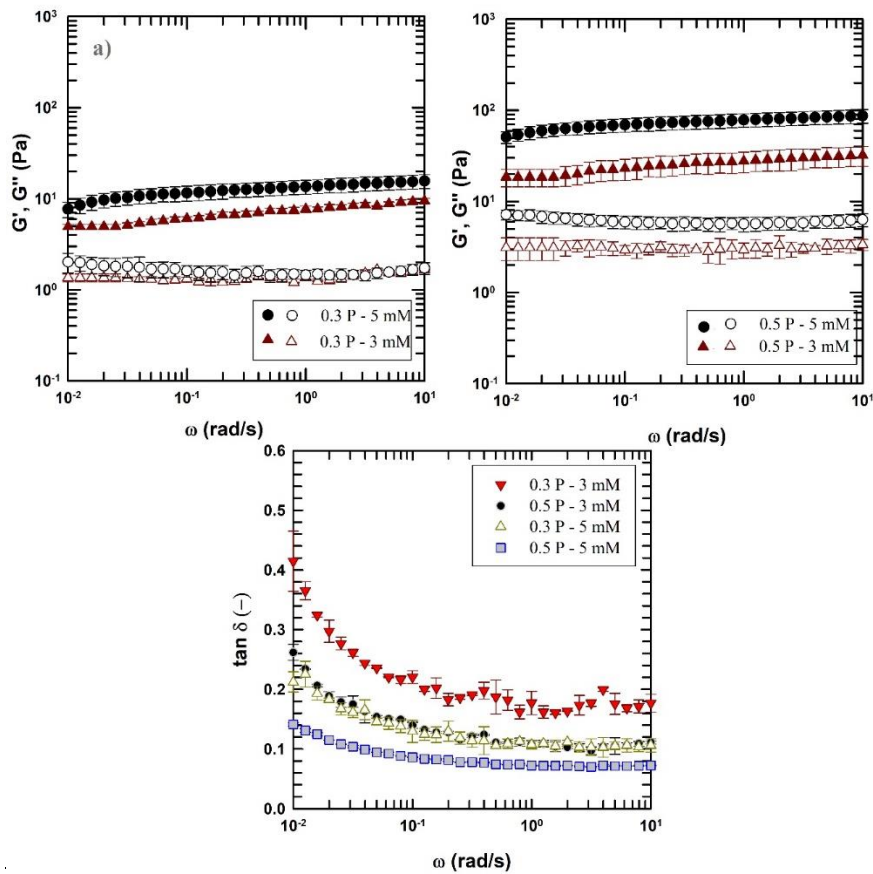


Fig. 3 Variation of $G'(\omega)$ (solid symbols) and $G''(\omega)$ (void symbols) with angular frequency for **a)** 0.3 P systems, and **b)** 0.5 P systems; **c)** Variation of the loss tangent ($\tan \delta$) with angular frequency for pectin-calcium systems. Data were obtained at 25 °C within the linear viscoelastic zone (strain = 0.5 %). Data correspond to the mean values of two independent measurements.

3.3 Viscoelastic properties of pectin/gellan systems

Figure 4 shows the mechanical spectra and loss tangent values of a representative mixed gel of this work and the corresponding mechanical spectra of the individual gels. The three systems exhibited a solid-like behavior (i.e., $G' > G''$); gellan and mixed system were rigid gels, G' was independent of frequency, and $\tan \delta$ values were between 0.01 (0.57 degrees) and 0.03 (1.72 degrees), denoting the typical solid-like behavior of gellan in the presence of divalent ions (Rodríguez-Hernández et al., 2003). Otherwise, pectin gel showed a viscoelastic behavior of a

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

soft gel, with low values of dynamic moduli and $\tan \delta$ values between 0.11 (6.3 degrees) and 0.24 (13.5 degrees). In all examined gels in this work, both gellan and pectin-gellan gels displayed considerably higher dynamic moduli than single pectin gels (mechanical spectra are available in supplementary material, Fig 2S).

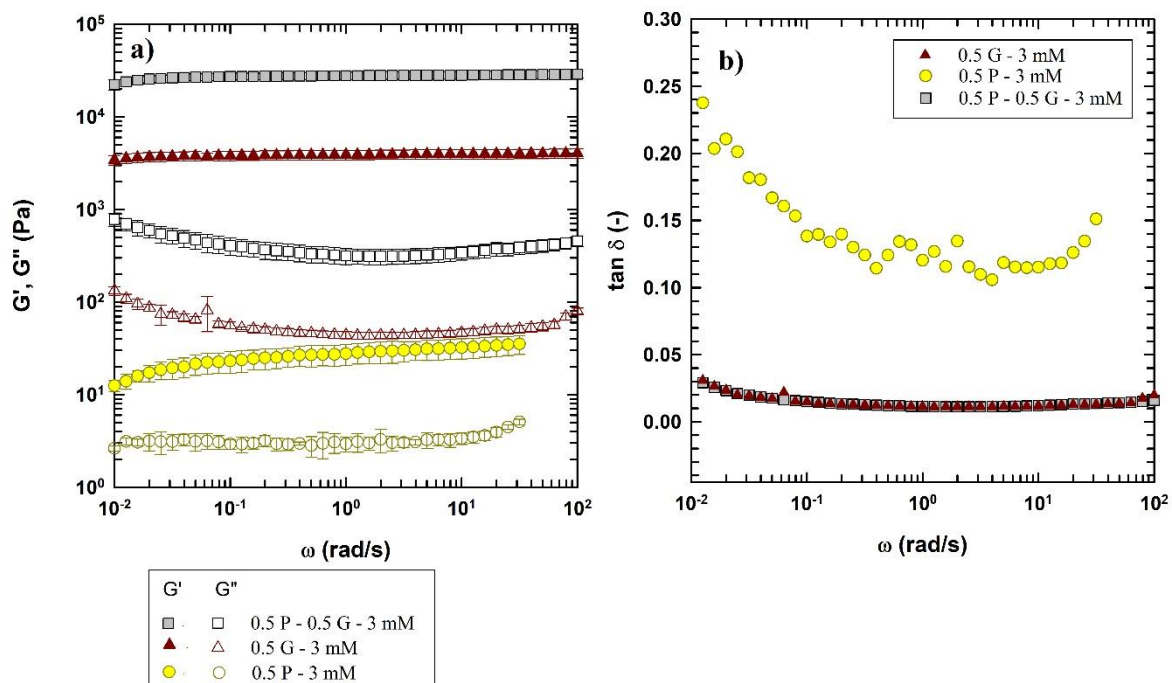


Fig. 4 a) Variation of $G'(\omega)$ (solid symbols) and $G''(\omega)$ (void symbols) for: 0.5 P – 3 mM, 0.5 G – 3 mM, and 0.5 P – 0.5 G – 3 mM; **b)** variation of the loss tangent ($\tan \delta$) with angular frequency. Data were obtained at 25 °C within the linear viscoelastic zone (strain = 0.6 %). Data correspond to the mean values of two independent measurements.

Fig 5 shows the mean values of the storage modulus at 1 rad/s, $G'(1)$, for all individual and mixed gels assessed in this work. The systems with 3 mM CaCl_2 (Fig 5a) showed lower moduli than those with 5 mM CaCl_2 (Fig 5b), but the overall behavior was closely similar. Interestingly, mixed gels showed $G'(1)$ values higher than gellan in all cases except for 0.3 P – 0.5 G with 5 mM CaCl_2 . Although it is a fact that the total polymer concentration in the mixed gels was higher than those of the corresponding individual gels, the magnitude of the $G'(1)$ values of the mixed

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

gels ($G'_{\text{pectin-gellan}}$) was markedly more significant than the arithmetic sum of the $G'(1)$ values of the individual gels. Fig 5c shows the values of $\Delta G'(1)$, a parameter used to evaluate interactions between biopolymers such as gellan-hydroxyethylcellulose and pectin-mucin (Destruel et al., 2020; Sriamornsak & Wattanakorn, 2008). This parameter was calculated as $\Delta G' = G'_{\text{pectin-gellan}} - (G'_{\text{pectin}} + G'_{\text{gellan}})$, where $G'_{\text{pectin-gellan}}$ is the storage modulus of the mixed gel, and G'_{pectin} and G'_{gellan} are the G' values for the individual gels of pectin and gellan, respectively. These results indicate that in most of the mixed gels, co-gelation of gellan and pectin provides more rigid gels than gellan. In all systems, calcium ions are high enough for the gelation of individual gels. However, the $\Delta G'$ values of the mixed gels composed with 0.5 g/100 g gellan and 5 mM CaCl_2 did not follow the increasing trend (Fig 5c), which can be attributed to an attenuation of the solid-like behavior of gellan due to a saturation of its anionic sites and an excess of the total ionic concentration (C_T) (see section 3.2) (Pérez-Campos et al., 2012).

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

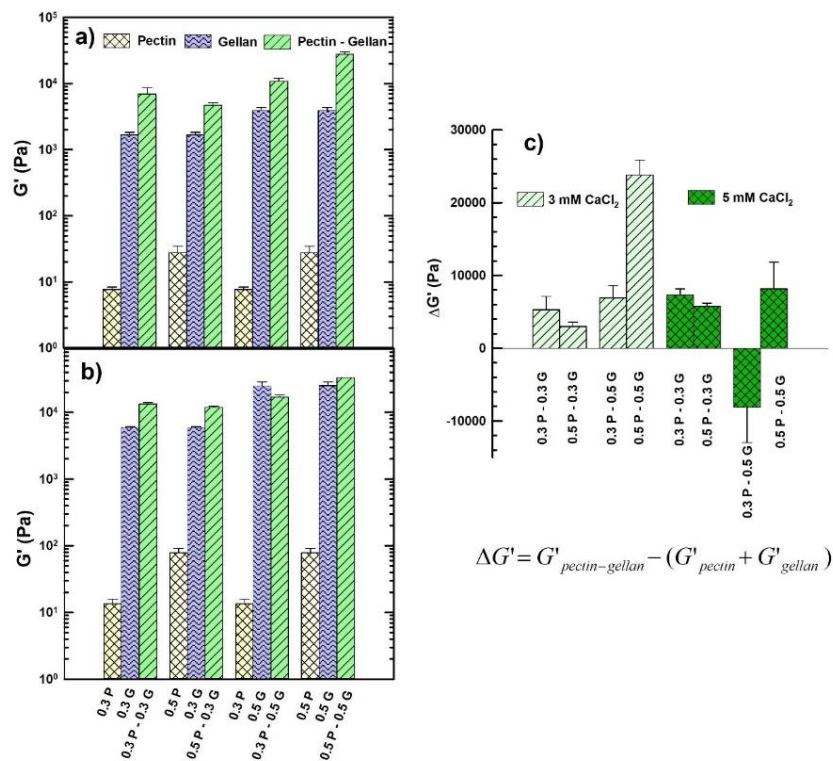


Fig. 5 Storage moduli, G' at 1 rad/s and 25 °C for pectin, gellan, and pectin-gellan systems with **a)** 3 and **b)** 5 mM CaCl_2 . Data were retrieved from mechanical spectra (Figs 2a, 3a, and 2S); **c)** $\Delta G'$ values calculated from the values displayed in 5a and 5b.

