



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00070

Matrícula: 2113802923

MORFOLOGÍA Y PROPIEDADES REOLÓGICAS DE HIDROGELES DE GOMA XANTANA REFORZADOS CON PARTICULAS DE MONTMORILLONITA COMO BASE PARA LA FORMACIÓN DE EMULGELES DE ACEITE DE MANZANILLA.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 1 del mes de junio del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ELICEO SOSA HERNANDEZ
DRA. PAMELA CELESTE FLORES SILVA
DRA. EDITH AGAMA ACEVEDO
DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO



ROCIO DE LOS ANGELES GARCIA HERNANDEZ
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS (INGENIERIA QUIMICA)
DE: ROCIO DE LOS ANGELES GARCIA HERNANDEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JESUS ALBERTO OCHOA TAPIA

PRESIDENTE

DR. ELICEO SOSA HERNANDEZ

VOCAL

DRA. PAMELA CELESTE FLORES SILVA

VOCAL

DRA. EDITH AGAMA ACEVEDO

SECRETARIA

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO



**UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA**
Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

Morfología y propiedades reológicas de hidrogeles de goma de xantana reforzados con partículas de montmorillonita como base para la formación de emulgeles de aceite de manzanilla

TESIS

Que para obtener el grado de
Doctora en Ciencias (Ingeniería Química)

PRESENTA:

Rocío de los Ángeles García Hernández

Asesor:

Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter

Sinodales:

Dra. Angélica Román Guerrero

Dra. Pamela C. Flores Silva

Dra. Edith Agama Acevedo

Dr. Eliceo Sosa Hernández

Ciudad de México, 1° de junio de 2018

*“ Hay una fuerza motriz más poderosa
que el vapor, la energía y
la fuerza atómica, la voluntad”*

-Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jaime Vernon y al Dr. José Álvarez por su indiscutible apoyo y quienes contribuyeron en gran medida en mi formación. Personas con gran sabiduría que me ayudaron a llegar a donde me encuentro hoy, sin su guía y consejos no hubiera sido posible la realización de este proyecto, ha sido un privilegio.

A mis compañeros de laboratorio con quienes tuve oportunidad de compartir tiempo, espacio y proyectos. He aprendido algo bueno al trabajar con cada uno de ustedes.

Agradezco a mis sinodales por el tiempo empleado en la revisión del documento, sus comentarios y retroalimentación me guiaron en la mejora del trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por el apoyo recibido a través del proyecto Ciencia Básica 236500.

DEDICATORIAS

El presente documento y todo lo que representa se lo dedico a mis padres, por haberme forjado en la persona que soy el día de hoy. Todos mis logros por pequeños o grandes se los debo a ustedes, siempre me han motivado a ser una mejor versión de mi misma. Gracias por sus invaluable consejos y cada una de las palabras de aliento a lo largo de mi vida. No estaría aquí sin su esfuerzo, sacrificio y amor, se los agradezco de todo corazón. A mi hermano, por ser parte importante de mi vida.

A la persona que me ha acompañado en este aventurado trayecto, primero como amigo y colega ahora como mi compañero de vida. César, no tengo como agradecer tu incondicional ayuda, tu presencia en los diferentes aspectos de mi vida ha sido parte fundamental en la culminación de este proyecto y lo será de mucho otros.

A toda mi familia, por siempre apoyar mis decisiones y tenderme una mano siempre que lo he necesitado. Sé que quienes no están con nosotros en vida, se encuentran siempre en nuestros corazones.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2.1 Hidrogeles.....	2
2.1.1 Características, tipos y mecanismos de formación de hidrogeles	2
2.1.2 Polisacáridos como base para la formación de hidrogeles.....	4
2.1.3 Partículas como reforzantes estructurales	6
2.1.4 Trabajos previos de la incorporación de Mt en hidrogeles	8
2.1.5 Métodos de caracterización de hidrogeles	8
2.2 Emulgeles.....	11
2.2.1 Características de los emulgeles.....	11
2.2.2 Métodos de caracterización de emulgeles.....	12
3. Justificación.....	14
4. Hipótesis.....	14
5. Objetivos.....	15
5.1 General.....	15
5.2 Particulares.....	15
6. Materiales y métodos.....	16
6.1 Materiales.....	16
6.2 Metodología	16
6.2.1 Elaboración de los hidrogeles, Fase I.....	17
6.2.2 Obtención de los emulgeles, Fase II.....	17
6.2.3 Análisis de la microestructura	18
6.2.4 Difracción de rayos X	19
6.2.5 Dispersión de rayos X de bajo ángulo (SAXS).....	19
6.2.6 Espectroscopia Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)	19
6.2.7 Comportamiento reológico.....	20
6.2.8 Tamaño de partícula.....	20
6.2.9 Estabilidad acelerada.....	21
7. Resultados y Discusión.....	22
7.1 Caracterización de los hidrogeles reforzados, Fase I.....	22

7.1.1 Difracción de rayos X	24
7.1.2 Microscopía de transmisión electrónica.....	25
7.1.3 Dispersión de rayos X de bajo ángulo.....	27
7.1.4 Espectroscopia FTIR	28
7.1.5 Caracterización reológica de hidrogeles reforzados.....	31
7.2 Caracterización de emulgeles, Fase II	39
7.2.1 Microscopía confocal	39
7.3.2 Microscopía óptica y deformación de gota	41
7.3.3 Caracterización reológica de emulgeles	43
7.3.4 Distribución de tamaño de gota.....	47
8. Conclusiones.....	51
9. Bibliografía.....	53
10. Anexos	59
Pruebas de capacitancia de la fluencia (Creep Compliance)	59
Estructura de la goma xantana y montmorillonita	60
Goma Xantana.....	60
Montmorillonita	61
Perfiles de separación de fases, LUMiSizer	62
Artículo: Effects of clay concentration on the morphology and rheological properties of xanthan gum-based hydrogels reinforced with montmorillonite particles.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de entrecruzamiento para la formación de un gel.....	3
Figura 2 Comportamiento de rellenos activos (a) y pasivos (b).....	7
Figura 3. Fases metodológicas para la elaboración y caracterización de hidrogeles y emulgeles	17
Figura 4. Diagrama del proceso de elaboración de hidrogeles y emulgeles.....	18
Figura 5. Fotografía de los hidrogeles GX-Mt en posición invertida.....	22
Figura 6. Representación del entrecruzamiento de la GX con las partículas de Mt.....	23
Figura 7. (a) Difractograma de Mt, (b) difractograma de los hidrogeles GX-Mt.....	25
Figura 8. Micrografías TEM de hidrogeles XG-Mt: (a) H _{0.5} , (b) H ₁ , (c) H ₂ y (d) H ₄	26
Figura 9. Gráfica Kratky de los hidrogeles GX-Mt.....	27
Figura 10 Dimensión fractal a partir de SAXS de los hidrogeles XG-Mt.....	28
Figura 11. Espectro FTIR de la GX y Mt en el intervalo de 3750-500 cm ⁻¹	29
Figura 12 Espectro FTIR de hidrogeles GX-Mt.....	30
Figura 13. Curvas de flujo ascendentes y descendentes de los hidrogeles GX-Mt.....	31
Figura 14 Viscosidad aparente a 1.0 s ⁻¹ en función de la concentración de Mt	32
Figura 15. Barrido oscilatorio de deformación de hidrogeles GX-Mt.	33
Figura 16. Valores del G' y G'' en RLV con respecto a la concentración de Mt.	34
Figura 17 Curvas del barrido de temperatura de hidrogeles XG-Mt.....	35
Figura 18 Temperatura crítica de los hidrogeles GX-Mt en función de la concentración de Mt.	36
Figura 19. (a) Curvas de Creep-compliance de hidrogeles GX-Mt, (b) porcentaje de recuperación en función de la concentración de Mt, (c) constante de tiempo de relajación.....	37
Figura 20. Imagen de los emulgeles a diferentes concentraciones de arcilla en posición invertida.....	39

Figura 21. Imágenes de microscopía confocal de emulgeles GX-Mt.....	40
Figura 22 Imágenes de microscopía óptica de emulgeles GX-Mt (a)E ₀ , (b)E _{0.5} , (c) E _{1.0} , (d)E _{2.0} y (e)E _{4.0}	42
Figura 23. Porcentaje de deformación de las gotas de aceite	43
Figura 24. Curvas de flujo de emulgeles	44
Figura 25. Módulo elástico y viscoso de barridos de amplitud de emulgeles XG-Mt.	45
Figura 26. Comportamiento del módulo elástico respecto a la temperatura.	46
Figura 27. Comportamiento del módulo viscoso respecto a la temperatura.	47
Figura 28. (a) Distribución de tamaño de gota, (b) Monitoreo del tamaño promedio de gota, (c) Tamaño promedio de gota en función de la concentración de Mt en emulgeles.	48
Figura 29 Fotografía de emulgeles después del estudio de estabilidad.....	50

RESUMEN

En este trabajo se añadieron distintas concentraciones (0.5-4.0 % p/p) de partículas inorgánicas (montmorillonita, Mt) a una dispersión acuosa de goma de xantana (GX, 1 % p/p) y se evaluó el efecto de la concentración de Mt sobre la morfología y propiedades reológicas de los hidrogeles. Los resultados mostraron que a partir de una concentración crítica de Mt de aprox. 2 % p/p, los hidrogeles se volvieron capaces de soportar su propio peso. Estudios de rayos-X, rayos X de bajo ángulo (SAXS) y microscopía de transmisión electrónica (TEM) revelaron que hasta concentraciones del 1 % p/p de Mt las partículas se encontraban uniformemente dispersas y exfoliadas en la matriz de GX. A mayores concentraciones de partículas de Mt se forman aglomerados, lo que contribuye a la formación de puntos de unión promoviendo así la consolidación de los hidrogeles. A partir de los hidrogeles reforzados se elaboraron emulgeles con una fracción másica de fase dispersa (θ) de 0.25 de aceite de manzanilla. A mayor concentración de Mt, menor fue el tamaño promedio de gota del aceite de manzanilla y menor fue su índice de polidispersidad, lo cual resultó en emulgeles más estables contra factores agregativos.

Palabras Clave: emulgeles, hidrogeles, reología, tamaño de gota, estabilidad

1. Introducción

Recientemente se ha enfatizado el gran potencial que poseen los emulgeles (gotas de aceite dispersadas en un gel) en diferentes campos biotecnológicos como el farmacéutico, alimentario y cosmético. Sin embargo, en estos mismos campos, el uso de polímeros sintéticos para la obtención de la red polimérica (hidrogel) está restringido. La principal limitación se encuentra en lo concerniente a la biocompatibilidad, riesgos a la salud (*e.g.* toxicidad), biodegradabilidad y sustentabilidad. Desde esta perspectiva, el uso de biopolímeros naturales y modificados constituye una alternativa prometedora para el diseño de estos materiales.

La demanda en el uso de hidrogeles obtenidos a partir de polímeros naturales se ha incrementado debido a la versatilidad de estos materiales, la cual ha sido aprovechada en la entrega de principios activos, como antioxidantes en productos alimenticios (Córdoba *et al.*, 2013), cosméticos (Schnitzler *et al.*, 2013), antimicrobianos para el tratamiento de la piel (Gao *et al.*, 2014), entre otros. En este mismo sentido, es posible elaborar productos en los que se pueda modificar y controlar las propiedades de liberación molecular de componentes bioactivos como antioxidantes naturales, células, grasas insaturadas, medicamentos, entre otros (Deladino *et al.*, 2008; Gbassi *et al.*, 2009; Pongjanyakul y Rongthong, 2010).

A pesar de estas ventajas, los hidrogeles tienden a presentar una alta deformación y a liberar grandes cantidades de agua bajo la influencia de esfuerzos cortantes, por lo que para mejorar su integridad se han utilizado métodos de entrecruzamiento (Zanina y Budtova, 2002; Vervoort y Budtova, 2005). El entrecruzamiento químico, ocurre cuando las cadenas de un biopolímero se entrecruzan con agentes químicos vía enlaces covalentes, y por lo general su uso se trata de limitar en productos destinados para uso humano directo o indirecto, ya que se pueden generar fracciones residuales de compuestos que representan un riesgo para la salud humana, por lo que una alternativa es formar hidrogeles entrecruzados físicamente (Xiao y Yang, 2006).

2. Marco Teórico y Antecedentes

2.1 Hidrogeles

2.1.1 Características, tipos y mecanismos de formación de hidrogeles

Los hidrocoloides son un grupo heterogéneo de polímeros de cadenas largas (polisacáridos y proteínas), caracterizados por la posibilidad de formar dispersiones viscosas y/o formar geles al entrar en contacto con agua. La presencia de un número grande de grupos hidroxilo (-OH) en su estructura, les proporciona la alta afinidad por enlazarse con moléculas de agua, brindándoles un comportamiento hidrofílico. En la industria se usan como agentes espesantes, gelificantes, emulsificantes, estabilizantes, y como controladores de crecimiento de cristales (Saha y Bhattacharya, 2010).

Mientras que todos los hidrocoloides modifican la viscosidad de dispersiones acuosas, sólo algunos tienen adicionalmente la capacidad de formar geles. Un hidrogel es una red polimérica entrelazada la cual es resultado de una reacción simple de uno o más monómeros. Este material polimérico exhibe la habilidad de hincharse y retener una significativa fracción de agua dentro de su estructura, pero sin disolverse en ella. La habilidad de los hidrogeles para absorber agua surge de los grupos funcionales hidrofílicos unidos a la estructura del polímero, mientras que su resistencia a la disolución surge de la reticulación y entrecruzamiento de las cadenas de la red (Ahmed, 2015). Este proceso de formación involucra la asociación al azar de los segmentos del polímero disperso, de tal forma que en la red tridimensional el solvente se encuentra en los intersticios. Las regiones de agrupación conocidas como ‘zonas de unión o nodos’ pueden estar integradas por dos o más cadenas de polímeros.

La gelificación es básicamente la formación de estas zonas de unión (Oakenfull, 1987) y puede involucrar una jerarquía de estructuras en donde la más común es la agregación de una cadena de inter-enlaces en las zonas de unión, que va a servir como base para la red tridimensional. El arreglo físico de estas zonas dentro de la red puede ser afectado por diversos parámetros como la temperatura, la presencia de iones, y la estructura inherente del hidrocoloide, ejemplo de esto se muestra en la Figura 1. Existen tres mecanismos principales

para la gelificación de hidrocoloides: gelificación iónica, por enfriamiento y por calentamiento. La estructura rígida resultante presenta resistencia al flujo, pero se deforma, es decir, tiene propiedades de un material viscoelástico (exhibe tanto características de un líquido como de un sólido).

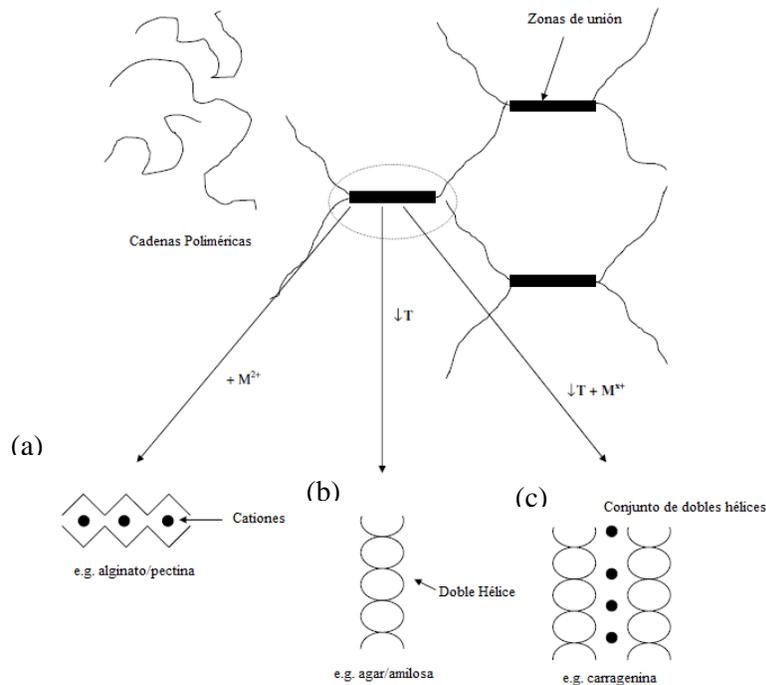


Figura 1. Mecanismos de entrecruzamiento para la formación de un gel (Burey et al., 2008).