Figure 6 presents the evolution of G' during gelation at 25 °C of the mixed gel that exhibited the highest $\Delta G'$ value (0.5 P – 0.5 G – 3 mM CaCl_2) and the mixed system that showed decreasing $\Delta G'$ value (0.3 P – 0.5 G – 5 mM CaCl_2), as well as the corresponding single gels. Gellan and pectin showed a rapid gel formation; a narrow transient zone in G' is observed for $t < 500$ s; after that, moduli increased slightly, reaching pseudo-equilibrium values ($\Delta G'/s < 0.2$). The calcium ions present in the medium are sufficient for the formation and rearrangement of junction zones; thus, a 30 min curing period was enough to reach the stationary region in the single gels. The evolution of the gelation process of the mixed gels was different; under the same experimental conditions, these mixed systems displayed, from the beginning, a solid-like behavior; however, G' displayed a rapid growth in the first 1000 s and transient gelation was evident.

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

The transient nature of the gelation of the mixed pectin-gellan gels can be attributed to differences in the structure and conformation of the two polysaccharides, both are anionic macromolecules with relatively high molar masses (Table 2), but pectin has slightly branched structure; thus they have different levels of structural organization in the aqueous medium. Moreover, the diffusion of calcium ions in the mixed systems, more viscous than the individual polymeric solutions, could induce delayed gelation since the distribution and accessibility of anionic sites seem to be critical factors for the gelling process. In this sense, the pH values of all mixed gels were between 3.1 and 3.6; therefore, based on the pK_a values of gellan ($pK_a= 3.34$) and pectin ($pK_a= 4.40$), mixed gels were composed of more dissociated gellan molecules and lesser pectin molecules in their dissociated form. Thus, the calcium binding was mainly to the anionic sites of gellan, promoting the aggregation of gellan double-helices. Accordingly, it is possible to affirm that gellan dominates the rheology of pectin-gellan gels.

The higher calcium concentration in the 0.3 P – 0.5 G – 5 mM system promoted that the G' reached an equilibrium state before that occurred for the 0.5 P – 0.5 G – 3 mM system, but the G' values of the first system were smaller than those of gellan single gel (0.5 G – 5 mM $CaCl_2$). The 0.3 P – 0.5 G – 5 mM system was the unique mixed system where the coexistence of the two polymers generated a gelled system with storage moduli lower than gellan. The gellan gelation induced by the high calcium content (5 mM), but in the presence of pectin, resulted in a less cross-linked network in that mixed gel than in the gellan single gel, as evidenced in section 3.4 (Table 3, ρ_x values). A likely scenario is that pectin limited the gellan gelation, probably by physically hindering the development of a continuous gellan gel matrix, and its low concentration (0.3 g/100 g) was not enough to promote more intermolecular binding sites in the hybrid system. In addition, as discussed in section 3.2, calcium ions are in excess for 0.5 G gelation and could weaken gellan networks by promoting excessive aggregation. Otherwise, the 0.5 P – 0.5 G – 3 mM $CaCl_2$ system displayed asymptotic G' values higher than those of 0.5 G – 3 mM $CaCl_2$. Its

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

gelation was delayed, presumably due to the molecular arrangements of pectin inside the mixed network. However, its viscoelastic properties were improved, yielding a more cross-linked network than the single gels (Table 3); 3 mM CaCl₂ appeared to promote a more organized gellan gelation, where pectin could reinforce the gellan network, resulting in a better distributed and interconnected mixed network. Indeed, in that system, the stoichiometric calcium requirement for the gellan carboxyl groups ($R = Ca^{2+}/LAG$) was the lowest tested in this work (i.e. 0.77). Thus it is possible to suggest that the gelling process was more organized due to a better distribution of calcium ions.

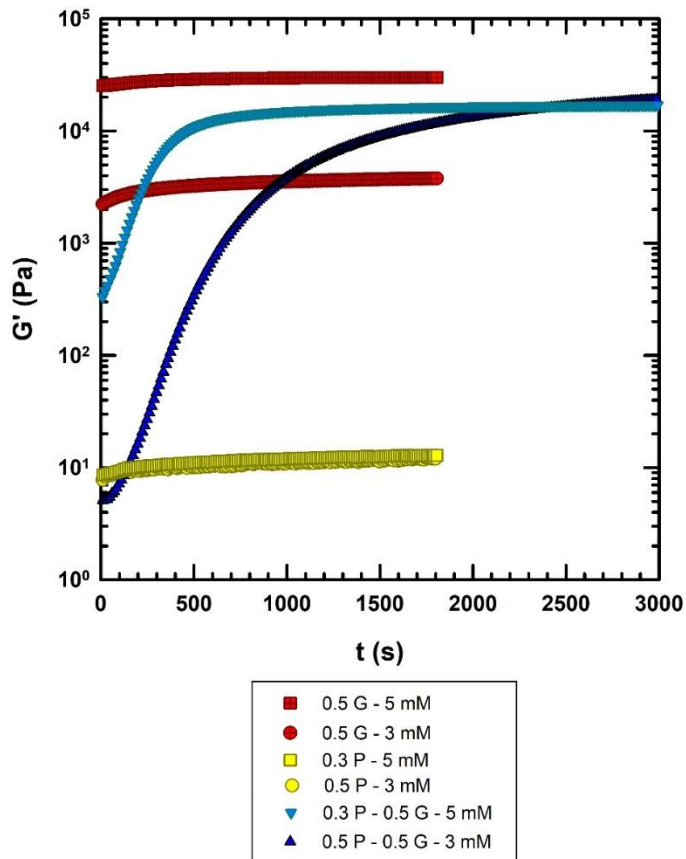


Fig. 6 Evolution of G' during time sweeps at 25 °C. The systems were sheared at 1 rad/s, applying an oscillation strain of 0.6 % until reaching equilibrium values. Data correspond to the mean values of two independent measurements.

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

On the other hand, some studies concerning pectin gelation have reported that the pectic polysaccharide RGI, a structural domain of pectins with neutral sugar side-chains, prompted hydrogen bonds, and synergistic effects can be achieved on the gelation of blends of traditional pectins and blends with other polysaccharides (Chen et al., 2021). Based on the results shown in Figs. 5 and 6, we can be assumed that the viscoelastic behavior of the mixed gels was dominated by the high affinity of gellan for Ca^{2+} ions. The concentrations of gellan and calcium used in this study promoted the formation of robust gelled systems, and the presence of the homogalacturonan (HG), the main domain in the pectin macromolecules, contributes to reinforcing the elastic behavior of the mixed systems through additional calcium bridges, hydrogen bonds, and even hydrophobic interactions, taking part dissociated and non-dissociated carboxylic groups, hydroxyl and methyl groups present in GalA. Besides, the small branches of pectin molecules (i.e., RGI domain) can generate more inter-macromolecular interactions (i.e., hydrogen bonds), yielding a more interconnected mixed network. However, further investigations such as confocal or atomic force microscopy, DSC and NMR should be carried out to provide more evidence of the network organization in pectin-gellan systems.

3.4 Relaxation process and network parameters

The viscoelastic properties of polymers are related to the nature and the rates of configurational reorganizations. Therefore, linear viscoelastic models are helpful for the analysis and interpretation of experimental data obtained through SAOS tests. The best known is the Maxwell model, which is represented by an arrangement of a purely viscous element (η_i) and a perfectly elastic body (G_i), from which the relaxation time of the element defined as $\lambda_i = \eta_i/G_i$ is a measure of the time required for stress relaxation (Ferry, 1980). The relaxation processes in polymers occur through chain rearrangements, during which macromolecules attain conformations of a lower energetic state. However, the viscoelastic behavior of natural polymers cannot be characterized in terms of a single relaxation time because they have

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

structures and macromolecular organizations too complex. Besides, natural polymers exhibit a broader distribution of molar masses and form networks with cross-links of different natures. The physical hydrogels reported here are formed through non-covalent interactions, namely ion-dipole (calcium bridges) and van der Waals interactions, leading to a dynamic network rearrangement. The predominance of physical bonds in the hydrogels favors the reorganization of the biopolymeric network; the lower the binding energy, the higher the possibility of reorganizing the network and, therefore, the higher the viscous contribution over the elastic one. Thus, the generalized Maxwell model was used to analyze the linear viscoelastic properties of hydrogels based on gellan, pectin, and their mixtures. Fig 7 shows the fitting of the model to the experimental G' data for representative gel systems (The modeling results for all systems examined in this work are shown in Table 1S). Since all systems studied in this work were solid-viscoelastic materials, only the results of the modeling of G' are shown and discussed.

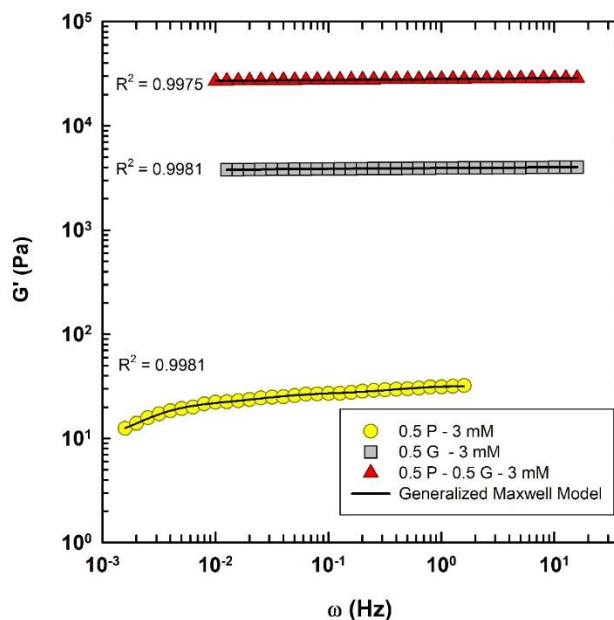


Fig. 7 Storage moduli ($G'(\omega)$) at 25 °C for representative systems examined in this work. The line shows the best fit of the generalized Maxwell model with three elements.

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

Table 3 shows the viscoelastic properties (equilibrium modulus (G_e), shear moduli (G), maximum relaxation time (λ_1)) and network parameters (cross-link density (ρ_x) and average network mesh size (ξ)) for the systems examined. Low values of G_e characterize the viscoelastic behavior of pectin gels (< 44 Pa) and G (< 87 Pa), which is congruent with the values of $G'(\omega)$ in the mechanical spectra (Fig 3), but the relaxation times are noticeably higher ($401.9 < \lambda_1 < 529.6$ s) than those displayed by gellan ($18.4 < \lambda_1 < 29.3$ s). The prolonged relaxation processes in pectin- Ca^{2+} systems are attributed to the broad distribution of molar masses ($M_w/M_n=4.43$, Table 2) and the complex structure of citrus pectin (i.e side branches, extension, and distribution of homogalacturonan domains). That complex structure gives rise to more transient cross-links of lower binding energy, and their rupture and renovation cause more viscous dissipation, low values of cross-link densities (ρ_x), and larger mesh sizes ($44.83 < \xi < 93.5$).

Furthermore, gellan forms robust and stable cross-linked systems characterized by high moduli (G_e , G) and low values of ξ (6.49 – 16.56 nm). Their stress-relaxation processes or chain rearrangements to attain conformations of lower-energetic state take place at shorter times than pectin- Ca^{2+} gels; namely, the gel elasticity is predominant over the viscous dissipations, according to the relaxation time concept ($\lambda = \eta/G$). Similar values of ξ (16.7 – 4.92 nm) were reported for alginate hydrogels (2 % w/w) cross-linked with CaCl_2 (0.17 to 2 % w/v) (Kopač, Ručigaj, & Krajnc, 2020) and for chemically cross-linked gelatin network (2.5 to 4.2 nm) (Kuijpers et al., 1999), using the same approach to estimate network parameters.

Otherwise, pectin-gellan mixtures showed G_e and G values higher than gellan, which agrees with the viscoelastic properties discussed before, and the relaxation times were intermediate but closer to those of gellan. The polymer concentration in mixed gels was twice that of the single gels; consequently, the mixed networks were more reticulated, and ξ decreased as gellan and calcium concentrations increased, reaching ξ -values close to 6 nm. The exception is the 0.3P - 0.5G – 5 mM system;

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

its anomalous behavior was discussed in section 3.3, and it is due to the formation of a less cross-linked network than 0.5 G – 5 mM. The values of relaxation times in mixed gels suggest that the branched and more complex pectin structure allows more chain rearrangements inside the mixed network, resulting in higher relaxation times than those of gellan single gels.

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

Table 3. Equilibrium moduli (G_e), shear moduli (G), maximum relaxation times (λ_1), cross-link density (ρ_x), and average network mesh size (ξ) for pectin-CaCl₂, gellan-CaCl₂ and their blends.

	CaCl ₂ (mM)	G_e (Pa)	G (Pa)	λ_1 (s)	ρ_x (mol/m ³)	ξ (nm)
Pectin (g/100 g)						
0.3	3	2.39	9.66	414.5	0.004	93.35
0.3	5	5.37	15.57	529.6	0.006	79.62
0.5	3	8.65	32.07	401.9	0.013	62.58
0.5	5	43.9	87.19	415.2	0.035	44.83
Gellan (g/100 g)						
0.3	3	1632.6	1729.2	27.0	0.698	16.56
0.3	5	5905.4	6182.1	18.4	2.495	10.83
0.5	3	3788.6	4032.4	29.3	1.627	12.49
0.5	5	27218	28728	25.7	11.60	6.49
Pectin-Gellan (g/100 g)						
0.3-0.3	3	6667.3	7263.8	39.2	2.932	10.27
0.3-0.3	5	12909.7	13913	46.7	5.615	8.27
0.5-0.3	3	4461.3	4863.7	50.4	1.963	11.73
0.5-0.3	5	11444.8	12599	41.7	5.085	8.54
0.3-0.5	3	10288.7	11263	55.2	4.546	8.87
0.3-0.5	5	16617.8	17691	20.9	7.140	7.63
0.5-0.5	3	26894.5	28751	39.9	11.60	6.49
0.5-0.5	5	32710.2	34710	16.7	14.01	6.09

4. CONCLUSIONS

The macromolecular network organization of mixed gels containing citrus pectin (0.3 and 0.5 g/100 g), gellan (0.3 and 0.5 g/100 g), and CaCl₂ (3 and 5 mM) resulted in more rigid gels characterized by narrow meshes (6.1 to 11.7 nm) and slower rearrangements of polymer chains compared to gellan gels. This result can be due to more physical interactions attributed to more active points for cross-linking in gellan and the contribution of side chains in the pectin structure for forming additional intermolecular interactions, which increased the connectivity and the elastic character of the mixed networks. In addition, the branched and more complex pectin structure allowed more configurational reorganizations inside the mixed network, resulting in higher relaxation times than those of gellan single gels. This study provides new insights into the design of novel polysaccharide-based hydrogels for biotechnological applications, particularly in the food technology, pharmaceutical, biomedical, and biodegradable packaging fields, where the understanding of the viscoelastic properties of that kind of hydrogels is fundamental for its functionality and design of delivery systems.

CRedit author statement

Rivera-Hernández: Data curation, Investigation, Formal analysis, Writing-Original draft preparation. **Chavarría-Hernández:** Methodology, Formal analysis, Writing-Reviewing and Editing, Project administration. **Tecante:** Formal analysis, Writing-Reviewing and Editing. **López-Ortega:** Methodology, Investigation, Writing-Reviewing and Editing. **López-Cuellar:** Methodology, Writing-Reviewing and Editing. **Rodríguez-Hernández:** Data curation, Methodology, Formal analysis, Writing-Original draft preparation, Writing-Reviewing and Editing, Project administration.

Declaration of competing interest: The authors declare no conflict of interest.

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

Acknowledgments

L. Rivera-Hernández acknowledges the scholarship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (CVU 699123) for PhD studies. This work was supported by CONACyT [grant numbers 316558; 238359; 230138; 254437; 269805].

5. REFERENCES

- Alba, K., MacNaughtan, W., Laws, A. P., Foster, T. J., Campbell, G. M., & Kontogiorgos, V. (2018). Fractionation and characterization of dietary fibre from blackcurrant pomace. *Food Hydrocoll*, 81, 398-408. doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.03.023
- Baumgaertel, M., & Winter, H. H. (1989). Determination of discrete relaxation and retardation time spectra from dynamic mechanical data. *Rheologica Acta*, 28(6), 511-519. doi: 10.1007/BF01332922
- Cao, L., Lu, W., Mata, A., Nishinari, K., & Fang, Y. (2020). Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: A review. *Carbohydr Polym*, 242, 116389
- Chatjigakis, A. K., Pappas, C., Proxenia, N., Kalantzi, O., Rodis, P., & Polissiou, M. (1998). FT-IR spectroscopic determination of the degree of esterification of cell wall pectins from stored peaches and correlation to textural changes. *Carbohydr Polym*, 37, 14.
- Chen, Zheng, J., Zhang, L., Cheng, H., Orfila, C., Ye, X., & Chen, J. (2021). Synergistic gelling mechanism of RG-I rich citrus pectic polysaccharide at different esterification degree in calcium-induced gelation. *Food Chem*, 350, 129177
- Das, M., & Giri, T. K. (2020). Hydrogels based on gellan gum in cell delivery and drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 56, 101586
- Destruel, P. L., Zeng, N., Seguin, J., Douat, S., Rosa, F., Brignole-Baudouin, F., . . . Boudy, V. (2020). Novel in situ gelling ophthalmic drug delivery system based on gellan gum and hydroxyethylcellulose: Innovative rheological characterization, in vitro and in vivo evidence of a sustained precorneal retention time. *Int J Pharm*, 574, 118734
- Díaz-Rojas, E. I., Pacheco-Aguilar, R., Lizardi, J., Argüelles-Monal, W., Valdez, M. A., Rinaudo, M., & Goycoolea, F. M. (2004). Linseed pectin: gelling properties and performance as an encapsulation matrix for shark liver oil. *Food Hydrocolloids*, 18(2), 293-304. doi: 10.1016/s0268-005x(03)00085-7
- Ferry, J. D. (1980). *Viscoelastic properties of polymers* (Third ed.). Canada: John Wiley & Sons.
- Filisetti-Cozzi, T. M. C. C., & Carpita, N. C. (1991). Measurement of Uronic Acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*, 197, 157-162.
- Fraeye, I., Doungla, E., Duvetter, T., Moldenaers, P., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2009). Influence of intrinsic and extrinsic factors on rheology of pectin-calcium gels. *Food Hydrocoll*, 23(8), 2069-2077
- Freitas, C. M. P., Coimbra, J. S. R., Souza, V. G. L., & Sousa, R. C. S. (2021). Structure and Applications of Pectin in Food, Biomedical, and Pharmaceutical Industry: A Review. *Coatings*, 11(8)
- Gai, Z., Wang, X., Zhang, X., Su, F., Wang, X., Tang, H., . . . Xu, P. (2011). Genome sequence of *Sphingomonas elodea* ATCC 31461, a highly productive industrial strain of gellan gum. *J Bacteriol*, 193(24), 7015-7016. doi: 10.1128/JB.06307-11