El mecanismo de gelificación iónica ocurre por el entrecruzamiento de las cadenas del hidrocoloide con iones, donde en general se lleva a cabo una gelificación catiónica de polisacáridos cargados negativamente. Ejemplos de este tipo de gelificación son el alginato, la carragenina y la pectina. Por otro lado, en la gelificación en frío las redes del gel se forman a partir del enfriamiento de soluciones en donde previamente se realizó la disolución a temperaturas elevadas del hidrocoloide. Al enfriarse se forman las cadenas tipo hélice (por estabilización entálpica) a partir de segmentos de cadenas individuales resultando así la formación de la red tridimensional. Ejemplos de estos sistemas, son la gelatina y el agar. Finalmente, para la gelificación por calentamiento se requiere la aplicación de calor a las soluciones (metilcelulosa, almidón, goma de curdlán), y es consecuencia del desdoblamiento/expansión de estructuras nativas (e.g. almidón y proteínas) y su posterior redistribución en la red (Burey et al., 2008).

Los hidrogeles destinados para consumo humano deben ser elaborados a partir de polímeros naturales reconocidos como seguros (GRAS, Generally Recognized As Safe), como son el caso de las proteínas o los polisacáridos. Entre los polisacáridos GRAS se encuentran el alginato, la pectina, la gelatina, la carragenina, la gelana y el agar por mencionar algunos (Saha y Bhattacharya, 2010). La naturaleza del polisacárido utilizado para formar el hidrogel determina en gran parte sus atributos funcionales como estabilidad, propiedades de retención, liberación de sustancias bioactivas, texturales y/o mecánicas. Desde el punto de vista de su respuesta mecánica, los hidrogeles son materiales viscoelásticos, es decir, presentan propiedades tanto de líquidos como de sólidos.

Las propiedades moleculares y fisicoquímicas exhibidas por los hidrogeles de polisacáridos dependerán de su peso molecular, ramificaciones, flexibilidad, carga, polaridad y digestibilidad (Coviello *et al.*, 2007). Los hidrogeles tienen tendencia a deformarse y liberar grandes cantidades de agua bajo la influencia de esfuerzos de cortantes. Algunos métodos de entrecruzamiento han sido utilizados para mejorar la integridad de hidrogeles (Zanina y Budtova, 2002; Vervoort y Budtova, 2005), en donde cadenas de polímeros lineales pueden ser unidas por medio de enlaces covalentes a partir del uso de agentes entrecruzantes (Lee y Rowley, 2000; Peak *et al.*, 2013). Sin embargo, el entrecruzamiento químico tiene el inconveniente de dejar fracciones residuales tóxicas de los componentes químicos utilizados. Una alternativa a esto es la formación de hidrogeles entrecruzados físicamente, aunque este tipo de hidrogeles son frágiles, muestran poca integridad mecánica y una tasa alta de retrogradación (Adekogbe y Ghanem, 2005).

2.1.2 Polisacáridos como base para la formación de hidrogeles

Los dos tipos de biopolímeros más utilizados para la formación de hidrogeles (Harris, 1990) son:

- Polisacáridos: de forma general forman geles transparentes a bajas concentraciones de biopolímero. Dependiendo del polisacárido utilizado, el proceso de formación puede llevarse a cabo por calentamiento/enfriamiento, por ajuste de pH o por adición de iones.

- Proteínas: es necesario la utilización de concentraciones entre 5-10% y dan como resultados geles opacos. Mayormente la formación del gel se hace a través del calentamiento (desnaturalización), cambio en el pH o interacciones enzimáticas.

Con respecto a los polisacáridos, son polímeros naturales en gran abundancia en la naturaleza, y pueden obtenerse de plantas, animales y microorganismos. Debido a su gran disponibilidad, fácil procesamiento y alta biocompatibilidad se han empleado en diversas aplicaciones industriales. Los polisacáridos con alta afinidad por el agua y con capacidad de aumentar la viscosidad de una solución, aun en concentraciones bajas, son clasificados como gomas. Estas biomoléculas pueden encontrarse en diferentes plantas, algas o en la fermentación bacteriana. Entre los polisacáridos destaca la goma xantana (GX), que es un exo polisacárido microbiano que ha sido utilizado incluso en aplicaciones biomédicas precisamente debido a su excelente biocompatibilidad y propiedades gelificantes (Petri, 2015).

GX es un biopolímero comúnmente utilizados para la producción de hidrogeles en la industria farmacéutica y cosmética. La GX es un exo-polisacárido aniónico de alto peso molecular, producida por la fermentación aeróbica de azúcares por *Xanthomonas campestris*. La cadena principal tiene como base unidades de glucosa con cadenas laterales de trisacáridos. Esta cadena consiste en α -manosa que contiene un grupo acetilo, ácido β -D-glucorónico y una unidad terminal de β -D-manosa unida a un grupo piruvato. (Ver Anexos)

Sus propiedades características incluyen: alta solubilidad en agua fría, estabilidad física sobre un intervalo amplio de temperatura y pH, resistencia a la degradación enzimática, no tóxico, biocompatible, degradable y bajo costo (Farris, 2009). Más aun, no produce irritación ni sensibiliza la piel y desde 1969 fue aprobado su uso por la FDA (Food and Drug Administration).

La investigación sobre el uso de la GX en la formación de hidrogeles para medicamentos y liberación de principios activos es un tema de interés actual. No obstante, la GX no forma hidrogeles verdaderos independientemente de las condiciones de concentración y/o temperatura usada (Bresolin *et al.*, 1998). Sin embargo, existe la posibilidad de realizar la incorporación de una fase discontinua (partículas, gotas de aceite o de aire) a la matriz (gel o

dispersión viscosa) con el fin de mejorar sus propiedades mecánicas o sensoriales, o incluso lograr la formación de un gel verdadero.

En este sentido, la incorporación de compuestos inorgánicos en escala nano-micro es una alternativa para la obtención de hidrogeles nanocompositos inorgánicos-orgánicos (Liu *et al.*, 2008). Así pues, la Mt puede ser una alternativa para reforzar la estructura de hidrogeles obtenidos a partir de polímeros naturales o sintéticos, ya que se ha encontrado que puede mejorar las propiedades mecánicas de estos materiales (Liang *et al.*, 2000; Bignotti *et al.*, 1996).

2.1.3 Partículas como reforzantes estructurales

Diferentes tipos de biomateriales, cosméticos y farmacéuticos son geles macromoleculares con partículas dispersas (reellenos) que pueden incrementar su fuerza y rigidez. Entre los materiales inorgánicos utilizados se encuentran: la alúmina nanoporosa Al_2O_3 (Kwak *et al.*, 2010), fosfatos de calcio (Ginebra *et al.*, 2006), nanopartículas de óxido de titanio TiO_2 (McMaster *et al.*, 2012), nanotubos de carbono (Bianco *et al.*, 2005), partículas mesoporosas de dióxido de silicio SiO_2 (Anglin *et al.*, 2008), vidrio bioactivo y arcillas como la Mt.

Estas partículas atrapadas pueden clasificarse como reellenos activos o pasivos de acuerdo con la interacción que tengan con la red polimérica. Los reellenos activos son aquellos que interactúan fuertemente con la matriz del polímero e inducen la conectividad entre las fases continua y dispersa. Los reellenos pasivos se enlazan débilmente con la matriz polimérica, y generalmente esto resulta en la formación de geles con propiedades mecánicas reducidas (Chen y Dickinson, 1999). De forma ilustrativa, en la Figura 2 se presentan las diferencias entre las partículas que funcionan como relleno activo (a) y pasivo (b).

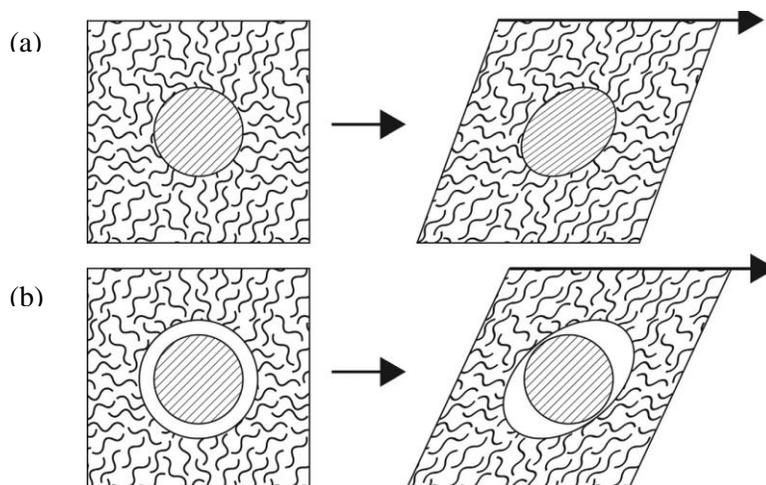


Figura 2 Comportamiento de un relleno activo (a) y uno pasivo (b). Chen y Dickinson (1999).

En el caso del uso de partículas reforzantes (rellenos activos), cabe señalar que las propiedades reológicas de los geles o hidrogeles pueden ser mejoradas al ajustar el tipo y las cantidades de cada componente (biopolímero-partículas) con el objetivo de aumentar las interacciones entre ellos. Esto, considerando que menos interacciones producen geles débiles mientras que con una mayor cantidad de interacciones se obtienen geles más rígidos y consolidados (Croisier y Jérôme, 2013).

En el campo de la salud, ciertas arcillas minerales son utilizadas en la tecnología farmacéutica y en la dermofarmacia como excipientes y como sustancias con actividad biológica aceptable en el diseño de materiales sólidos (pastillas, cápsulas o polvos), líquidos (suspensiones, emulsiones) o semisólidos (cremas, ungüentos) y que pueden ser utilizados por vía oral o tópica (Viseras *et al.*, 2007; Carretero, 2002; Elmore, 2003). Su uso se basa en sus propiedades como abrasivos, absorbentes, adsorbentes, antiaglutinantes, estabilizadores de emulsiones, entre otras.

Particularmente, la Mt es una arcilla mineral perteneciente al grupo de las esmectitas cuya forma característica es laminar, ver estructura en Anexos. Esta forma laminar (tipo 2:1) está compuesta por una lámina octaédrica de alúmina entre dos láminas tetraédricas de sílice. El tamaño de las partículas tiene un diámetro promedio de $1.0 \mu\text{m}$ con un grosor de 9.6 nm , además poseen una alta área específica superficial (entre los 700 y $800 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ en dispersión perfecta), alta densidad de carga superficial (entre -0.15 y 0.1 cm^{-2}) y carga superficial

heterogénea (Tournassat *et al.*, 2011). Debido a la presencia de cationes de sodio entre los espacios de las capas de aluminosilicato, es hidrofílica y miscible con polímeros también hidrofílicos (Park *et al.*, 2003).

2.1.4 Trabajos previos de la incorporación de Mt en hidrogeles

Las partículas de Mt han sido utilizadas en composites de almidón con el fin de mejorar sus propiedades mecánicas (Kampeerapappun *et al.*, 2007). Asimismo, estas partículas también mejoran la humectabilidad y las propiedades de adsorción, en donde el orden de adición de Mt y del plastificante tienen un efecto significativo en las propiedades de las biopelículas resultantes (Romero-Bastida *et al.*, 2015). Sin embargo, los hidrogeles a base de almidón necesitan concentraciones más altas de partículas entre el 10-15 % p/p. Lo que sugiere que los mecanismos físicos y químicos involucrados en la consolidación, dependen de la naturaleza del biopolímero.

Por otro lado, se ha reportado la aplicación composites de quitosano-Mt tanto en la parte biomédica como en la remoción de metales (Pereira *et al.* 2013), en donde las partículas de Mt mejoraron la estabilidad mecánica del hidrogel al utilizarse en combinación con agentes entrelazantes (e.g. penta tripolifosfato de sodio).

A partir de los resultados de trabajos previos se puede concluir que los mecanismos involucrados en la estabilización de hidrogeles a partir de la adición de partículas de Mt aún no se encuentran definidos. A pesar de que varios trabajos consideran a las partículas de Mt como rellenos pasivos, con base en algunos resultados (e.g. FTIR) se puede considerar que la naturaleza ácida de esta arcilla juega un papel importante en la estabilidad de hidrogeles.

2.1.5 Métodos de caracterización de hidrogeles

El estudio de los geles, en este caso hidrogeles, puede involucrar la caracterización estructural, molecular, microscópica y reológica para lo que es necesario el uso de diferentes equipos. Entre estas caracterizaciones, la reológica es de suma importancia ya que se relaciona con los atributos texturales del producto, lo que determina sus características sensoriales y su aceptación por el consumidor.

Resulta interesante explorar si la adición de partículas, en este caso de la Mt, a un gel débil (o no verdadero) como lo es la GX, puede contribuir a la formación de hidrogeles con propiedades mejoradas. Razón por la cual, entre las perspectivas de este trabajo se encuentra evaluar por un lado si la incorporación de partículas de Mt a dispersiones de GX inducen a la formación de un gel, y por otro estudiar los efectos de las diferentes concentraciones de Mt en la respuesta reológica (esfuerzos de corte, temperatura, etc.) de los hidrogeles. Para ello se requiere hacer uso de diferentes técnicas de caracterización de materiales como lo son: difracción de Rayos X, espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier, microscopía óptica y de transmisión electrónica, entre otras. En esta sección se mencionan algunas de las características de cada una de ellas.

En términos reológicos, tanto las dispersiones viscosas como los geles son materiales viscoelásticos, por lo que presentan simultáneamente las propiedades elásticas de un sólido ideal, y las características de flujo de un líquido ideal. Parámetros como la viscosidad aparente, esfuerzo de corte, módulo de elasticidad, módulo viscoso, viscosidad compleja, entre otros, son utilizados para la descripción del comportamiento reológico de estos materiales. En las pruebas oscilatorias los parámetros de interés en general son: módulo elástico (G') es una medida del almacenamiento de energía elástica; el módulo viscoso (G'') es una medida de la energía disipada o la respuesta viscosa; la tangente del ángulo de fase ($\tan\delta$) es la relación G''/G' y da una medida del desfase entre ellos.

Las características más distintivas de los geles débiles son mejor apreciados en la región viscoelástica lineal (RVL). En la RVL se puede lograr apreciar con mayor facilidad la distinción entre un gel fuerte y uno débil con base a su espectro mecánico. Los geles fuertes generalmente muestran una G' mucho mayor que G'' (más de una orden de magnitud, $\tan\delta < 1$, con un valor ~ 0.1), y el valor de ambos parámetros es independiente de la frecuencia (ω) sobre un amplio intervalo de frecuencias. El comportamiento de los geles débiles se encuentra intermedio entre el comportamiento de redes enmarañadas de soluciones poliméricas y el de geles verdaderos. Tanto G' como G'' muestran una ligera dependencia con la frecuencia, sin mostrar una meseta Newtoniana en el rango de bajas frecuencias. En muchos casos los perfiles de G' y G'' son casi paralelos, con G' excediendo a G'' , pero en un grado mucho menor que para el caso de geles fuertes ($0.1 < \tan\delta < 1$) (Lapasin, 2000).

Otra prueba importante es la prueba de Creep (fluencia), en donde un esfuerzo constante es aplicado y la deformación (γ) es registrada como función del tiempo.

La dispersión de rayos X de bajos ángulos o SAXS (Small Angle X-ray Scattering) es una técnica basada en analizar la dispersión de rayos X producida por un material al paso del haz, a ángulos muy próximos a cero. El análisis fractal ha sido empleado para este propósito, en donde la dimensión fractal cuantifica la desviación de una estructura regular de una dimensión integral tradicional. Por otro lado, la lagunaridad proporciona información acerca de la heterogeneidad de espacios en estructuras fractales (Lobato-Calleros *et al.*, 2009; Fayad *et al.*, 2013) lo que permite discriminar objetos con una misma dimensión fractal pero que pudieran tener apariencias completamente distintas.

Otra técnica utilizada en la caracterización de materiales es la espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) la cual es una técnica basada en las vibraciones de los átomos de una molécula. Un espectro infrarrojo es obtenido pasando radiación infrarroja a través de la muestra (sólida o líquida) para determinar que fracción de la radiación incidente es absorbida a un determinado nivel de energía. En un espectro de absorción, la energía a la cual aparece cada pico corresponde a la frecuencia de una vibración de una parte de la molécula (enlaces). Como se mencionó, en ocasiones se busca reforzar o rellenar un hidrogel con una emulsión o partículas sólidas, y los espectros de FTIR permiten establecer si se forman enlaces entre diferentes polisacáridos o polisacáridos-sólidos para determinar si interactúan de forma activa o pasiva.

2.2 Emulgeles

2.2.1 Características de los emulgeles

Los emulgeles generalmente se obtienen dispersando uniformemente una fase oleosa (que puede contener un bioactivo lipofílico) o una emulsión en la matriz polimérica, induciendo su gelación por algún mecanismo dado, generalmente con el fin de utilizarlos en aplicaciones de liberación controlada (Chen *et al.*, 2007; Dickinson, 2012; Saigiri *et al.*, 2014). Existen trabajos recientes sobre la formación de emulgeles (McClements, 2010; Mun *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015) se ha reportado que la protección y liberación de componentes como el β -caroteno es mayor que aquel encontrado con emulsiones convencionales. De igual forma, la oxidación de lípidos insaturados atrapados en un hidrogel de proteínas ha sido retardada (Matalanis *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014).

Uno de los parámetros más importantes en los emulgeles, al igual que en las emulsiones convencionales, es la estabilidad ya que solo ésta puede garantizar la calidad y la aplicación del material. Por estabilidad se entiende que las gotas de la emulsión dispersas en el gel mantengan su tamaño promedio y distribución de tamaño de gota sin cambios o con cambios mínimos por un periodo de tiempo preestablecido. Una manera de promover la estabilidad contra factores agregativos de las gotas de una emulsión de aceite en agua, es incrementando la viscosidad de la fase continua o mediante la adsorción de una membrana protectora alrededor de los glóbulos de aceite (Leal-Calderon *et al.*, 2007). Algunos hidrocoloides pueden cumplir con una u otra de estas funciones y en ocasiones con ambas, por lo que constituyen una opción atractiva para lograr este fin. Las partículas sólidas también son estabilizadores interfasiales eficientes, cuya acción es el de formar una monocapa de partículas (micro o nano partículas) alrededor de los glóbulos de aceite, previniendo o retardando que los glóbulos se floculen y coalescan (Veverka *et al.* 2018).

Aunado a esto, las partículas de arcilla pueden ser añadidas a una emulsión para modificar y controlar su viscosidad (Viseras *et al.*, 2007), ya que como se sabe, las características reológicas (dependientes del tiempo) son importantes en productos alimenticios, cosméticos, pinturas e incluso concretos (Barnes, 1997; Mewis y Wagner, 2009).

Las propiedades reológicas de los emulgeles dependen de las propiedades fisicoquímicas de la matriz del hidrogel y de las características de las gotas de la fase oleosa, como lo son la fracción volumétrica, el tamaño y distribución espacial de las gotas, y de la fuerza de interacción entre éstas y la matriz. Dependiendo de la naturaleza de estas interacciones, las gotas pueden ser clasificadas como rellenos activos o pasivos del hidrogel. Los rellenos activos están conectados mecánicamente a la red del hidrogel, v.gr., las membranas interfaciales adsorbidas alrededor de las gotas de aceite interactúan con la red entrelazada del hidrogel, esta interacción puede resultar en un aumento de los módulos G' y G'' . En el caso de los rellenos pasivos, estos tienen poca afinidad química o física con la red del hidrogel y por lo general, provocan una disminución en ambos módulos G' y G'' (van Vliet, 1988).

2.2.2 Métodos de caracterización de emulgeles

Se ha encontrado que los polisacáridos naturales constituyen una fuente ideal para el desarrollo de nuevos materiales funcionales. Sin embargo, el uso de homopolímeros (macromoléculas formadas por la repetición de unidades monómeras idénticas) en ocasiones resulta en materiales con propiedades por debajo de las expectativas esperadas. Así pues, la mezcla de polímeros es uno de los métodos más efectivos para suministrar nuevos materiales poliméricos con propiedades deseadas para aplicaciones prácticas. La mayoría de los hidrocoloides naturales (polisacáridos y proteínas) son polielectrolitos, es decir, macromoléculas que poseen un gran número de grupos funcionales que se ionizan en medio acuoso. El grado de ionización está en función de la estructura del polímero, del solvente, del pH, de la fuerza iónica del medio (Pasika, 1977), entre otros. La formación de la red reticulada de hidrogeles entre homopolímeros o heteropolímeros dependerá en gran medida del signo y de la carga que tengan en disolución, v.gr., interacciones entrelazantes-polímero y polímero-polímero. Por otro lado, las condiciones fisicoquímicas del medio afectarán la distribución espacial de las moléculas funcionales en la matriz y las propiedades superficiales de las matrices, tales como su carga eléctrica y ángulo de contacto con el agua (Koyano et al., 2000). El signo y la magnitud en las superficies de las gotas de una emulsión dependerán en gran medida del agente emulsificante empleado para estabilizarlas. Esto es de suma importancia porque afectará la repulsión electrostática entre las gotas, causado por la sobreposición de la doble capa eléctrica del mismo signo, y tendrá una repercusión en la tasa

de agregación de las gotas de la emulsión. Además, afectará el grado de interacción que puedan tener las membranas adsorbidas alrededor de las gotas con otros componentes, v. gr., con la matriz del hidrogel (McClements, 2005).

La microscopía óptica es una técnica que permite estudiar la microestructura de materiales en relación con sus propiedades físicas y monitorear cambios debidos a factores ambientales externos. Sin embargo, varias técnicas tradicionales en la preparación de las muestras involucran altos esfuerzos cortantes y compresivos que pueden destruir o dañar elementos estructurales, complicando y dificultando el análisis de las imágenes.

La microscopía confocal de barrido de laser puede examinar cambios *in situ* en la microestructura sin perturbar la muestra y permite el darle seguimiento a la dinámica de la estructuración de geles en los puntos de conjunción o en la estructuración de interfaces en emulgeles, pudiéndose estudiar el efecto de diversas condiciones sub-fase (pH, fuerza iónica, temperatura) y la cinética de adsorción o conjunción de biopolímeros y nanopartículas puede monitorearse en tiempo real (Rincón-Cardona *et al.*, 2013). Además, las imágenes microscópicas se pueden transformar en parámetros objetivos y cuantitativos que pueden ser manipulados matemáticamente y estadísticamente, permitiendo evaluar cambios en la agregación y estructuración de las especies moleculares acomplejándose o adsorbiéndose en las interfases.

Cuando material viscoelástico es sujeto a un esfuerzo mayor del que resiste su límite elástico, el material fluye. Cuando los valores del esfuerzo cortante o la viscosidad se grafican contra la tasa de corte, se pueden observar varios tipos de flujo. La mayoría de estos materiales muestran un comportamiento viscoso de fluidos no-newtonianos, que puede ilustrarse por curvas etiquetadas como de fluidos “estructurales”. Estos fluidos exhiben comportamiento Newtoniano a muy bajas y muy altas tasas de corte, con un comportamiento reoadelgazante o pseudoplástico a tasas de corte intermedias. En algunos materiales esto puede atribuirse a una estructura reversible o red que se forma en el “reposo” o estado de equilibrio.

3. Justificación

Existen pocos estudios acerca del efecto de la incorporación de partículas inorgánicas como reforzantes de la matriz polimérica de hidrogeles. Más aun, prácticamente no hay reportes acerca de si estos hidrogeles reforzados pueden utilizarse para formar emulgeles estables con la posibilidad de ser destinados a la entrega de bioactivos lipofílicos. En este trabajo se buscó abordar estos temas para establecer los mecanismos de interacción partícula-matriz -gota, y como se pueden modular las distintas interacciones para proporcionar sistemas con propiedades funcionales mejoradas (estabilidad, propiedades fisicoquímicas, propiedades reológicas mecánicas y de su microestructura).

4. Hipótesis

La adición de partículas inorgánicas a hidrogeles mejora las propiedades estructurales de la matriz polimérica, y en consecuencia contribuye a la estabilización de las gotas dispersas de aceite esencial de manzanilla, resultando en un emulgel con estabilidad y propiedades funcionales aumentadas.

5. Objetivos

5.1 General

Obtener hidrogeles reforzados a partir de la adición de partículas inorgánicas para la formación de emulgeles estables o/w con propiedades funcionales mejoradas.

5.2 Particulares

- Formular y estudiar hidrogeles de goma de xantana reforzados con montmorillonita, considerando el efecto de su concentración en la morfología y propiedades reológicas de los hidrogeles.
- Formular y caracterizar emulgeles para la evaluación del efecto de la concentración de montmorillonita en el tamaño y distribución de gota, y en sus propiedades reológicas.

6. Materiales y métodos

6.1 Materiales

Para la preparación de los hidrogeles reforzados y la posterior estabilización de los emulgeles, se utilizaron los siguientes reactivos y equipos:

- Goma Xantana (No. G1253, de *Xanthomonas campestris*) - Sigma-Aldrich, México.
- Montmorillonita K10 (No. 281522) área superficial 220-270 m²/g) - Sigma-Aldrich,
- Aceite de manzanilla (Farmacias Paris).
- Agua desionizada.
- Sigma Ultrasonic Processor, GEX60, CO.
- Ultra-Turrax T50 basic, Ika Werke
- Microscopio óptico (Olympus BX45, Olympus Optical Co.) con cámara AxioCamERc5s (Carl Zeiss
- JEOL JEM-2100 (Japón) para microscopía electrónica de transmisión (TEM).
- Reómetro Kinexus pro+ (Malvern Instruments).
- Mastersizer 2000 (Malvern Instruments)
- Spectrum 100, Perkin Elmer (Waltham, MA) para espectroscopía FTIR
- Cámara Kratky (Rigaku Ltd., Japón) acoplada a un tubo de cobre para la dispersión de rayos X a bajo ángulo.
- Analizador de dispersión LUMiSizer (LUM GmbH, AL)

6.2 Metodología

La parte experimental del presente trabajo se realizó en dos fases mostradas en la Figura 3. La primera fase y parte medular del presente trabajo consistió en la formulación y caracterización de hidrogeles a base de GX adicionados con diferentes concentraciones (0-4% p/p) de partículas Mt. Posterior a esta fase, se obtuvieron los emulgeles a partir de la emulsificación de una concentración fija de aceite de manzanilla (25% p/p) en los hidrogeles previamente caracterizados.

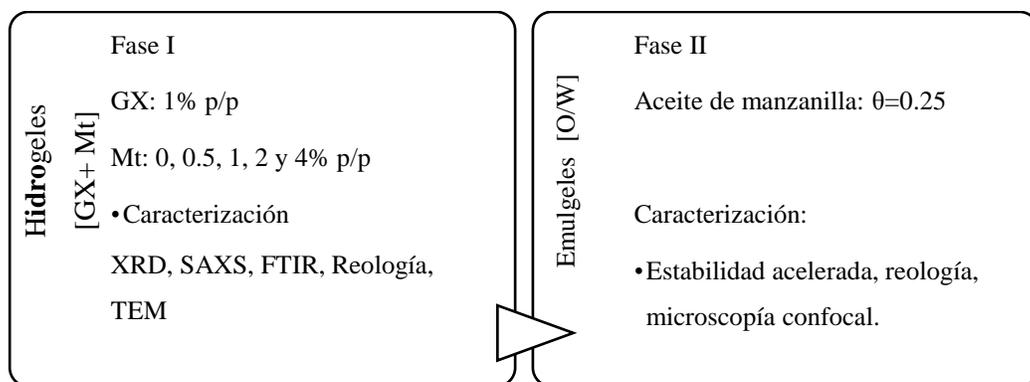


Figura 3. Fases metodológicas para la elaboración y caracterización de hidrogeles y emulgeles.

6.2.1 Elaboración de los hidrogeles, Fase I

De forma separada se realizaron dispersiones en agua desionizada de GX al 2% p/p y de partículas de Mt al 0, 1.0, 2.0, 4.0 y 8.0 %p/p. Se mantuvieron en agitación constante por 12 horas a temperatura ambiente para garantizar la completa dispersión de los polvos. A continuación, las dispersiones de GX y Mt fueron mezcladas en una relación volumétrica 1:1 con agitación constante por 15 min. Para evitar la presencia de aglomerados de MT, las dispersiones fueron sometidas a sonicación (Sigma Ultrasonic Processor, GEX60) a 48 W, 24 kHz, con una punta de cabeza plana durante 2 min. Finalmente, las dispersiones se dejaron en reposo por 2 h para el proceso de formación de los hidrogeles. Todos los hidrogeles tuvieron una concentración final de GX de 1.0% p/p y en el caso de la Mt de 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 % p/p y fueron codificados como H_x, donde el subíndice “x” representa la concentración de Mt adicionada. Adicionalmente, para algunos análisis fue necesario secar las muestras a 45°C por 48 h (Bueno *et al.*, 2013).

6.2.2 Obtención de los emulgeles, Fase II

Tal como se muestra en la Figura 4, después de la obtención y caracterización de los hidrogeles se prosiguió con la formación de los emulgeles. Para esto se incorporó aceite esencial de manzanilla (25% p/p) a cada uno de ellos utilizando un homogenizador Ultra-Turrax T50 basic, Ika Werke, con un baño de hielo (para evitar el sobrecalentamiento por fricción) a 10 000 rpm durante 10 min. Los emulgeles resultantes fueron codificados como

E_x , donde el subíndice “x” representa la concentración de Mt adicionada inicialmente. Todos los emulgeles tuvieron una fracción másica de fase dispersa $\theta = 0.25$. Tanto los hidrogeles como los emulgeles se dejaron en refrigeración por 24 h a 5°C antes de su uso para las caracterizaciones.

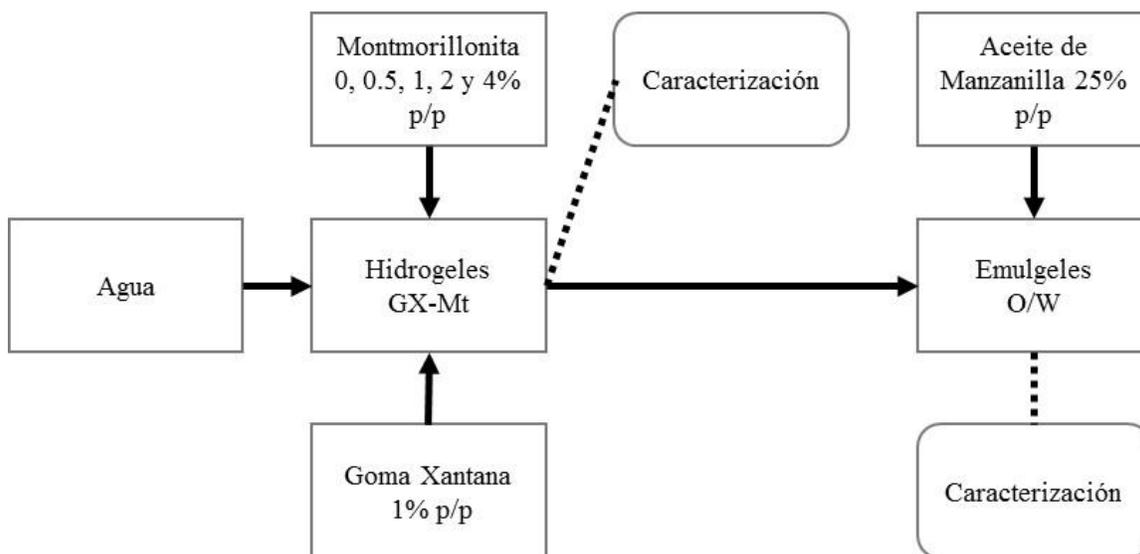


Figura 4. Diagrama del proceso de elaboración de hidrogeles y emulgeles

6.2.3 Análisis de la microestructura

La morfología y posible agregación de los hidrogeles fue caracterizada por medio de la microscopía electrónica de transmisión (TEM) con el uso de un equipo JEOL JEM-2100 (Tokio, Japón) a un voltaje de 200 kV. Las muestras para este análisis fueron fragmentadas con un ultra-microtomo (RMC, modelo MTXL, Boeckeler Instruments, Tucson, AZ) en placas de 80 nm de grosor.

Por otro lado, la microestructura de los emulgeles se determinó por medio de microscopía de luz utilizando un microscopio óptico (Olympus BX45, Olympus Optical Co.) acoplado a un sistema de análisis de imágenes (cámara AxioCamERc5s y software Zen Carl Zeiss). También se observaron estas muestras por microscopía láser confocal (Carl Zeiss LSM 780, objetivos de 20 y 40x, con una excitación y emisión de 488 y 505 nm respectivamente).

6.2.4 Difracción de Rayos X

Los difractogramas correspondientes a cada muestra de hidrogeles (en seco) se obtuvieron por medio de un Difractor de Rayos X 5000 Siemens (Karlsruhe, Alemania) utilizando radiación Cu K α ($k=1.543$) y un monocromador secundario de grafito a 40 kV y 30 mA. Los valores de las intensidades fueron medidos en el rango de 5-50° con un tamaño de paso de 0.03° y un tiempo de medición de 2.0 segundos por punto.