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

- Gigli, J., Garnier, C., & Piazza, L. (2009). Rheological behaviour of low-methoxyl pectin gels over an extended frequency window. *Food Hydrocoll*, 23(5), 1406-1412.
- Goodwin, J., & Hughes, R. (2008). *Rheology for Chemists An Introduction* (2nd ed.). Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.
- Grassi, M., Lapasin, R., Coviello, T., Matricardi, P., & Di Meo, C. (2009). Scleroglucan/borax/drug hydrogels: Structure characterization by means of rheological and diffusion experiments. *Carbohydr Polym*, 78, 377-383
- Huang, Y., Singh, P. P., Tang, J., & Swanson, B. G. (2004). Gelling temperatures of high acyl gellan as affected by monovalent and divalent cations with dynamic rheological analysis. *Carbohydr Polym*, 56(1), 27-33. doi: 10.1016/j.carbpol.2003.11.014
- Kačuráková, M., Capek, P., Sasinková, V., Wellner, N., & Ebringerová, A. (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydr Polym*, 43(2), 195-203. doi: [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00151-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00151-X)
- Kaur, J., & Kaur, G. (2018). Optimization of pH conditions and characterization of polyelectrolyte complexes between gellan gum and cationic guar gum. *Polym Adv Technol*, 29(12), 3035-3048.
- Kopač, T., Ručigaj, A., & Krajnc, M. (2020). The mutual effect of the crosslinker and biopolymer concentration on the desired hydrogel properties. *Int J Biol Macromol*, 159, 557-569.
- Kuijpers, A. J., Engbers, G. H. M., Feijen, J., De Smedt, S. C., Meyvis, T. K. L., Demeester, J., . . . Dankert, J. (1999). Characterization of the Network Structure of Carbodiimide Cross-Linked Gelatin Gels. *Macromolecules*, 32(10), 3325-3333.
- Lapasin, R., & Prici, S. (1995). *Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications*: Springer.
- Lira-Ortiz, A. L., Reséndiz-Vega, F., Ríos-Leal, E., Contreras-Esquivel, J. C., Chavarría-Hernández, N., Vargas-Torres, A., & Rodríguez-Hernández, A. I. (2014). Pectins from waste of prickly pear fruits (*Opuntia albicarpa* Scheinvar 'Reyna'): Chemical and rheological properties. *Food Hydrocoll*, 37, 93-99
- Maciel, V. B., Yoshida, C. M., & Franco, T. T. (2015). Chitosan/pectin polyelectrolyte complex as a pH indicator. *Carbohydr Polym*, 132, 537-545
- Milas, M., & Rinaudo, M. (1996). The gellan sol-gel transition. *Carbohydr Polym*, 30, 177-184.
- Milivojevic, M., Pajic-Lijakovic, I., Bugarski, B., Nayak, A. K., & Hasnain, M. S. (2019). Chapter 6 - Gellan gum in drug delivery applications. In M. S. Hasnain & A. K. Nayak (Eds.), *Natural Polysaccharides in Drug Delivery and Biomedical Applications* (pp. 145-186): Academic Press.
- Morales-Martínez, Y., López-Cuellar, M. d. R., Chavarría-Hernández, N., & Rodríguez-Hernández, A. I. (2018). Rheological behaviour of acetylated pectins from cactus pear fruits (*Opuntia albicarpa* and *O. matudae*). *Food Hydrocoll*, 85, 110-119

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

- Morris, E. R., Nishinari, K., & Rinaudo, M. (2012). Gelation of gellan – A review. *Food Hydrocoll*, 28(2), 373-411. doi: 10.1016/j.foodhyd.2012.01.004
- Ngouemazong, D. E., Jolie, R. P., Cardinaels, R., Fraeye, I., Van Loey, A., Moldenaers, P., & Hendrickx, M. (2012). Stiffness of Ca(2+)-pectin gels: combined effects of degree and pattern of methylesterification for various Ca(2+) concentrations. *Carbohydr Res*, 348, 69-76
- Noda, S., Funami, T., Nakauma, M., Asai, I., Takahashi, R., Al-Assaf, S., . . . Phillips, G. O. (2008). Molecular structures of gellan gum imaged with atomic force microscopy in relation to the rheological behavior in aqueous systems. 1. Gellan gum with various acyl contents in the presence and absence of potassium. *Food Hydrocoll*, 22(6), 1148-1159
- Palumbo, F. S., Federico, S., Pitarresi, G., Fiorica, C., & Giammona, G. (2020). Gellan gum-based delivery systems of therapeutic agents and cells. *Carbohydr Polym*, 229, 115430. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115430
- Pérez-Campos, S. J., Chavarría-Hernández, N., Tecante, A., Ramírez-Gilly, M., & Rodríguez-Hernández, A. I. (2012). Gelation and microstructure of dilute gellan solutions with calcium ions. *Food Hydrocoll*, 28(2), 291-300. doi: 10.1016/j.foodhyd.2012.01.008
- Prezotti, F. G., Cury, B. S., & Evangelista, R. C. (2014). Mucoadhesive beads of gellan gum/pectin intended to controlled delivery of drugs. *Carbohydr Polym*, 113, 286-295
- Rodríguez-Hernández, A. I., Durand, S., Garnier, C., Tecante, A., & Doublier, J. L. (2003). Rheology-structure properties of gellan systems: evidence of network formation at low gellan concentrations. *Food Hydrocoll*, 17(5), 621-628. doi: 10.1016/s0268-005x(02)00123-6
- Sriamornsak, P., & Wattanakorn, N. (2008). Rheological synergy in aqueous mixtures of pectin and mucin. *Carbohydr Polym*, 74(3), 474-481
- Tang, J., Tung, M. A., & Zeng, Y. (1996). Compression strength and deformation of gellan gels formed with mono- and divalent cations. *Carbohydrate Polymers*, 29(1), 11-16. doi: [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(95\)00124-7](https://doi.org/10.1016/0144-8617(95)00124-7)
- Winter, H. H. (1997). Analysis of dynamic mechanical data: inversion into a relaxation time spectrum and consistency check. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 68(2), 225-239. doi: [https://doi.org/10.1016/S0377-0257\(96\)01512-1](https://doi.org/10.1016/S0377-0257(96)01512-1)
- Yapo, B. M., & Gnakri, D. (2015). Pectic Polysaccharides and their functional properties. In K. G. Ramawat & J.-M. Merillon (Eds.), *Polysaccharides* (pp. 1729-1749). Switzerland Springer.
- Zia, K. M., Tabasum, S., Khan, M. F., Akram, N., Akhter, N., Noreen, A., & Zuber, M. (2018). Recent trends on gellan gum blends with natural and synthetic polymers: A review. *Int J Biol Macromol*, 109, 1068-1087

VII. RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS

Realizar análisis de imágenes de hidrogeles, usando técnicas como microscopía de fuerza atómica o microscopía confocal de barrido laser para lograr esclarecer el mecanismo de gelificación de pectina y gelana especialmente en hidrogeles mixtos.

Diseñar hidrogeles de interés con la inclusión de algún compuesto activo y evaluar sus cinéticas de liberación en función de cambios en el pH, fuerza iónica y/o temperatura y buscar la posible relación de estos resultados con el tiempo de relajación, tamaño de malla y densidad de entrecruzamiento.

ANEXO A

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

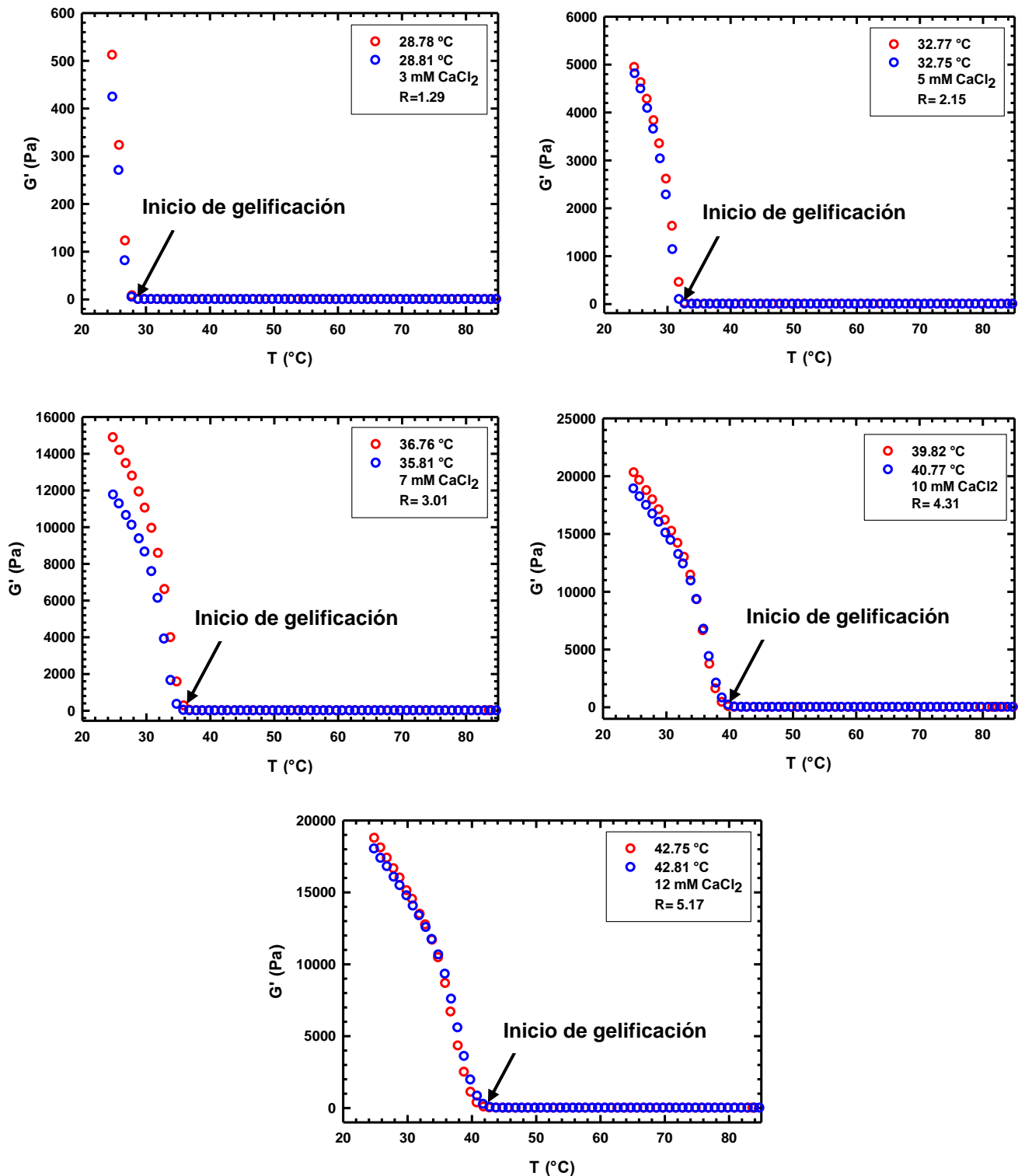


Figura 16. Evolución del incremento en G' durante el enfriamiento de disoluciones de **gelatina 0.3 g/100 g** en presencia de distintas concentraciones de calcio. Determinaciones realizadas por duplicado, símbolos rojos= primera réplica; símbolos azules= segunda réplica. Determinaciones realizadas a 1 rad/s dentro de la zona de viscoelasticidad lineal, usando una tasa de enfriamiento de 1 °C/min. R representa la relación Ca^{2+} (meq·L⁻¹)/gelatina (meq·L⁻¹) en cada muestra.