6.2.5 Dispersión de Rayos X de bajo ángulo (SAXS)

Para el análisis de los hidrogeles en su forma líquida, se hizo uso de una cámara Kratky (Rigaku Ltd., Japón) acoplada a un tubo de cobre utilizado como ánodo. La distancia entre la muestra y contador proporcional fue de 25 cm, un filtro de níquel para el paso de la radiación K α . La intensidad $I(h)$ fue medida por 9 min para la obtención de datos confiables. Una pequeña película de cada hidrogel fue colocada frente al haz de rayos X el cual fue dispersado en la geometría de transmisión. Los datos fueron procesados mediante el programa ITP (Glatter y Gruber, 1993), donde el parámetro angular h es definido como:

$$h = 4\pi\sin(\theta)/\lambda$$

en donde 2θ y λ son el ángulo de dispersión y la longitud de onda respectivamente. La aproximación infinita de la altura de la rendija fue utilizada para el análisis de datos. Para este trabajo, el background obtenido con la gráfica de Porod fue sustraído de la intensidad experimental. La dimensión fractal fue estimada a partir de la pendiente de $\log(I(h))$ contra $\log(h)$. La forma globular, fibrosa o laminar de los objetos dispersados puede ser estimada de la gráfica de Kratky $h^2I(h)$ contra h (Kataoka *et al.*, 1994).

6.2.6 Espectroscopia FTIR

La caracterización de los hidrogeles por espectroscopia ATR-FTIR (vía seca), fue realizada a través de un espectrofotómetro Spectrum 100, Perkin Elmer (Waltham, EUA) equipado con un accesorio universal para muestras de diamante, ATR. Para cada muestra se tomó el promedio de 3 barridos a una resolución de 1 cm⁻¹, en un intervalo de número de onda de 4000 a 200 cm⁻¹ para después poder seleccionar la región de análisis dependiendo de los

picos característicos que se obtengan. El espectrograma de la celda vacía (aire) fue tomado como referencia (background). El factor de resolución fue fijado a 1.5. La línea base de todos los espectrogramas fue corregida.

6.2.7 Comportamiento reológico

La caracterización reológica tanto de hidrogeles como de emulgeles, se llevó a cabo mediante el uso de un Reómetro Kinexus pro+ (Malvern Instruments), equipado con una geometría cono-plato de 50 mm de diámetro y un ángulo de cono de 2°. La separación entre la geometría fue de 0.07 mm. Las curvas de flujo se obtuvieron variando la velocidad de corte de 0.001 a 1000 1/s y viceversa (para formar un ciclo), obteniendo como respuesta los valores de la viscosidad aparente.

Para las pruebas oscilatorias se hizo un barrido de deformación de 0.1 al 1000% a una frecuencia constante de 1 Hz a temperatura constante teniendo como respuesta el módulo elástico (G') y el viscoso (G''). Estas pruebas se efectuaron a 25 °C. Adicionalmente con el objetivo de determinar la variación de los módulos elástico y viscoso (G' y G'') con respecto a la temperatura, se realizaron barridos de temperatura en un intervalo de 25 a 90 °C, manteniendo una frecuencia y amplitud constante de 1 Hz y 1% respectivamente, con 5 puntos por década.

De igual forma se midió la fluencia-relajación mediante pruebas de Creep-compliance, para lo que fue necesario aplicar un esfuerzo cortante constante de 4.0 MPa para después ser retirado y medir la recuperación de los hidrogeles. El manejo de los datos se realizó a través del programa rSpace (Malvern Instruments Ltd).

6.2.8 Tamaño de gota

La distribución del tamaño de gotas de aceite en los emulgeles fue determinado con un analizador de tamaño de gota Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Ltd). Se tomó en cuenta el índice de refracción de cada muestra (obtenida con un refractómetro Abbe) y de la fase continua (agua $n_D=1.333$). Se añadió al dispersador la cantidad necesaria de cada emulgel hasta lograr un porcentaje de oscuración entre el 10 y 20% para poder realizar la medición. Se obtuvo el diámetro promedio ponderado del volumen $D_{(4,3)}$, el cual fue

monitoreado en el tiempo para poder determinar la estabilidad de las gotas contra la coalescencia o agregación de gotas.

6.2.9 Estabilidad acelerada

Con el objetivo estudiar el efecto de la concentración de Mt sobre la estabilidad de los emulgeles, se hizo uso de un analizador de Dispersión LUMiSizer (LUM, GmbH, Alemania) en donde se fijó la velocidad de rotación a 2 400g durante 2 h. Bajo estas condiciones, los emulgeles con poca estabilidad tienden a separarse por lo que el equipo permite medir de forma simultánea la intensidad de la luz transmitida en función del tiempo y la posición de las fases a lo largo de todo el tubo. La velocidad de sedimentación y la altura final de la fase precipitada (en caso de haber separación) se obtuvieron con el software del equipo SEPView 5.1 (LUM, GmbH).

7. Resultados y Discusión

A continuación se muestran los resultados de las caracterizaciones tanto de los hidrogeles como de los emulgeles. Como se mostró en la Figura 3, la primera fase está enfocada en los hidrogeles y la segunda específicamente en los emulgeles obtenidos.

7.1 Caracterización de los hidrogeles reforzados, Fase I

La Figura 5 muestra las imágenes de los tubos con el hidrogel de XG (H_0) y los hidrogeles compuestos ($H_{0.5}$ - H_4) en posición inversa. Se puede observar que la dispersión de GX al 1% p/p (H_0) fluye a consecuencia de la fuerza de gravedad, lo cual indica que no tiene la capacidad de soportar su propio peso. Se encuentra reportado que la XG no forma geles verdaderos por sí sola (Iijima *et al.*, 2007), y la adición de una cantidad relativamente baja de partículas de MT (0.5 %p /p) a la dispersión de GX ($H_{0.5}$) no le proporcionó la capacidad de sostener su propio peso. Sin embargo, la incorporación de concentraciones mayores de MT (1, 2 y 4% p/p) a la dispersión da como resultado la formación de hidrogeles (H_1 , H_2 y H_4) con la capacidad de sostenerse bajo la influencia de la fuerza de gravedad. Adicionalmente, cabe mencionar que los hidrogeles no presentaron sinéresis durante un lapso de observación de 30 días. Estos resultados indican que la adición de partículas de Mt por arriba del 1% p/p contribuye a la consolidación de la estructura de la GX, cambiando así su comportamiento de una dispersión altamente viscosa a una estructura de hidrogel consolidada.

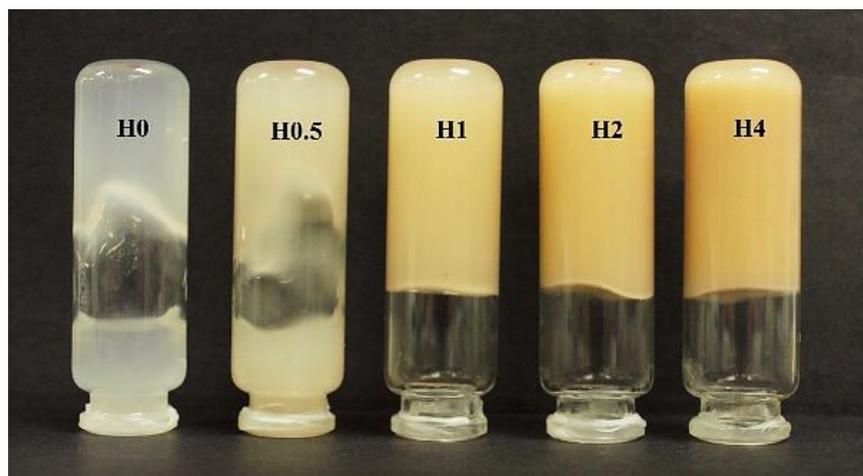


Figura 5. Fotografía de los hidrogeles GX-Mt en posición invertida

Desde esta perspectiva, se presenta una situación interesante de estudio para clarificar los mecanismos envueltos en la consolidación de las dispersiones de GX por la presencia de partículas de Mt. En pruebas similares, a los hidrogeles se añadió diferentes concentraciones de sílice (0-4% p/p) mismas que las de Mt, donde se encontró que estas partículas sólo actúan como rellenos pasivos, contrariamente a lo que se obtuvo con el uso de partículas de Mt donde éstas presentan las características de rellenos activos (discusión en sección 7.1.5). Para el desarrollo de una explicación de las interacciones entre XG-Mt, se puede tomar en cuenta que las partículas de Mt presentan acidez tipo Brønsted y Lewis, con una función de acidez Hammett de -6 a -8 (Brown, 1997). Esto significa que las partículas de Mt son una fuente de protones cuando al ser colocadas en la dispersión de GX, en donde se ven envueltas la deshidratación y la formación de enlaces tipo éster en las cadenas de GX.

Por otro lado, las partículas de Mt poseen un área superficial grande con cationes presentes en la superficie, los cuales tienen la capacidad de acomplejar compuestos polares (Wei et al, 2006). Bueno *et al.* (2013) reportaron que la presencia de ácido cítrico propiciaba que las dispersiones de GX se volvieran más rígidas y estables, esto debido al efecto del entrecruzamiento de las cadenas de la goma con grupos piruvatos, acetil y OH. Lo anteriormente mencionado sugiere que las partículas de Mt pueden actuar como donadoras de protones, con lo que se produciría un entrecruzamiento entre las moléculas de GX y las partículas superficiales de la Mt, en la Figura 6 muestra un esquema del entrecruzamiento.

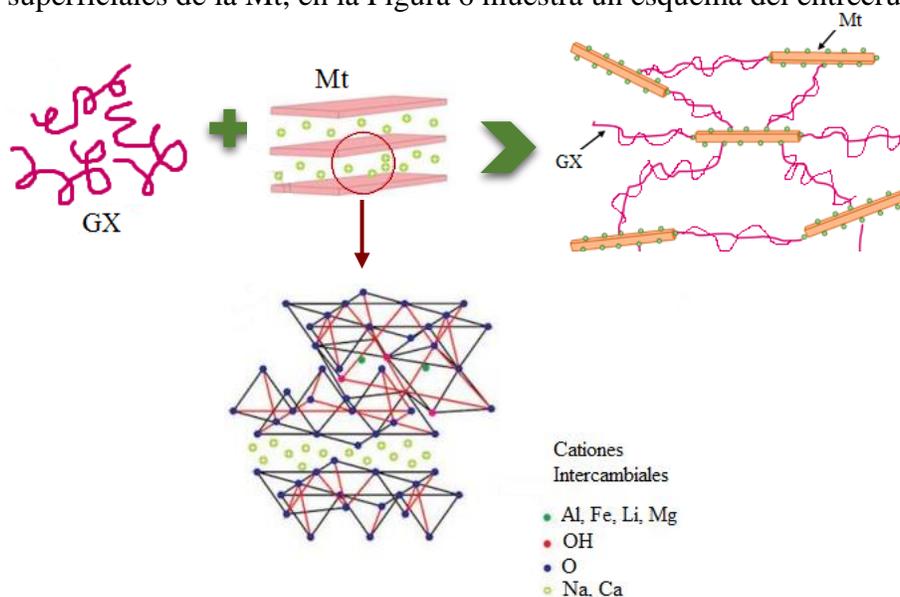


Figura 6. Propuesta del entrecruzamiento de la GX con las partículas de Mt.

Adicionalmente, el efecto de entrecruzamiento provoca que las dispersiones de GX obtengan una consolidación estructural como un gel, lo que se ve reflejado en la capacidad de soportar su propio peso como es el caso de los hidrogeles H₁, H₂ y H₄ (Figura 5). Por esta razón, las partículas de Mt podrían ser consideradas como agentes entrecruzadores heterogéneos, mayormente a través de puentes de hidrógeno que se presentan entre los grupos funcionales de la GX y la superficie de las partículas de Mt.

Después de que las cadenas de GX y la Mt alcanzan el equilibrio iónico, las partículas actúan como una zona de unión (posiblemente involucrando interacciones electrostáticas) lo que le confiere a la red polimérica del hidrogel mayor estabilidad. Dicho de otro modo, después del proceso de entrecruzamiento, las moléculas de GX y las partículas de Mt forman zonas de unión que permiten la formación de una microestructura reticulada y una capacidad alta de enlazar agua, características propias de un gel (Wei *et al.*, 2006). Este fenómeno está representado en la Figura 6 en donde se puede observar la formación de la red polimérica del hidrogel.

7.1.1 Difracción de Rayos X, DRX

La difracción de Rayos X se llevó a cabo con el objetivo de poder estudiar las interacciones de GX-Mt. La Figura 7(a) presenta el patrón de difracción de la Mt, el cual muestra un pico intenso en $2\theta=5.93^\circ$ correspondiente a espacio basal de $\sim 10 \text{ \AA}$. Por otro lado, en la Figura 7(b) se presentan los difractogramas de los hidrogeles XG-Mt, se puede observar que este pico no se encuentra presente ni en la muestra correspondiente a H_{0.5} ni en H₁, lo cual sugiere que las partículas de Mt se pueden encontrar exfoliadas (separadas) y dispersas de forma homogénea dentro de la estructura de la GX. Se ha reportado previamente que la incorporación de concentraciones bajas de Mt en agua induce la dispersión en forma de láminas individuales de las partículas (Ramsay y Lindner, 1993). Los patrones de difracción de H₂ y H₄ presentan un pico en el mismo valor de 2θ . Branca *et al.* (2015) estudiaron hidrogeles de goma guar-Mt obteniendo difractogramas similares, en donde las cadenas poliméricas y las partículas de Mt no se encontraban intercaladas. Esto corresponde con los resultados que sostienen que los polisacáridos con estructuras helicoidales (como es el caso de la GX) pueden ser adsorbidos en la parte externa de la Mt (Darder *et al.*, 2003).

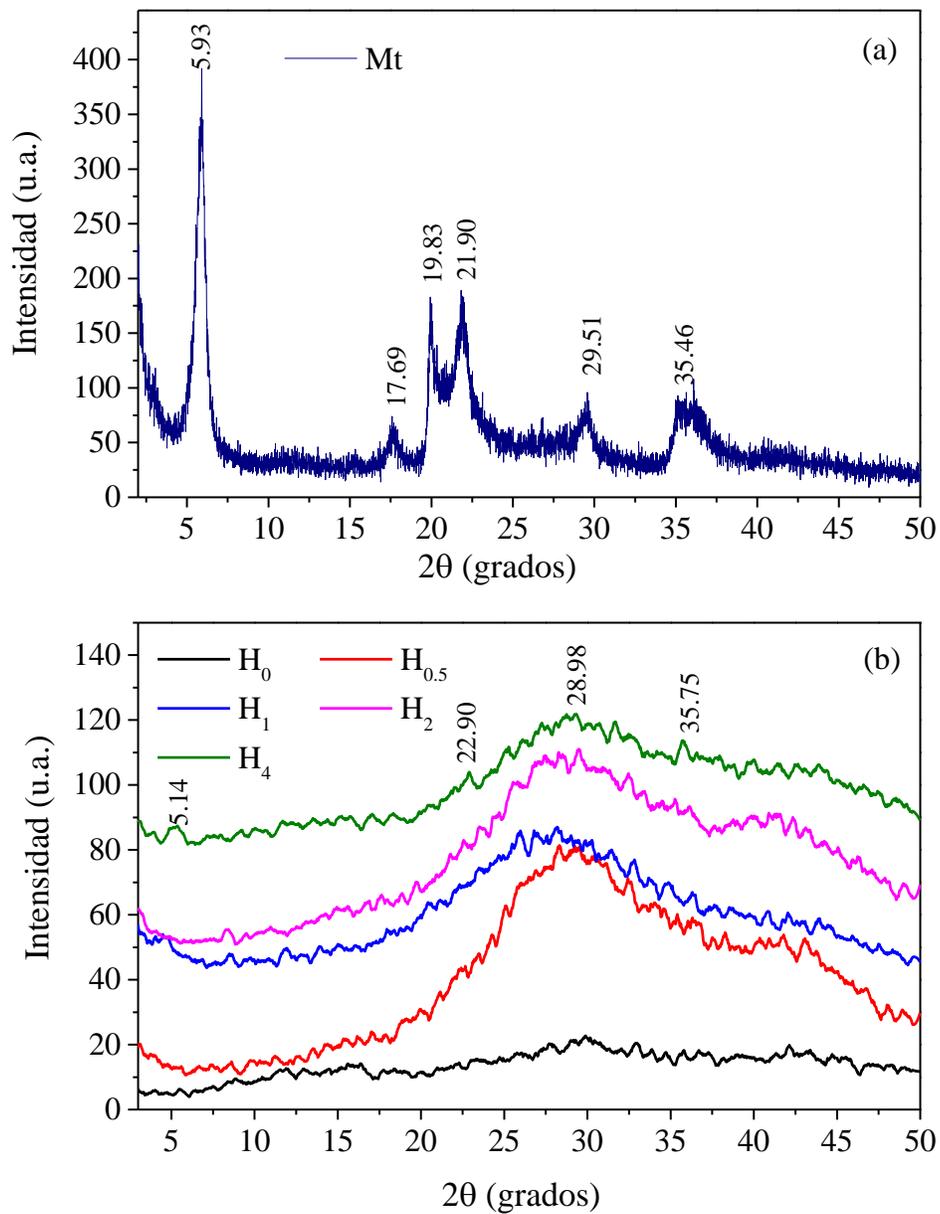


Figura 7. (a) Difractograma de Mt, (b) difractograma de los hidrogeles GX-Mt.

7.1.2 Microscopía de Transmisión Electrónica

Para poder esclarecer lo propuesto en la sección anterior, se obtuvieron micrografías TEM de los hidrogeles con Mt, puesto que lo que se buscó fue dar seguimiento a la estructura de la Mt. En la Figura 8(a) se presenta la micrografía TEM del hidrogel H_{0.5} en donde se puede observar que la Mt se encuentra dispersa y exfoliada, correspondiendo con lo propuesto en los resultados de rayos X. La exfoliación de la Mt también puede ser observada en la

micrografía de H_1 , al igual que algunos agregados de partículas (Figura 8 (b)). Estos agregados de Mt pueden ser observados a concentraciones más altas como es el caso de H_2 y H_4 , en la Figura 8 (c,d) respectivamente. En este sentido, a partir de los resultados de Branca *et al.* (2015) y lo mostrado en las Figuras Figura 7 y Figura 8, se puede plantear que a concentraciones por debajo del 1.0% las capas de Mt se encuentran total y uniformemente dispersas y exfoliadas dentro de la matriz polimérica de la GX. En contraste, a concentraciones mayores de Mt, estas partículas se encuentran en forma de tactoides compuestos, es decir como pequeños racimos de placas de Mt (Segad *et al.*, 2012; Ali & Bandyopadhyay, 2015; Block *et al.*, 2015).

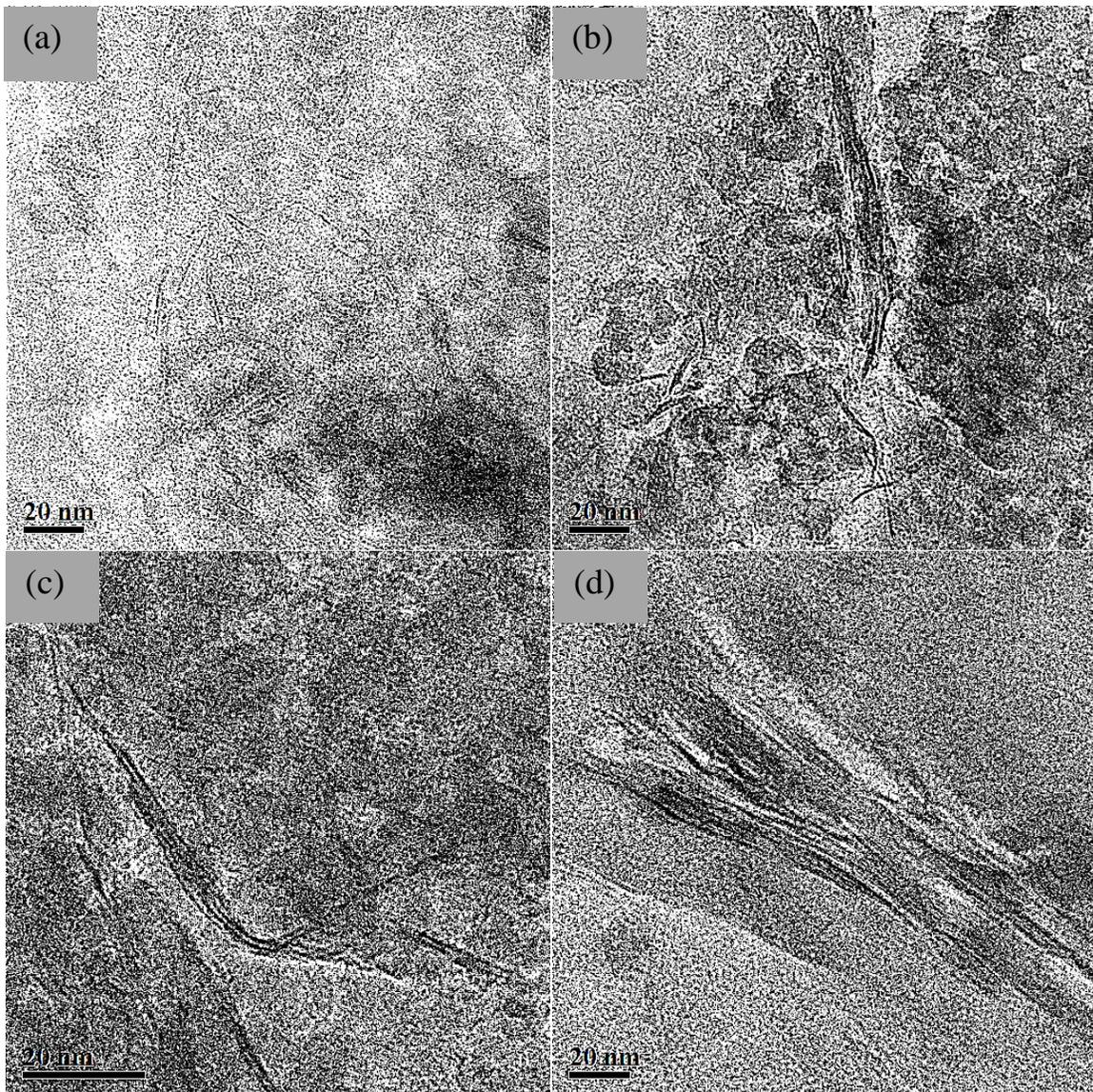


Figura 8. Micrografías TEM de hidrogeles XG-Mt: (a) $H_{0.5}$, (b) H_1 , (c) H_2 y (d) H_4 .

7.1.3 Dispersión de Rayos X de bajo ángulo

La Figura 9 muestra la gráfica de Kratky de los hidrogeles sólo con GX (H_0), e hidrogeles GX-Mt ($H_{0.5}$ - H_4). La tendencia de los datos de H_0 , es de aumentar linealmente en relación con la intensidad (h), lo que indica que las moléculas de GX tienen una estructura tipo cuerda y se encuentran homogéneamente dispersas en el medio acuoso. Los resultados concuerdan con lo reportado por Holzwarth y Prestridge (1977) y más recientemente por Song *et al.* (2006), en cuyos trabajos muestran la molécula de la GX como una estructura de cuerda rígida. La incorporación de las partículas de Mt provoca una desviación del comportamiento lineal ascendente.

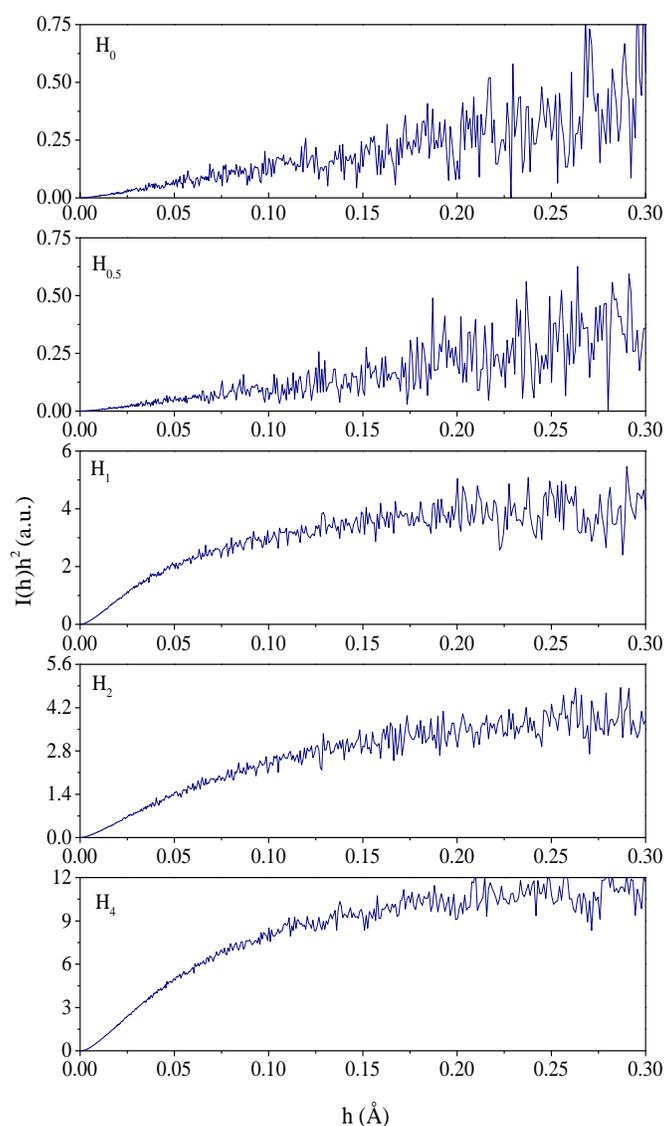


Figura 9. Gráfica Kratky de los hidrogeles GX-Mt

En la gráfica de Kratky se puede observar como los valores se vuelven asintóticos para valores altos de h , lo que sugiere la presencia de espirales Gaussianas. Las partículas de Mt forman agregados en donde el tamaño y la forma tienen una distribución tipo Gauss, este efecto fue más marcado cuando las concentraciones de Mt aumentaron. En la Figura 10 se presenta la dimensión fractal obtenida a partir del análisis de SAXS. El aumento del valor de ~ 1.74 a ~ 2.0 para H_0 y H_{2-4} respectivamente, apunta a que existe una formación ordenada de tactoides. En estos agregados las placas se encuentran acomodadas paralelamente entre ellas con espacios constantes de ~ 1 nm (Segad, 2012), lo que produce un efecto de estructuras alargadas 2D.

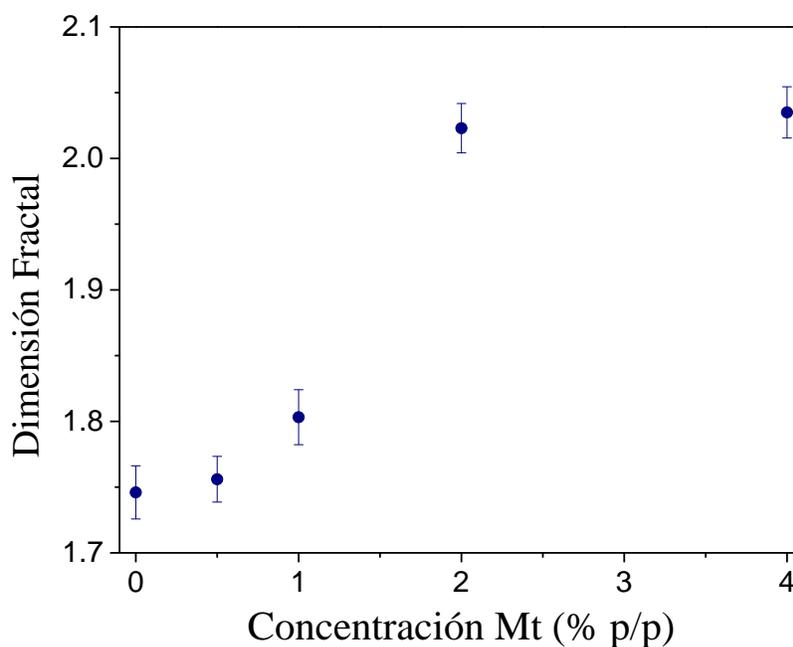


Figura 10. Dimensión fractal a partir de SAXS de los hidrogeles XG-Mt

7.1.4 Espectroscopia Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)

Para poder inferir con más precisión si las partículas de Mt refuerzan los hidrogeles de forma pasiva o activa, se realizó espectroscopia FTIR del hidrogel sin adición de partículas (H_0) y de los hidrogeles adicionados con Mt. En la Figura 11 se muestra el espectrograma de las partículas de GX en la región de $3750-500$ cm^{-1} , en donde se pueden observar las bandas en el intervalo de $1100-920$ cm^{-1} las cuales son características de los polisacáridos, y están relacionadas a vibraciones de los enlaces CO/CC. La banda presente en 1600 cm^{-1} es propia

de los grupos carboxilatos, y aquella en el intervalo de 1084-1028 cm^{-1} está relacionada con los anillos anhidroglucosídicos. En el caso de las bandas entre 1410-1404 cm^{-1} estas son atribuidas a los enlaces OH, y aquella en 1645 cm^{-1} está relacionada con el agua ligada.

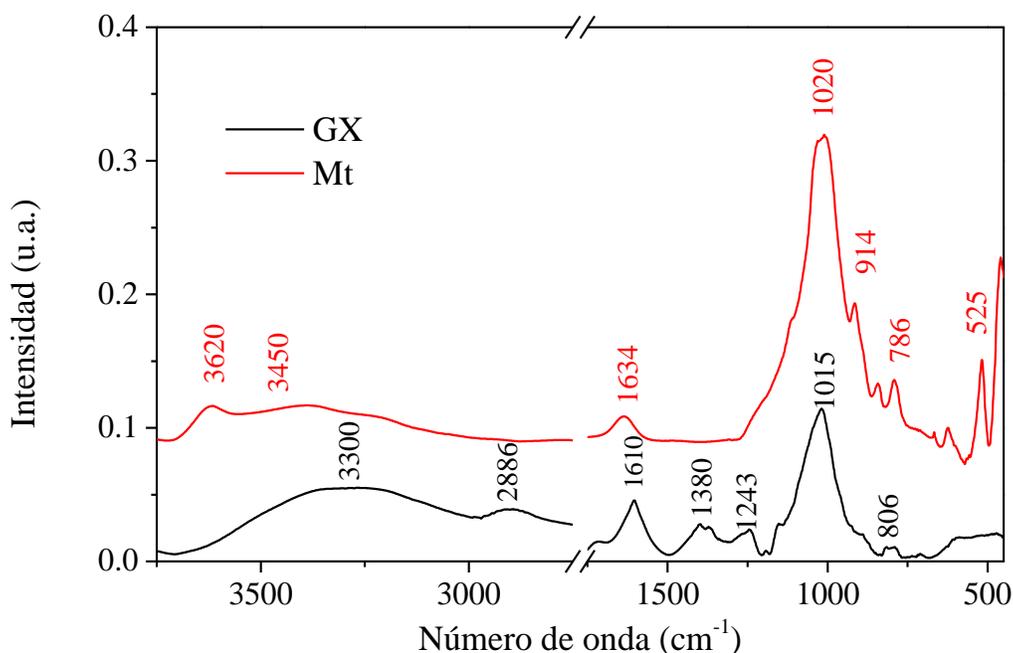


Figura 11. Espectro FTIR de la GX y Mt en el intervalo de 3750-500 cm^{-1} .

La banda entre 2932-2928 cm^{-1} está relacionada con las vibraciones del enlace C-H, mientras que la banda de 3420-3434 cm^{-1} se atribuye al enlace de hidrógeno con los grupos hidroxilos (OH) y se encuentra relacionada con vibraciones complejas de tensión asociadas a enlaces de grupo hidroxilos.

Adicionalmente, la Figura 11 muestra el barrido de las partículas de Mt (sin GX), para el cual algunas de las bandas características (Madejová *et al.*, 2002; 2003) son las siguientes: la banda presente en 3620 cm^{-1} se relaciona con las vibraciones de tensión de los grupos OH de las moléculas de agua enlazadas débilmente con la superficie de SiO. Aquella situada en 3450 cm^{-1} es atribuida a las vibraciones simétricas de tensión ν_1 (OH) del agua ligada. En cuanto a la banda en 1634 cm^{-1} , esta puede ser atribuida a las vibraciones de tensión de ν_2 (H-O-H), por otro lado, aquella situada en 914 cm^{-1} se relaciona con vibraciones de tensión de los enlaces Al-OH-Al. En el caso de la banda presente en 525 cm^{-1} se relaciona con las vibraciones de Si-O-Al (IV), y para SiO es el pico pronunciado en 1020 cm^{-1} .