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

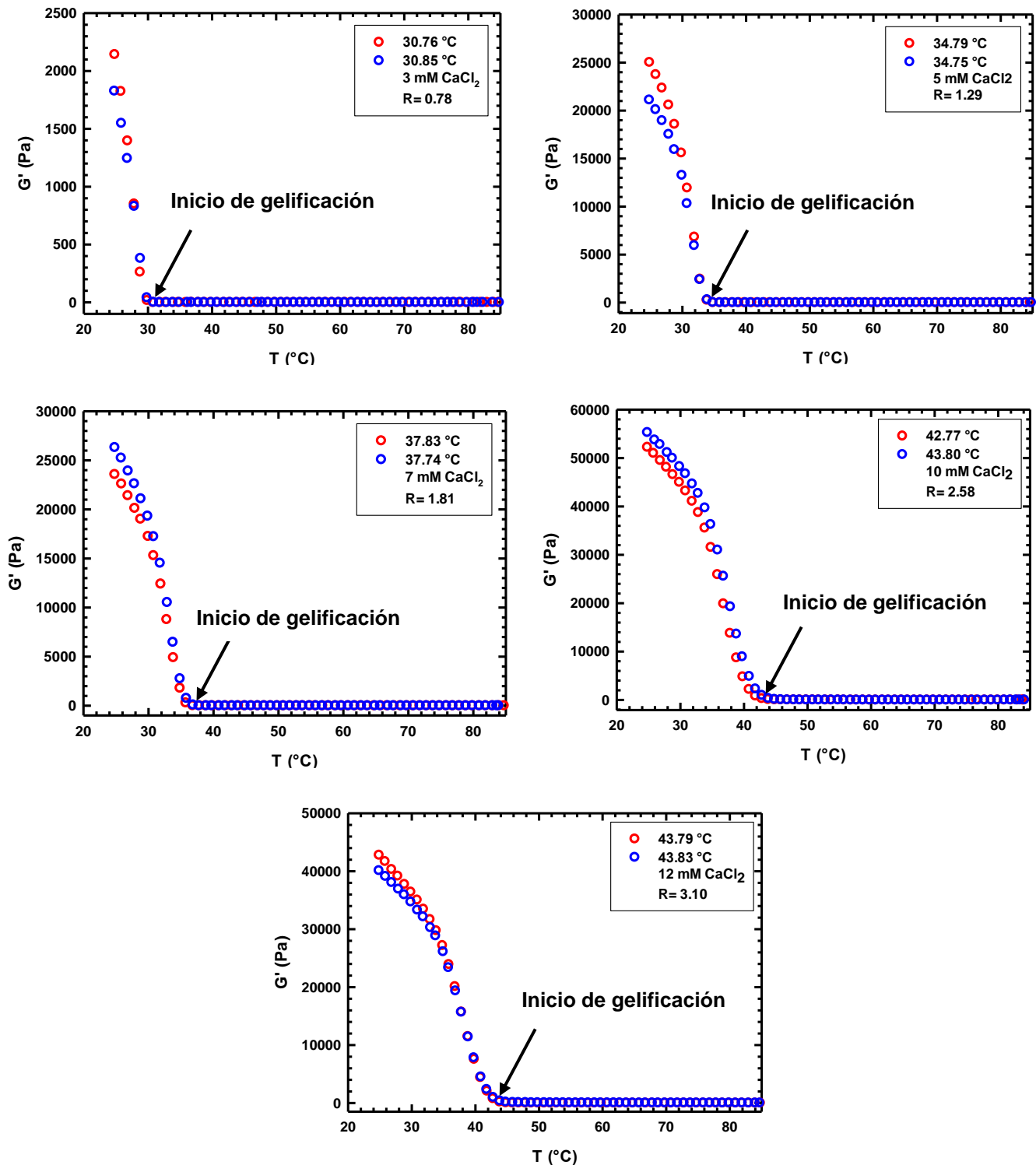


Figura 17. Evolución del incremento en G' durante el enfriamiento de disoluciones de **gelana 0.5 g/100 g** en presencia de distintas concentraciones de calcio. Determinaciones realizadas por duplicado, símbolos rojos= primera réplica; símbolos azules= segunda réplica. Determinaciones realizadas a 1 rad/s dentro de la zona de viscoelasticidad lineal, usando una tasa de enfriamiento de 1 °C/min. R representa la relación Ca^{2+} (meq·L⁻¹)/gelana (meq·L⁻¹) en cada muestra.

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

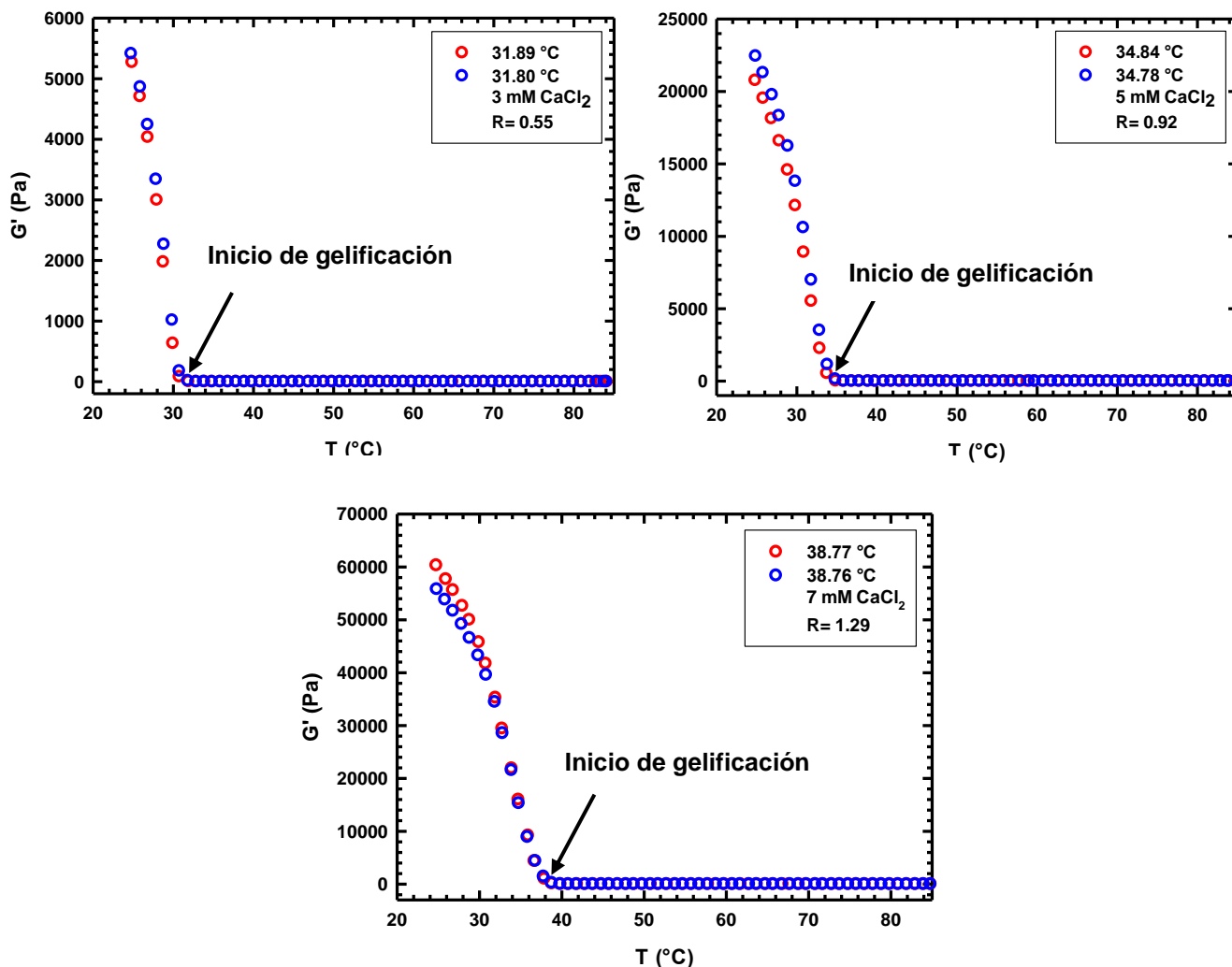


Figura 18. Evolución del incremento en G' durante el enfriamiento de disoluciones de **gelana 0.7 g/100 g** en presencia de distintas concentraciones de calcio. Determinaciones realizadas por duplicado, símbolos rojos= primera réplica; símbolos azules= segunda réplica. Determinaciones realizadas a 1 rad/s dentro de la zona de viscoelasticidad lineal, usando una tasa de enfriamiento de 1 °C/min. R representa la relación Ca^{2+} (meq·L⁻¹)/gelana (meq·L⁻¹) en cada muestra.