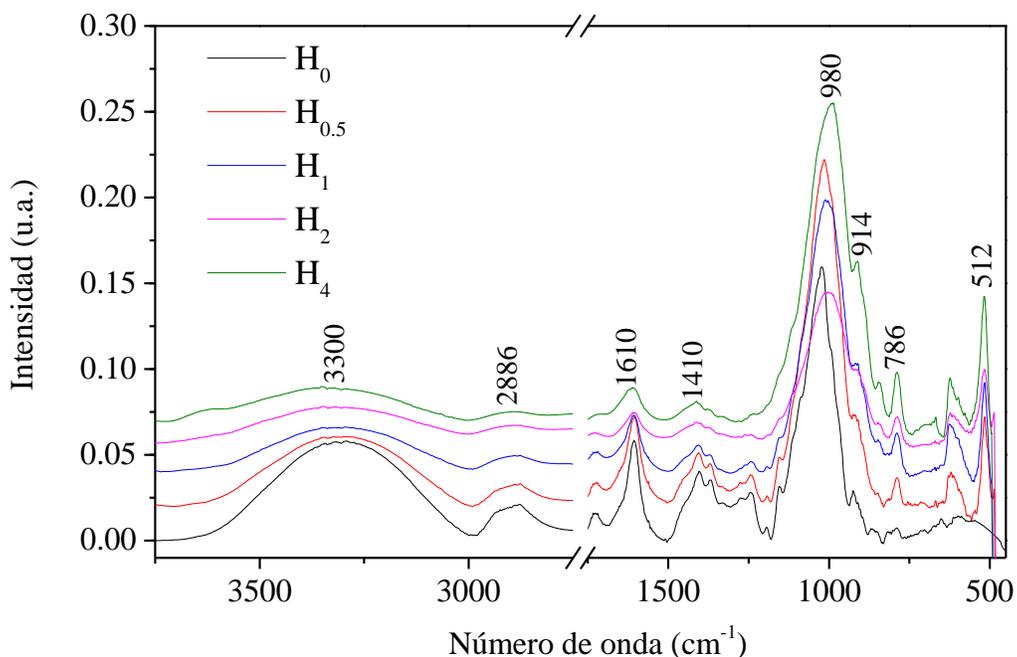


Figura 12. Espectro FTIR de hidrogeles GX-Mt.

En la Figura 12 se presentan las curvas de los hidrogeles XG-Mt (H_{0.5}, H₁, H₂ y H₄), donde se puede inferir que la intensidad de la banda en 3300 cm⁻¹ disminuye con la incorporación de Mt, lo que indica una reducción del agua ligada. La banda en 1380 cm⁻¹ se recorre a 1420 cm⁻¹ lo que refleja cambios en las vibraciones de los grupos alcano (-CH) de la goma. Adicionalmente, la banda en 1015 cm⁻¹ de H₀ pasa a 987 cm⁻¹ en H₄, lo que podría indicar la formación de enlaces entre fracciones de las moléculas de GX y la superficie de la Mt en las regiones de Al-OH-Al. Además, las bandas en 786 y 512 cm⁻¹ son características de Mt.

De manera que los resultados mostrados en la Figura 12 pueden indicar que la Mt actúa como un relleno activo al interactuar con las moléculas de la GX. Tales interacciones pueden deberse a la naturaleza ácida de las partículas de Mt, quienes son proveedoras de protones que pueden llegar a modificar la estructura de las moléculas de la GX.

7.1.5 Caracterización reológica de hidrogeles reforzados

El esfuerzo cortante en función de la tasa de corte (ascendente y descendente), es decir las curvas de flujo de los hidrogeles de GX-Mt se presentan en la Figura 13. En general, los hidrogeles presentan irreversibilidad ya que la curva descendente se encuentra por debajo de la curva ascendente, es decir histéresis. La disminución del esfuerzo cortante en el sentido descendente puede deberse al alineamiento de las moléculas (helicoidales) de la GX con el sentido del flujo. De hecho, la curva ascendente puede ser considerada como un pre-acondicionamiento de los materiales ya que la segunda curva (regreso) presenta una menor resistencia al flujo. Esto puede sugerir que las partículas de Mt se alinean fácilmente en la dirección del flujo a tasas de corte altas, mientras que a valores bajos muestran una distribución desordenada.

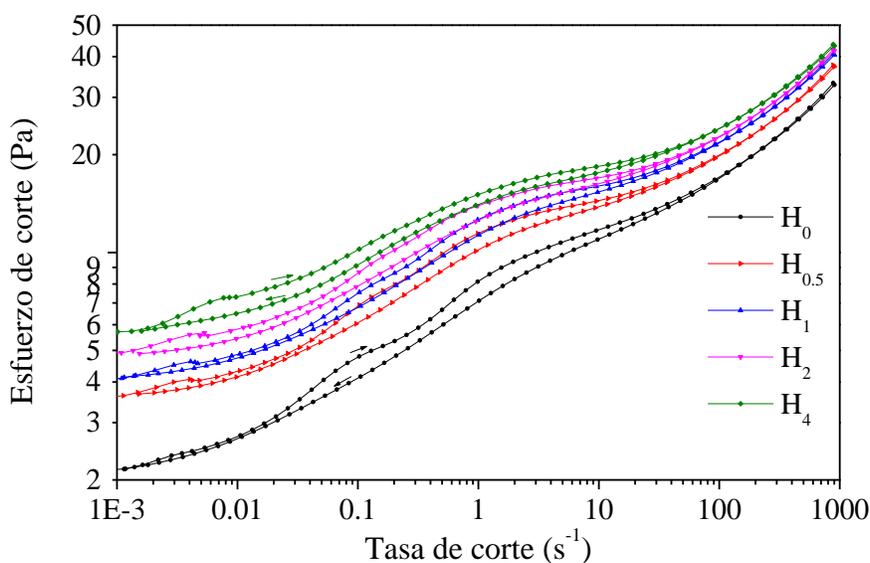


Figura 13. Curvas de flujo ascendentes y descendentes de los hidrogeles GX-Mt

La viscosidad aparente de los hidrogeles a una tasa de corte de 1.0 s⁻¹ y en función de la concentración de Mt se muestra en la Figura 14. Se puede observar que la incorporación de la Mt tiene un gran efecto sobre esta propiedad, la cual incrementa considerablemente con la concentración de Mt ya que el valor de H₄ es prácticamente el doble que de H₀. Lo anterior puede ser indicio del reforzamiento de la estructura inducido por las partículas de Mt. Incluso,

para una tasa de corte dada la viscosidad aparente puede ser descrita por una función exponencial.

$$\eta_{app} = \eta_{app,0} + K \exp[-([Mt] - [Mt]_0/\tau)] \quad (1)$$

En donde K y τ son constantes dependientes de la tasa de corte, y [Mt] es la concentración de Mt. Esto quiere decir que a cantidades relativamente bajas de Mt generan un cambio considerable en la viscosidad aparente. Para ilustrar mejor esto, en la Figura 14 se muestra la dependencia de la viscosidad aparente en función de la concentración de partículas inertes de Mt y sílice, para el caso de las partículas de sílice el valor de la viscosidad aparente es prácticamente el mismo del hidrogel sin partículas, lo que sugiere que efectivamente las partículas de Mt actúan como agentes modificadores de la estructura (reellenos activos) y las partículas de sílice como reellenos (pasivos).

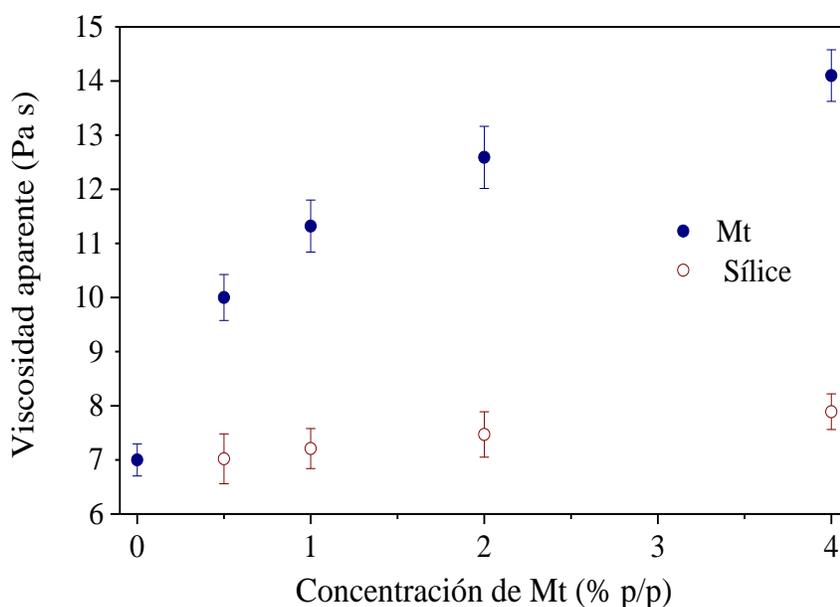


Figura 14 Viscosidad aparente a 1.0 s^{-1} en función de la concentración de Mt

La Figura 15 muestra los módulos elástico G' y viscoso G'' en función de la deformación (%). Todos los hidrogeles fueron caracterizados por una región viscoelástica lineal (RVL), tanto en G' y G'' , que abarcó varias décadas de la deformación (0.1 – 20 %), siendo el módulo elástico (G') predominante sobre el módulo viscoso (G''). Una RVL extensa es indicativa de que el hidrogel formado está bien consolidado y es estable, resistiendo sus zonas de unión (nodos) en la red polimérica la deformación. En la RVL, G' fue mayor que G'' , por lo que

los hidrogeles presentaron características de materiales viscoelásticos sólidos. También se observa que, en la RVL, el valor de los ambos módulos incrementó conforme se aumentó la concentración de Mt. Este resultado confirma que las partículas sólidas reforzaron la matriz biopolimérica. En todos los casos, a una deformación de aproximadamente 30%, el valor de G' empieza a decaer, indicativo de que la matriz del gel empieza a romperse gradualmente, hasta que eventualmente se rompe a una tasa constante.

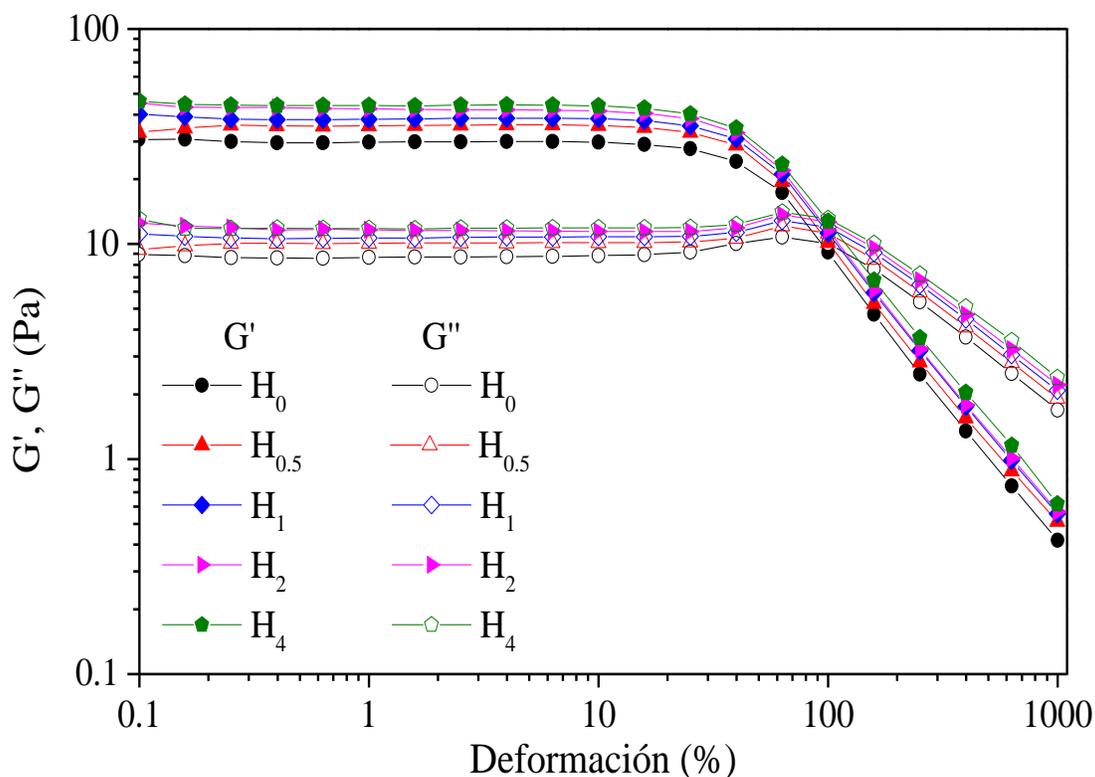


Figura 15. Barrido oscilatorio de deformación de hidrogeles GX-Mt.

Lo anterior puede indicar que la concentración de Mt no afecta la extensión de la RVL, sin embargo, la concentración de Mt sí tiene un efecto significativo en la magnitud de los valores de G' en esta región, mostrados en la Figura 16 con respecto a la concentración de Mt. Se puede observar que los valores de G' son más grandes conforme aumenta la concentración de Mt (hasta el 1% p/p), lo que sugiere que la elasticidad de los hidrogeles de GX-Mt incrementa y por lo tanto existe una consolidación de la estructura, lo que puede deberse a que las partículas de Mt actúan como puntos de unión en donde las moléculas de GX son adsorbidas. Además, se presenta una diferencia marcada en los valores de G' entre 0 y 0.5% p/p de Mt, que podría ser explicada por la manera en que se encuentran las partículas de Mt,

dispersas y exfoliadas incluso a bajas concentraciones de Mt, lo que potencia el efecto de reforzamiento.

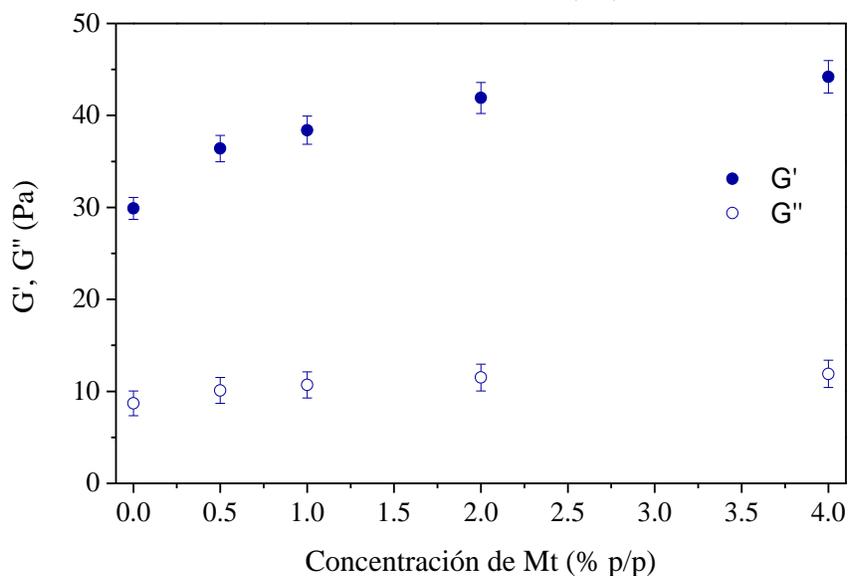


Figura 16. Valores del G' y G'' en RLV con respecto a la concentración de Mt.

Sin embargo, conforme aumenta la concentración de Mt la formación de agregados también lo hace (mostrados en las micrografías TEM, Figura 8), esto produce un incremento gradual de la elasticidad de los hidrogeles. Por otra parte, la magnitud de G'' permanece prácticamente constante en 11.0 Pa, lo que indica que la disipación es dominante en las moléculas de GX que se encuentran dispersadas en la fase bulk. Finalmente, a una deformación de alrededor del 100 %, ocurre un entrecruzamiento entre G' y G'' , indicativo de la alta estabilidad de la estructura de los hidrogeles, ya que fueron capaces de soportar un alto grado de deformación antes de que las propiedades viscosas predominaran a las elásticas.

Por lo que se refiere la estabilidad estructural (mecánica) relacionada con los cambios de temperatura, en los hidrogeles comerciales se busca que esta característica esté presente en ellos. En este caso lo importante es que los materiales tengan la capacidad de soportar la deformación a pesar de que la temperatura cambie. La Figura 17 presenta los resultados de la curva del barrido de temperatura (25 a 90 °C) a un 1 Hz de frecuencia y 1% de deformación constante. Se puede observar que todos los hidrogeles muestran una disminución en los módulos viscoelásticos conforme aumenta la temperatura, esta disminución se puede

clasificar en dos regiones: (i) una región inicial con una pendiente negativa suave, en donde los módulos permanecen prácticamente constantes, seguida de (ii) una región con una pendiente negativa bastante pronunciada en donde los valores de los módulos disminuyen drásticamente.