ANEXO B

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

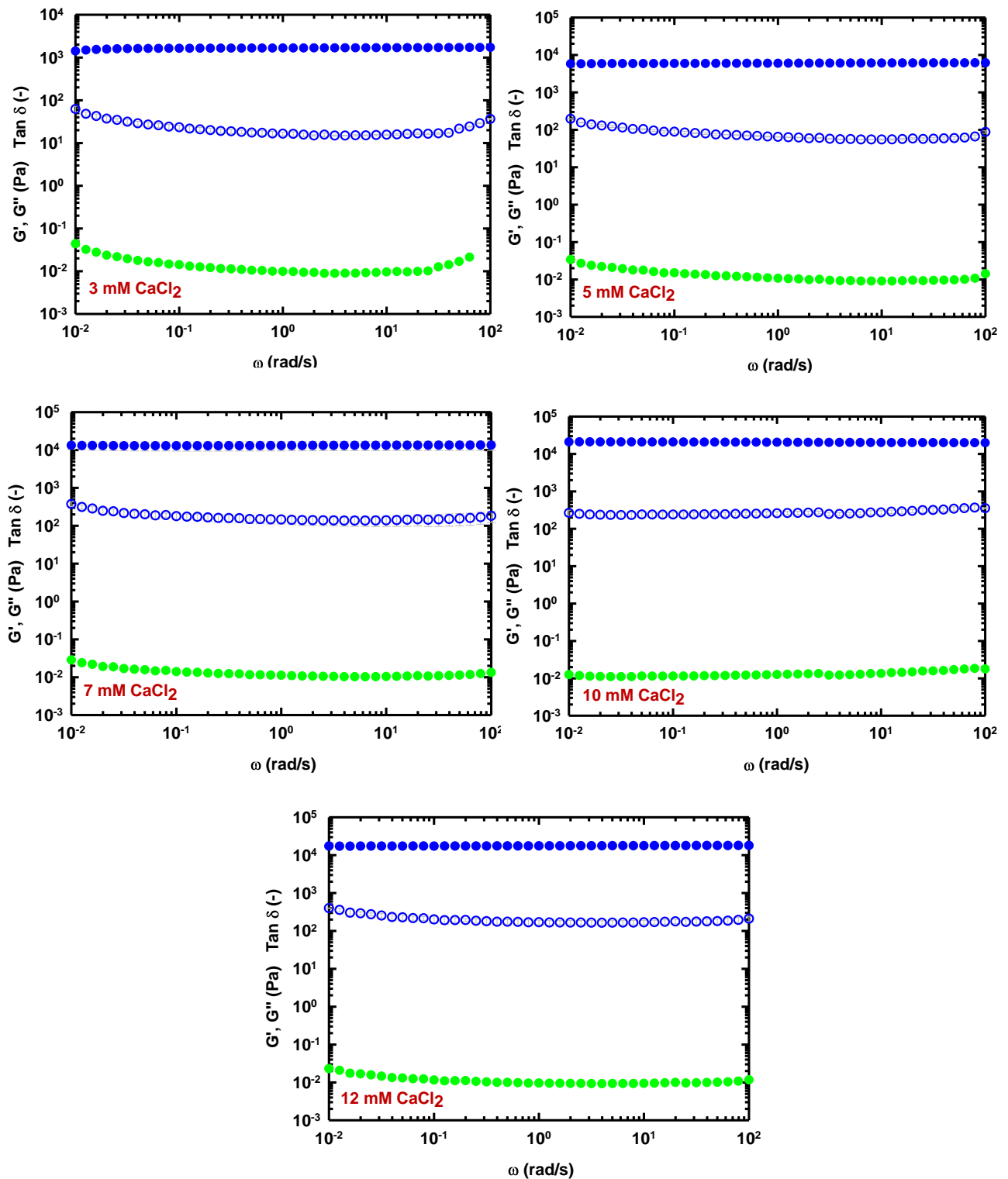


Figura 19. Espectros mecánicos para sistemas de **gelana 0.3 g/100 g** con distintas concentraciones de CaCl_2 . Variación de G' (ω); (símbolos azules llenos), G'' (ω); (símbolos azules vacíos) y $\tan \delta$ (ω); (símbolos verdes) con la frecuencia angular. Los datos fueron obtenidos dentro de la zona de viscoelasticidad lineal. Las barras de error representan la desviación estándar.

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

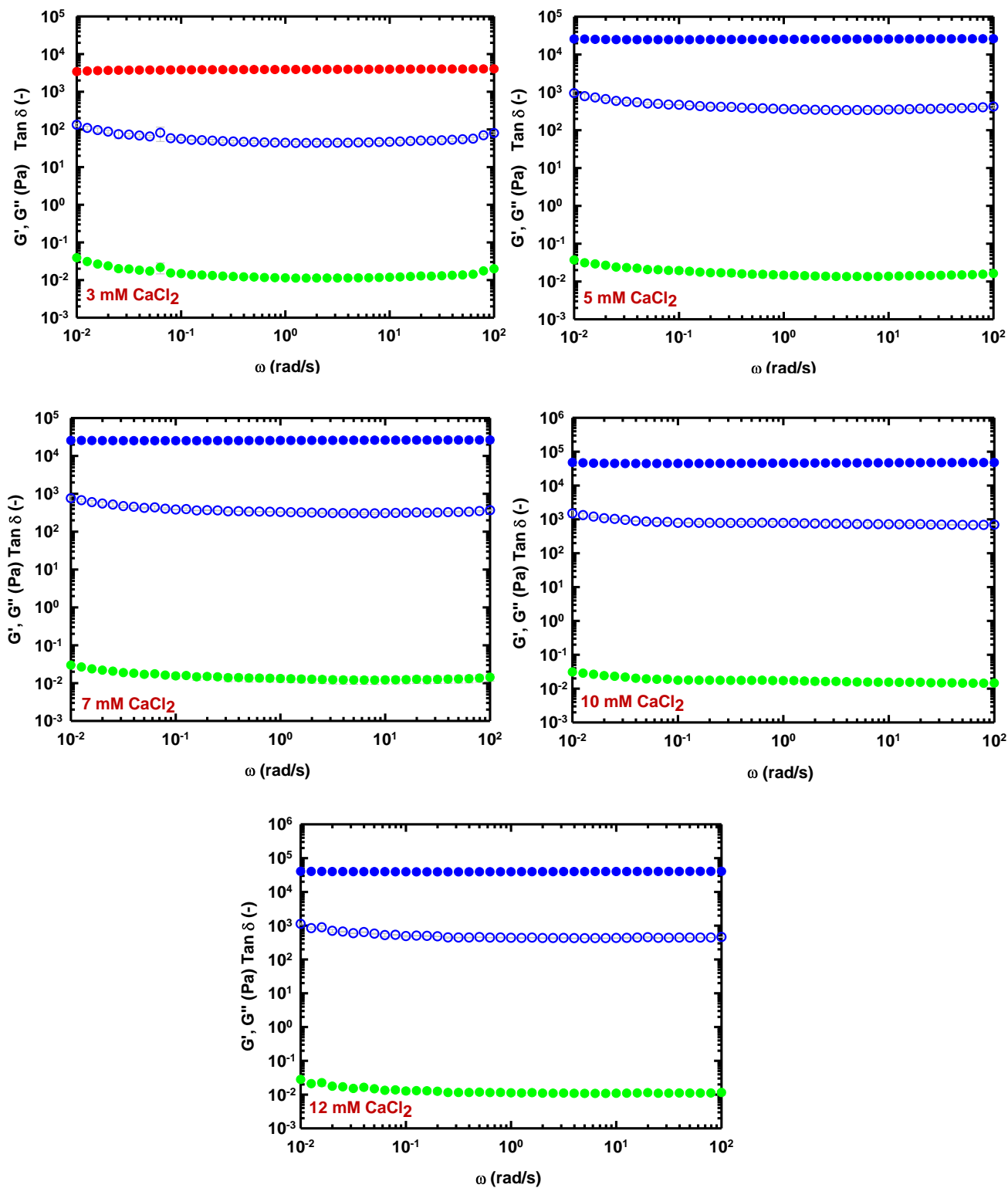


Figura 20. Espectros mecánicos para sistemas de **gelatina 0.5 g/100 g** con distintas concentraciones de CaCl_2 . Variación de G' (ω); (símbolos azules llenos), G'' (ω); (símbolos azules vacíos) y $\tan \delta$ (ω); (símbolos verdes) con la frecuencia angular. Los datos fueron obtenidos dentro de la zona de viscoelasticidad lineal. Las barras de error representan la desviación estándar.

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

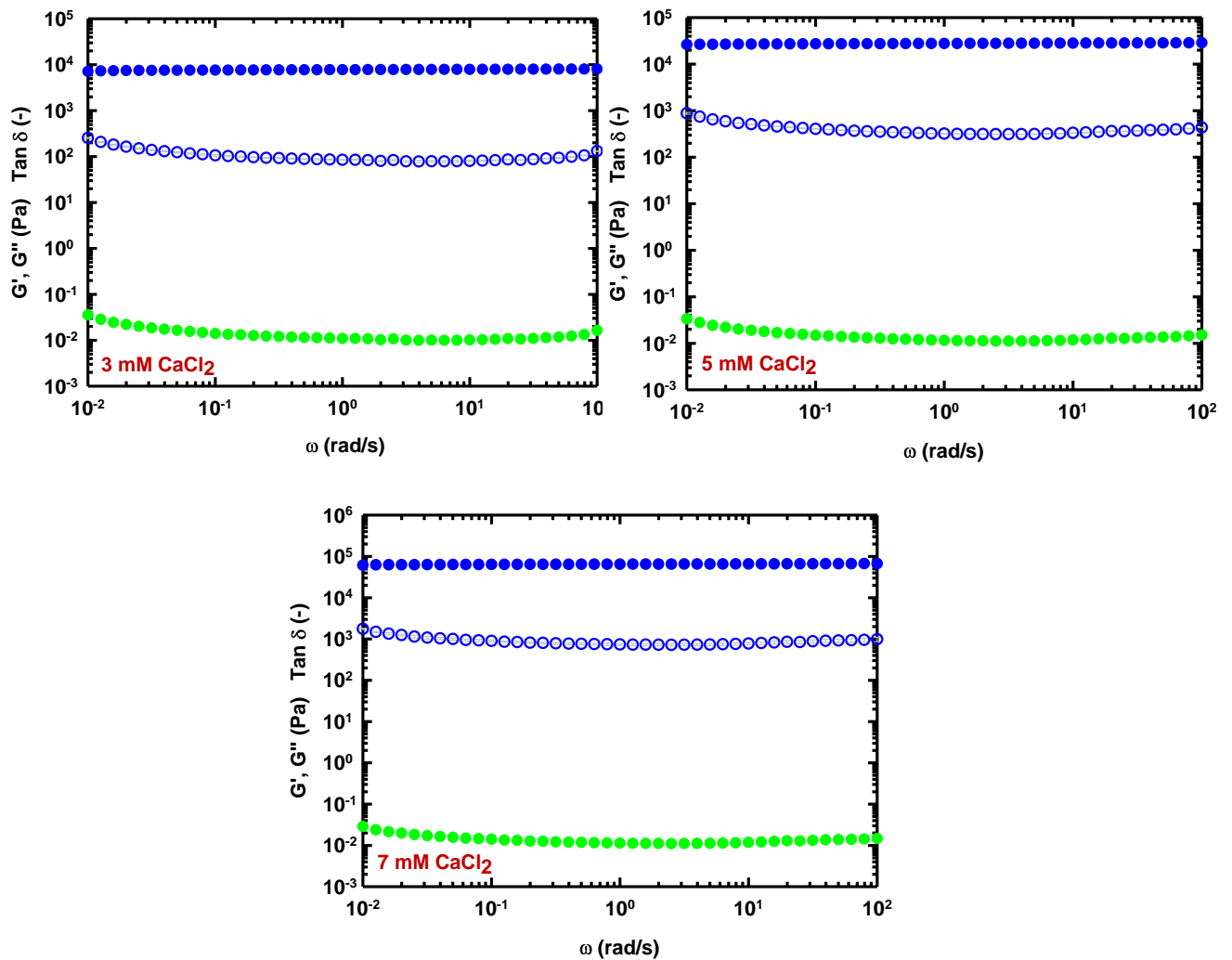


Figura 21. Espectros mecánicos para sistemas de **gelatina 0.7 g/100 g** con distintas concentraciones de CaCl_2 . Variación de $G'(\omega)$; (símbolos azules llenos), $G''(\omega)$; (símbolos azules vacíos) y $\tan \delta(\omega)$; (símbolos verdes) con la frecuencia angular. Los datos fueron obtenidos dentro de la zona de viscoelasticidad lineal. Las barras de error representan la desviación estándar.