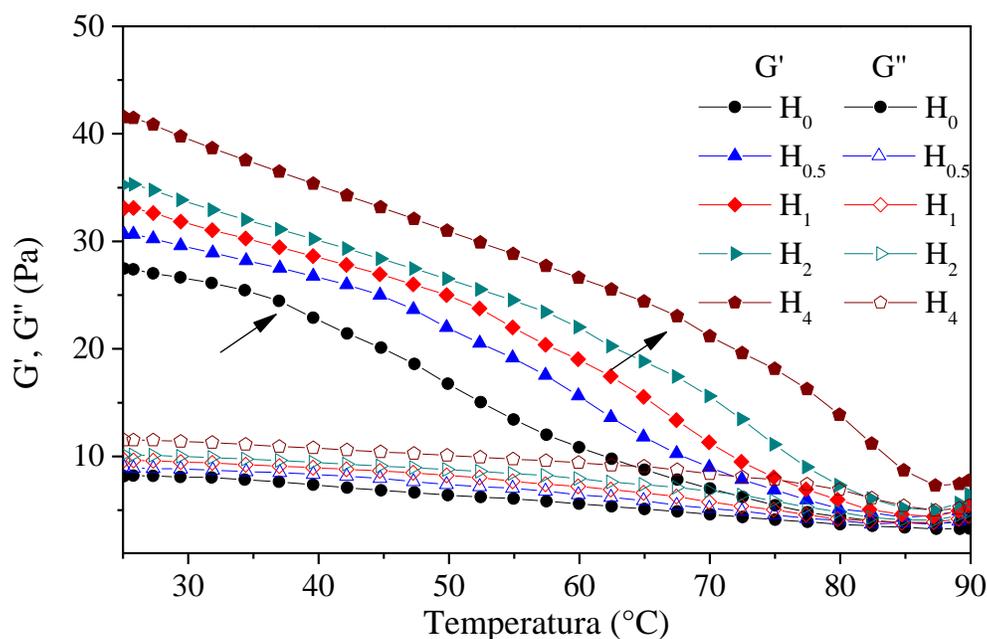


Figura 17 Curvas del barrido de temperatura de hidrogel XG-Mt.

El hidrogel sin Mt (H_0) muestra los valores más bajos de ambos módulos (G' y G''), mostrando un decaimiento pronunciado de las propiedades elásticas (reflejado por G') a partir de los 36°C . Lo anterior puede deberse a que la dispersión de GX es bastante inestable incluso para temperaturas moderadas, ya que las moléculas en forma de espiral de la GX aumentan su energía cinética lo que produce una estructura desorganizada. Bajo estas condiciones, el sistema es incapaz de retener el agua provocando el colapso de la dispersión coloidal.

La incorporación de las partículas de Mt mejora la estabilidad de los hidrogel GX-Mt, lo cual se ve reflejado por el incremento de la temperatura crítica (temperatura máxima que soporta el hidrogel antes de colapsar) en la que los sistemas presentan un rápido decaimiento de los módulos viscoelásticos. La interacción de las moléculas de la GX con la superficie de las partículas de Mt mejora la elasticidad de los hidrogel, por lo que la estructura

tridimensional de los hidrogeles se ve sólo ligeramente dañada. La Figura 18 presenta las temperaturas críticas en función de la concentración de Mt, se puede observar que la temperatura crítica incrementa exponencialmente con respecto a la concentración de Mt. En el caso del hidrogel H4, la temperatura crítica en la que comienza una ruptura importante de la estructura está por encima de los 65 °C.

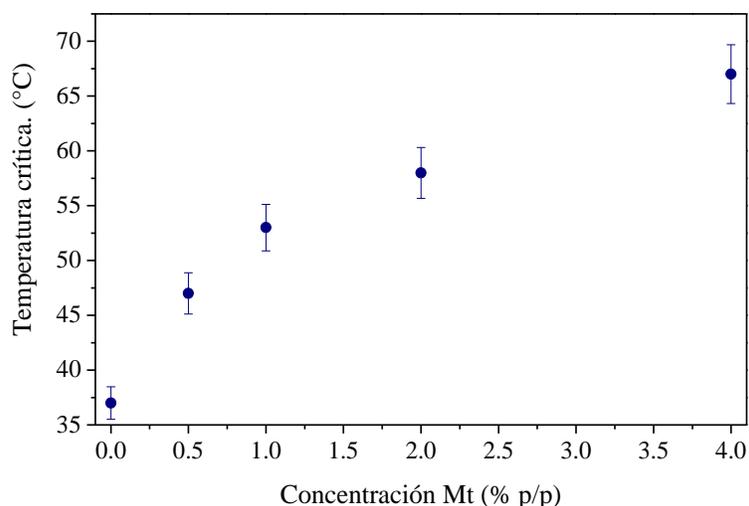


Figura 18 Temperatura crítica de los hidrogeles GX-Mt en función de la concentración de Mt.

Siguiendo con la caracterización reológica, cuando los hidrogeles son sometidos a un esfuerzo cortante bajo y constante, estos muestran curvas típicas de creep-compliance (fluencia-relajación) presentadas en la Figura 19 (a). Se puede considerar que las curvas tienen presentes tres regiones: (i) una región de deformación elástica instantánea en donde los enlaces del hidrogel se estiran elásticamente; (ii) una segunda región de deformación elástica retardada en la que los enlaces se rompen y se vuelven a formar; (iii) y una última región de deformación Newtoniana cuyo tiempo de recuperación de los enlaces rotos es mayor al tiempo de la prueba.

La deformación elástica instantánea es definida como el inverso de la elasticidad instantánea ($J_0 = 1/E_0$), para los hidrogeles GX-Mt los valores son más bajos (es decir valores altos de elasticidad) conforme aumenta el contenido de Mt (lado derecho de la Figura 19 (b)).

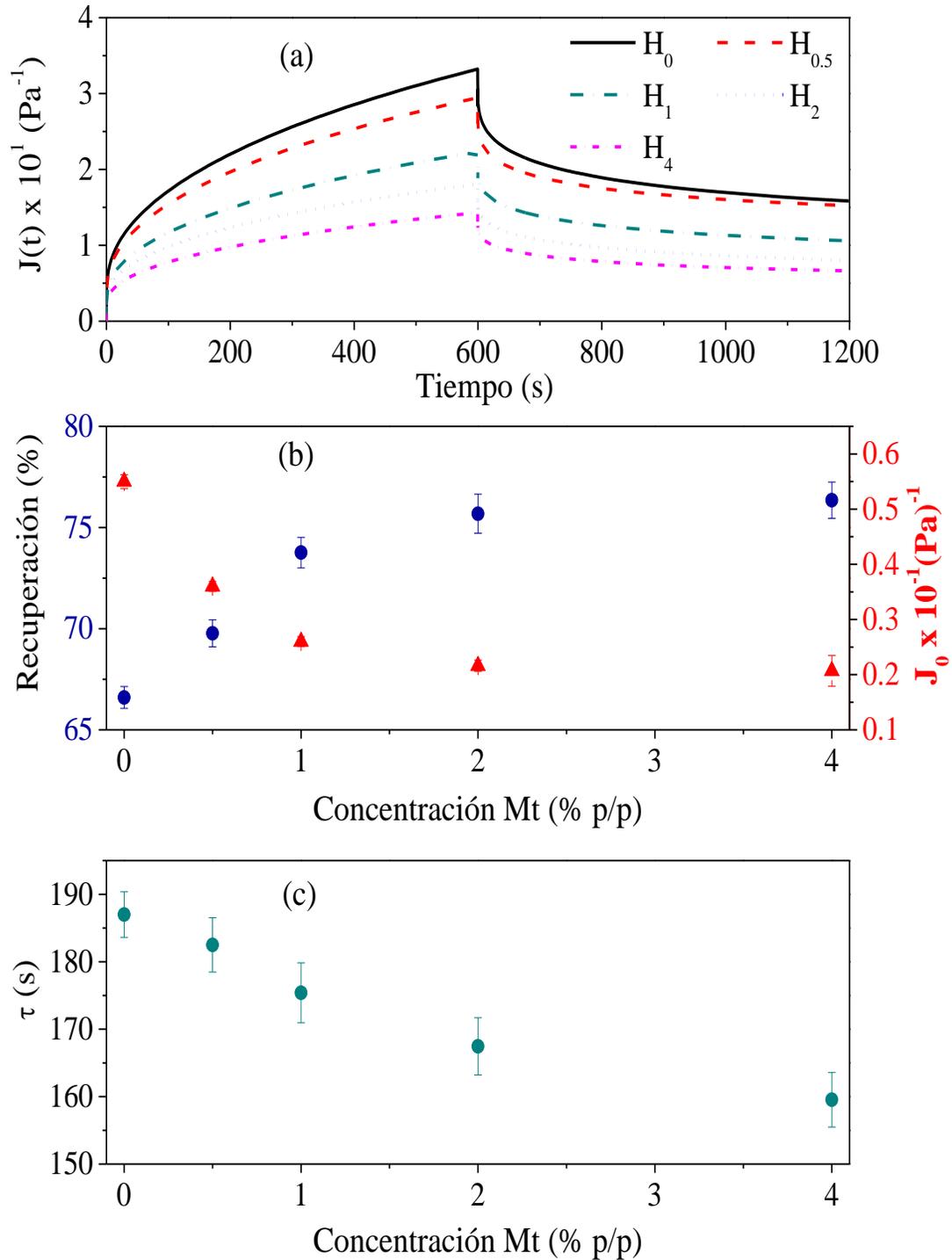


Figura 19. (a) Curvas de Creep-compliance de hidrogeles GX-Mt, (b) porcentaje de recuperación en función de la concentración de Mt, (c) constante de tiempo de relajación.

En este sentido, se puede tomar en consideración una cuarta región en la curva de Creep-compliance cuando el esfuerzo cortante es retirado y la deformación se suspende. Esta cuarta

región puede representar una medida de la habilidad de un material de recuperar parcialmente la estructura, después de que se retira el estrés aplicado. La Figura 19 (b) del lado derecho, muestra que el porcentaje de la recuperación de la estructura es mayor conforme aumenta la concentración de Mt, mientras que en la Figura 19 (c) se presenta la constante de tiempo de retardación (τ) estimada a partir del ajuste exponencial de las curvas de Creep, la cual disminuye al aumentar la concentración de Mt. El parámetro τ puede ser considerado como el tiempo que les toma a los enlaces para reestructurarse después de que se suspende el esfuerzo aplicado. Tanto el porcentaje de recuperación como la constante de tiempo de retardación brindan una evidencia de que las partículas de Mt contribuyen a mejorar las propiedades viscoelásticas de los hidrogeles de XG-Mt.

7.2 Caracterización de emulgeles, Fase II

Para la obtención de los emulgeles, como ya se mencionó anteriormente, se tomaron como base los hidrogeles con y sin arcilla. Con la incorporación del aceite de manzanilla hubo un cambio significativo en la apariencia de los ahora emulgeles, propio del proceso de emulsificación. En la Figura 20 se muestra la apariencia de estos emulgeles, puede observarse que sólo existe una ligera diferencia en el color entre E₀ y el resto de las formulaciones debido a la presencia de la Mt. Es importante destacar la homogeneidad aparente de los materiales, sobre todo no parece haber coalescencia de las gotas, cremación o sedimentación. Lo que indica una buena estabilización de la fase dispersa en el hidrogel. Así mismo se puede observar claramente la resistencia a fluir de los emulgeles, lo que sugiere una interacción de todos los componentes que resulta en un reforzamiento de la matriz polimérica que deberá ser evidenciado por los métodos de caracterización propuestos.

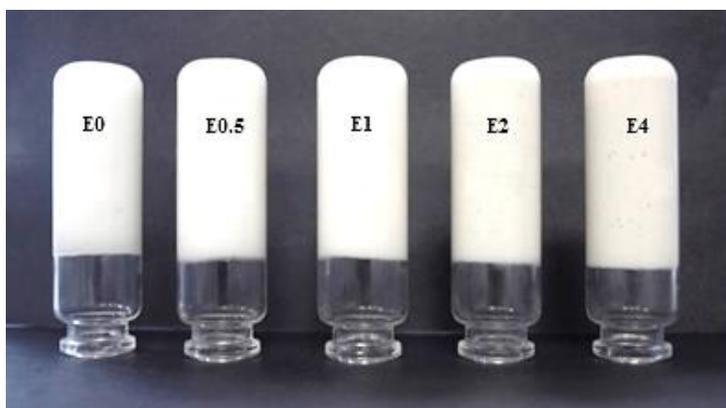


Figura 20. Imagen de los emulgeles a diferentes concentraciones de Mt en posición invertida.

7.2.1 Microscopía confocal

Se llevó a cabo un análisis microestructural para determinar la distribución dentro del gel de las gotas de aceite y las partículas de arcilla. En la Figura 21(a) se puede observar que la matriz del hidrogel es homogénea, en este caso no hay presencia de arcilla, y las gotas parecen tener un tamaño y distribución uniforme y a pesar de la cercanía entre ellas no existe coalescencia ni aglomerados. Esto puede deberse a las características estructurales del hidrogel que favorecen la estabilización de las gotas de aceite, principalmente debido a la rigidez de la matriz que mantiene suspendidas a las gotas, esta misma característica puede

tener influencia en el tamaño de las gotas que a pesar del tiempo de homogenización, no se logra un tamaño dentro de la escala nanométrica.

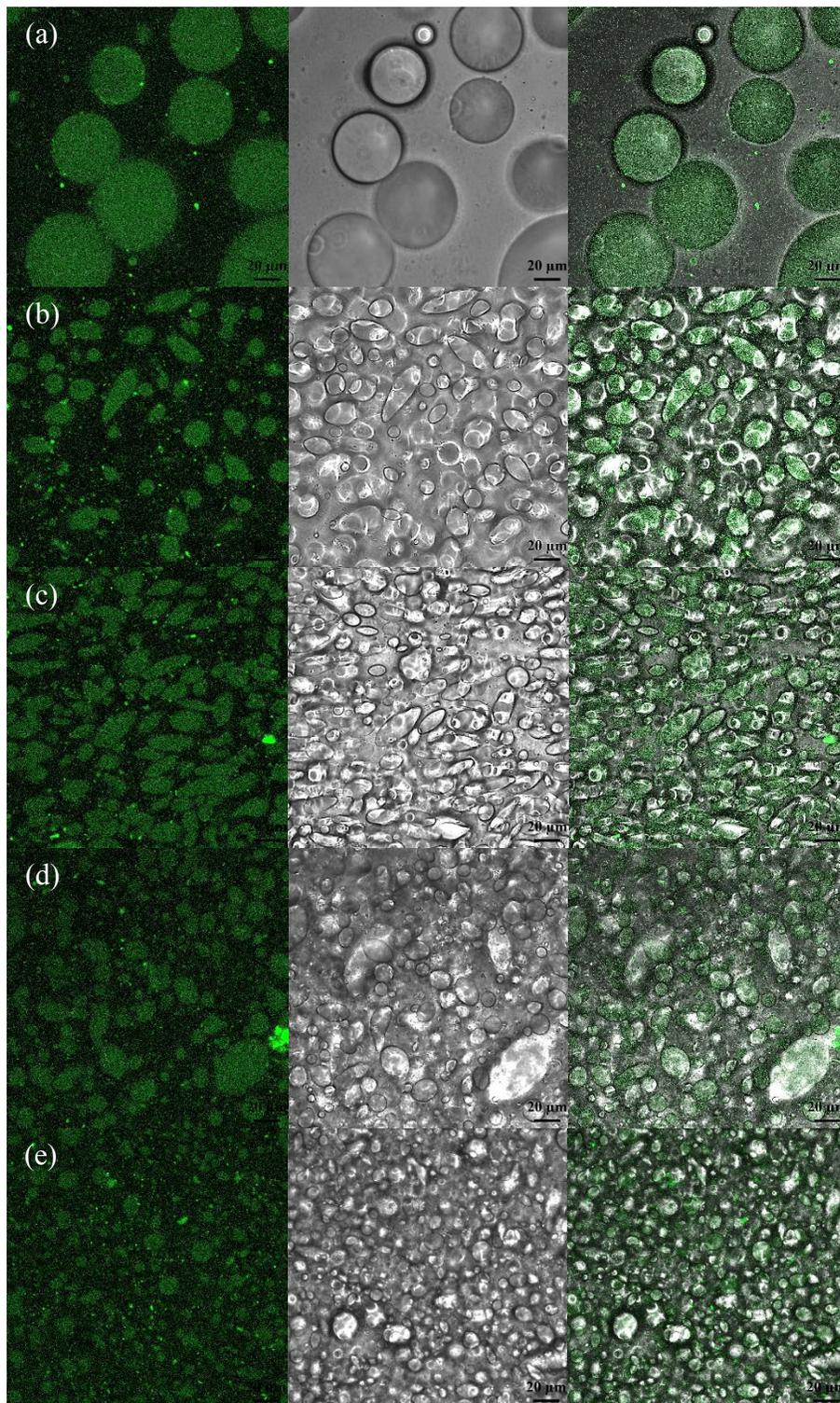


Figura 21. Imágenes de microscopía confocal de emulgeles GX-Mt (a)E₀, (b)E_{0.5}, (c) E_{1.0}, (d)E_{2.0} y (e)E_{4.0}.