ANEXO C

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

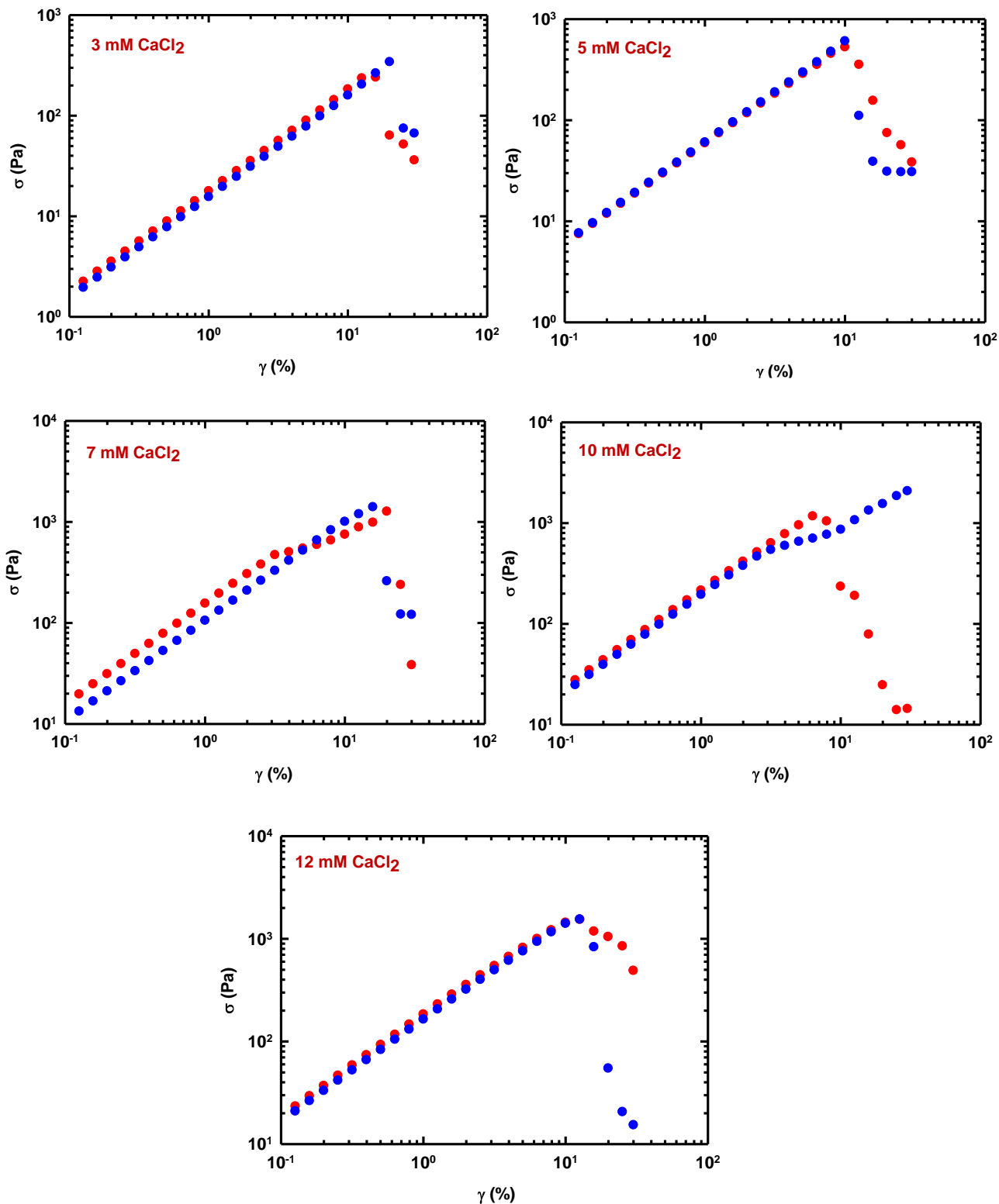


Figura 22. Zona de viscoelasticidad lineal en hidrogeles de **gelana 0.3 g/100 g** con distintas concentraciones de CaCl_2 . Determinaciones realizadas por duplicado, símbolos rojos= primera réplica; símbolos azules= segunda réplica. Pruebas realizadas a 25 °C y 6.284 rad/s.

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

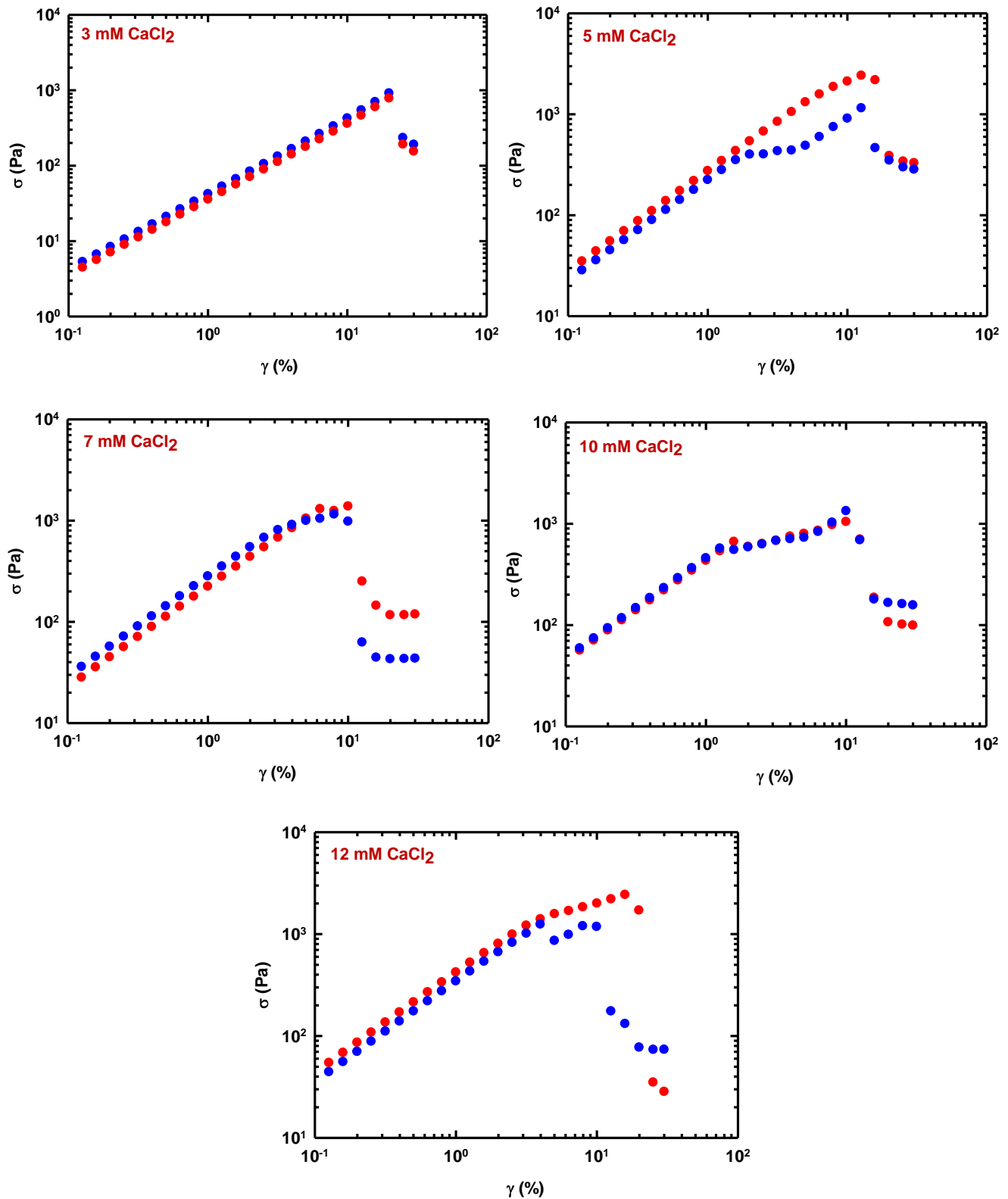


Figura 23. Zona de viscoelasticidad lineal en hidrogeles de **gelana 0.5 g/100 g** con distintas concentraciones de CaCl_2 . Determinaciones realizadas por duplicado, símbolos rojos= primera réplica; símbolos azules= segunda réplica. Pruebas realizadas a 25 °C y 6.284 rad/s.

“Reología-funcionalidad de hidrogel para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

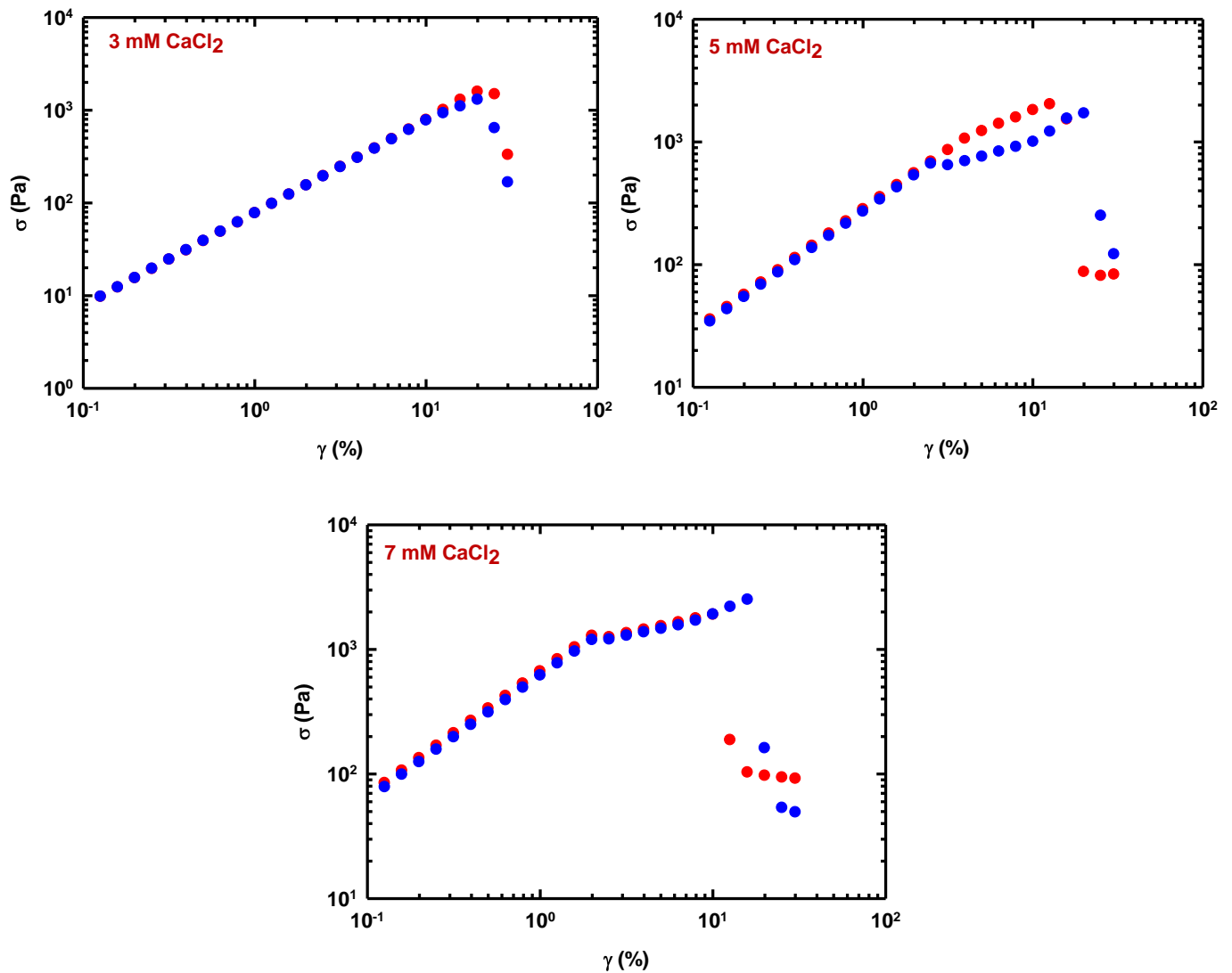


Figura 24. Zona de viscoelasticidad lineal en hidrogel de **gelana 0.7 g/100 g** con distintas concentraciones de CaCl₂. Determinaciones realizadas por duplicado, símbolos rojos = primera réplica; símbolos azules = segunda réplica. Pruebas realizadas a 25 °C y 6.284 rad/s.

ANEXO D

Supplementary material

Mixed gels based on low acyl gellan and citrus pectin: A linear viscoelastic analysis

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

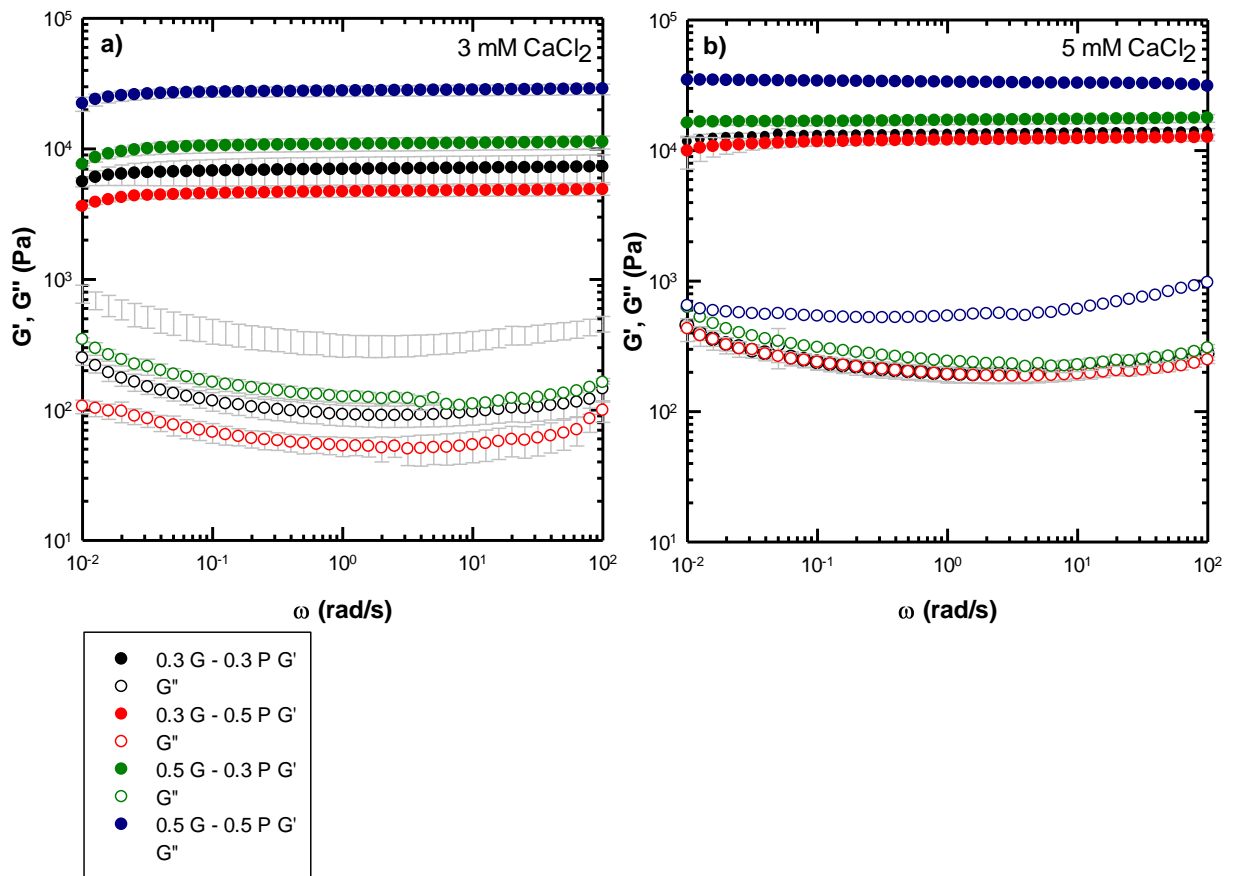


Figura 1S. Variation of G' (solid circles) and G'' (void circles) with angular frequency for gellan-pectin systems with a) 3 mM CaCl₂ and b) 5 mM CaCl₂. Data were obtained at 25 °C within the linear viscoelastic zone. Error bars represent the standard deviation.c

“Reología-funcionalidad de hidrogeles para la liberación controlada de compuestos bioactivos de interés alimentario y terapéutico”

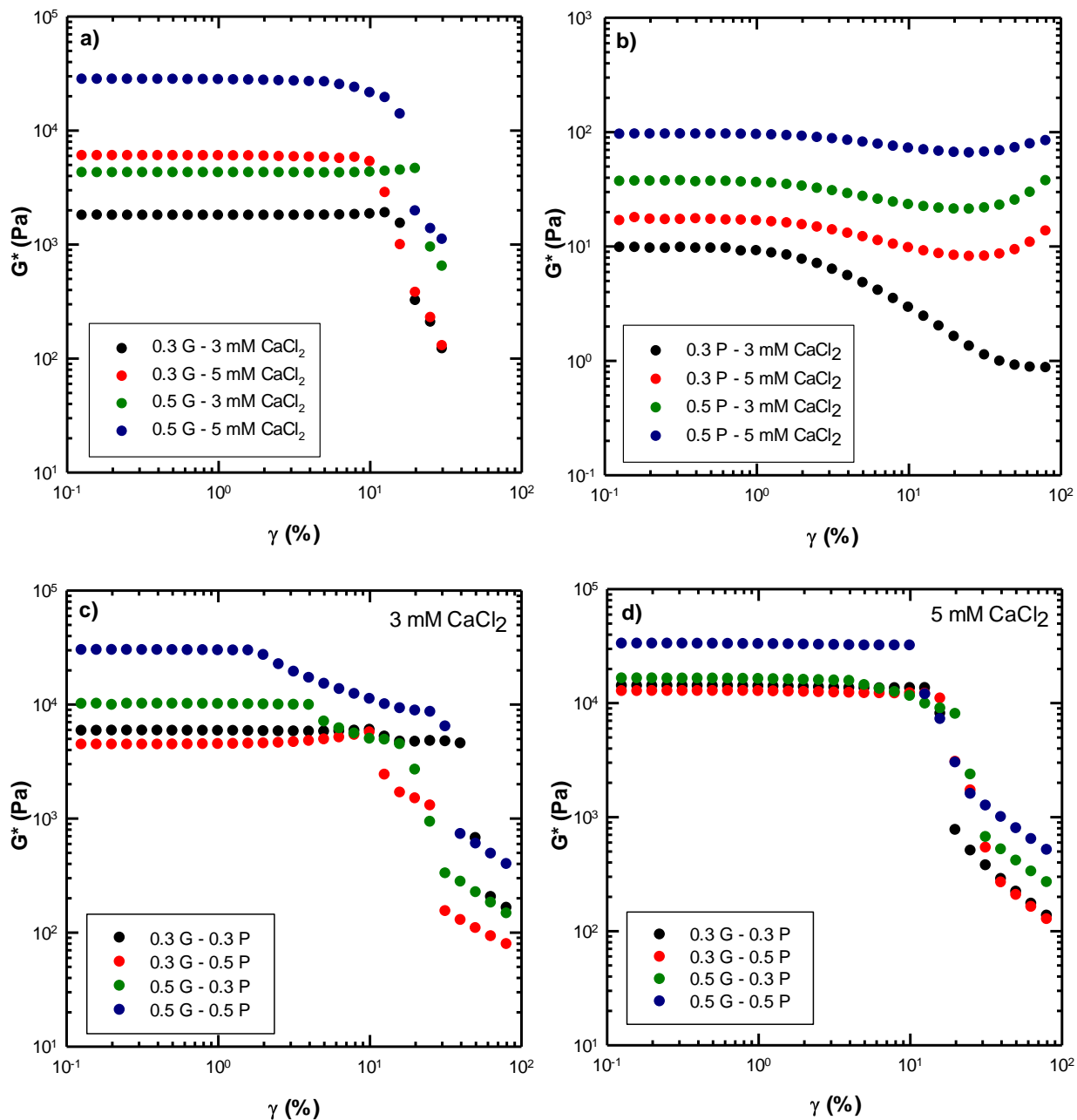


Figura 2S. Strain sweep of a) gellan, b) pectin systems and their mixtures gellan-pectin with c) 3 mM CaCl_2 and d) 5 mM CaCl_2 , at 25 °C and 1 Hz.