Para poder realizar una comparación visual de la influencia que puede tener las partículas de Mt en la estabilización de las gotas de aceite, se presenta el caso de la E_{4.0} en la Figura 21 (e), el emulgel con mayor contenido de arcilla. Comparando la Figura 21 (a-e), es claro que existe una distribución de las gotas totalmente diferente, la Mt parece tener un impacto significativo sobre todo en el tamaño de las gotas de aceite, el cual disminuyó en comparación con el emulgel sin arcilla.

Otra característica en la que difieren es en la pérdida de esfericidad de la mayor parte de las gotas, sin embargo la deformación de las gotas varía mucho, posiblemente con respecto al contenido de arcilla, esto se analizará en una sección posterior de este trabajo, sin embargo, a pesar del tamaño de las gotas, y de la interacción entre ellas y la Mt, estas no llegan a coalescer. Retomando los resultados obtenidos en la caracterización reológica de los hidrogeles, que dan indicios del reforzamiento del hidrogel por parte de la Mt, esto podría confirmarse con el estudio de estas imágenes, en donde se puede observar como la arcilla también parece tener una aportación en la estabilización de la fase dispersa y en el tamaño final de las gotas debido precisamente a la estructura de la red polimérica del hidrogel.

7.3.2 Microscopía óptica y deformación de gota

Con base en lo obtenido en el análisis de la microscopía confocal, concerniente a la deformación que puedan estar sufriendo las gotas con relación al contenido de Mt, se obtuvieron imágenes por microscopía óptica, mostradas en la Figura 22. Esto con el objetivo de poder determinar la deformación de la esfericidad de las gotas, para lo cual se midió el tamaño a lo largo y ancho de las gotas obtenidas de varias micrografías (50 gotas), en donde se pudo llegar a una relación del porcentaje de deformación que se muestra en la Figura 23.

Es posible que, debido a la rigidez del hidrogel, existe un mayor porcentaje de deformación al aumentar el contenido de arcilla hasta llegar a un máximo y después baja y permanece constante. Las barras en azul (en la Figura 23) hacen refieren a la desviación estándar, en el caso de la ausencia de Mt todas las gotas son esféricas, para el emulgel con un contenido de arcilla de 0.5% en peso ya se tiene un porcentaje de deformación mucho más elevado, y para la muestra con el 1% en peso existen gotas desde perfectamente esféricas hasta altamente deformadas, eso se refleja en una desviación estándar más amplia en comparación con las

demás muestras, después de este máximo el porcentaje de deformación de casi 30% baja y permanece estable para los emulgeles con el mayor contenido de sólidos. Esto coincide con la caracterización reológica, que se presenta en la siguiente parte, en donde pareciera existir una concentración límite de partículas que actúen de forma activa, lo que resulta en características estructurales similares de los emulgeles (sin cambios significativos) al rebasar esta concentración.

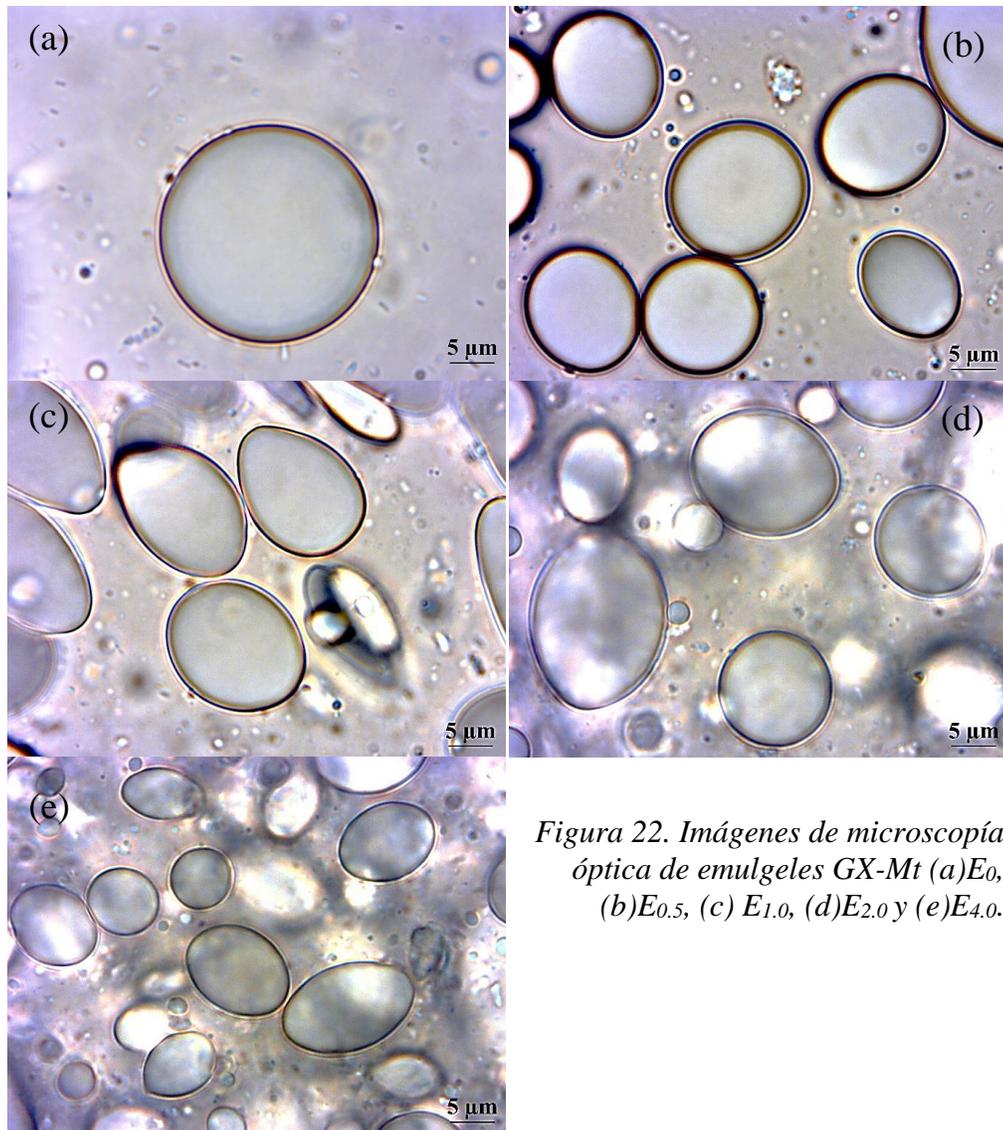


Figura 22. Imágenes de microscopía óptica de emulgeles GX-Mt (a) E_0 , (b) $E_{0.5}$, (c) $E_{1.0}$, (d) $E_{2.0}$ y (e) $E_{4.0}$.

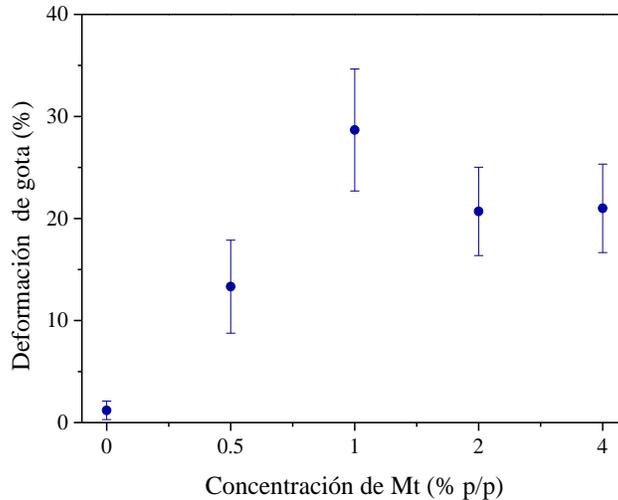


Figura 23. Porcentaje de deformación de las gotas de aceite con respecto al contenido de Mt.

7.3.3 Caracterización reológica de emulgeles

Las curvas de flujo de los emulgeles se presentan en la Figura 24. El esfuerzo cortante en función de la tasa de corte (ascendente y descendente) se muestra en Figura 24 (a) en donde al igual que los hidrogeles, los emulgeles también presentan irreversibilidad ya que la curva descendente se encuentra por debajo de la curva ascendente. Es importante señalar que a tasas de corte por arriba de 0.1 s^{-1} los valores del esfuerzo cortante son prácticamente iguales sin importar el sentido en el que cambie la tasa de corte. Por otro lado la viscosidad aparente en función de la tasa de corte se presenta en la Figura 24 (b) en donde se puede observar que todos los emulgeles presentan un comportamiento típico de fluidos readelgazantes en donde la tasa de corte produce un patrón de flujo que es inversamente proporcional, esto podría deberse a que tanto las partículas de arcilla como las gotas de aceite se alinean en la dirección del flujo y se logra disminuir así su resistencia a fluir.

De forma general, existe un ligero incremento en la viscosidad aparente entre E_0 (emulgel sin arcilla) y el resto de las formulaciones, sin embargo, este efecto se debe sólo a la presencia de arcilla sin importar la concentración en la que se encuentre, esto se infiere a partir de que las curvas correspondientes a los emulgeles con arcilla tienen prácticamente los mismos valores. Sin embargo el aumento en la viscosidad aparente fue considerable comparando los emulgeles con los hidrogeles, la presencia y atrapamiento de las gotas de aceite en la

matriz polimérica da como resultado un cambio en las propiedades reológicas, lo que sugiere que puedan permanecer sin coalescer.

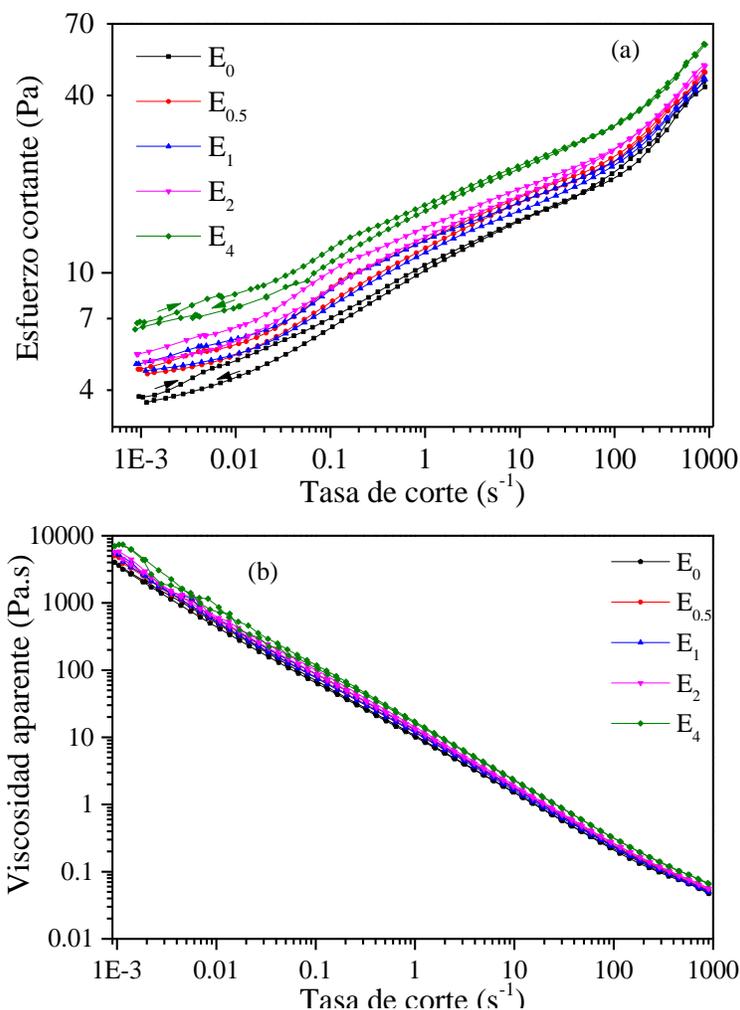


Figura 24. Curvas de flujo de emulgeles con diferentes concentraciones de arcilla.

Por otra parte, se realizó un análisis del comportamiento de los módulo elástico y viscoso (G' y G'') con respecto al cambio en el porcentaje de deformación, manteniendo la frecuencia constante a 1 Hz, de los emulgeles con y sin contenido de Mt presentado en la Figura 25. El comportamiento viscoelástico es similar al de los hidrogeles presentados en la Figura 15, con la existencia de una región viscoelástica lineal (RVL). Sin embargo, a diferencia de los hidrogeles, los emulgeles parecieran ser más frágiles ya que la RVL alcanza sólo hasta el 1% de deformación antes de presentar un decaimiento ligeramente pronunciado y cercano al 50% se logra la ruptura de todos los emulgeles en valores similares (comparado con el 90% de los

hidrogeles), es decir pasa de tener características mayormente sólidas a un comportamiento predominantemente líquido.

Al parecer las gotas de aceite provocan una disminución en la consolidación de la estructura lo que hace disminuir las condiciones a las que las propiedades permanecen constantes. Opuestamente a esto a diferencia del comportamiento de los hidrogeles, en el caso de los emulgeles el contenido de arcilla no parece tener un efecto importante, sólo la presencia de las partículas, esto es visible en el aumento de ambos módulos entre E_0 (sin arcilla, puntos negros) y el resto de las formulaciones ya que las curvas son prácticamente iguales, lo que podría suponerse en que se alcanza una concentración máxima que soporta la matriz polimérica y el comportamiento se hace independiente al aumentar la concentración.

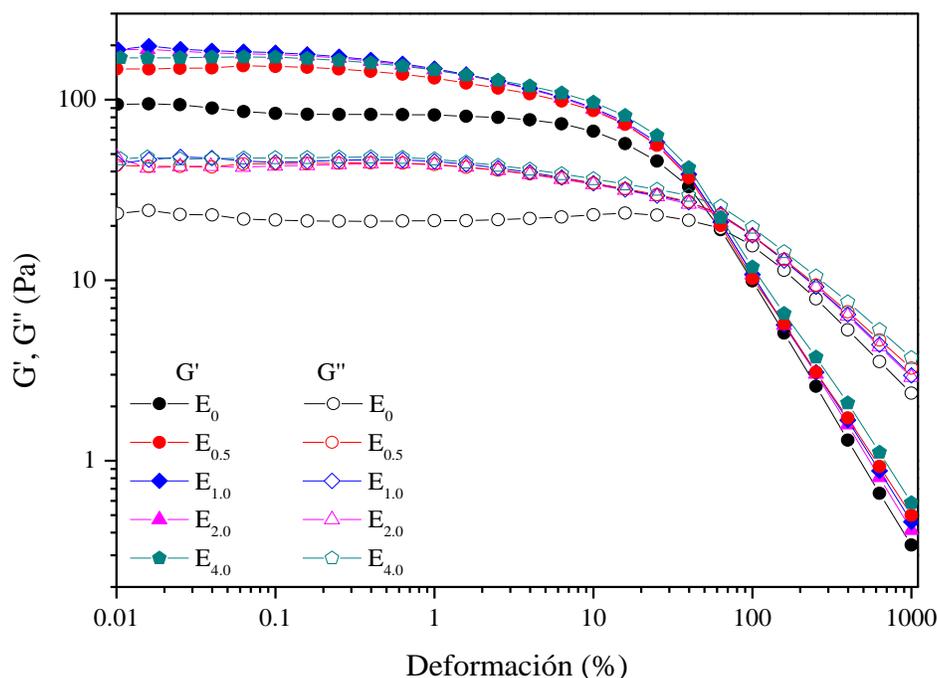


Figura 25. Módulo elástico y viscoso del barrido de amplitud de emulgeles GX-Mt.

En contraste con lo que sucede en la viscosidad y propiedades viscoelásticas respecto al porcentaje de deformación, en donde parece no haber diferencias significativas con respecto al contenido de arcilla. En los barridos de temperatura a amplitud y frecuencia de deformación constantes que se muestran en las Figura 26 y 27 (módulo elástico y módulo viscoso respectivamente), sí existe una diferencia significativa en el aumento de la estabilidad térmica de las propiedades viscoelásticas de los emulgeles con respecto al contenido de

arcilla. Entre mayor sea el contenido de sólidos, mayor será su estabilidad térmica ($E_{4.0}$) en comparación con E_0 (puntos color negro) sin arcilla. Es claro el efecto que tiene la arcilla en la estabilidad térmica. La fragmentación de la estructura de la red polimérica podría ser atribuida a la mayor movilidad de las partículas y el decremento de la fuerza de los enlaces presentes debido al calentamiento.

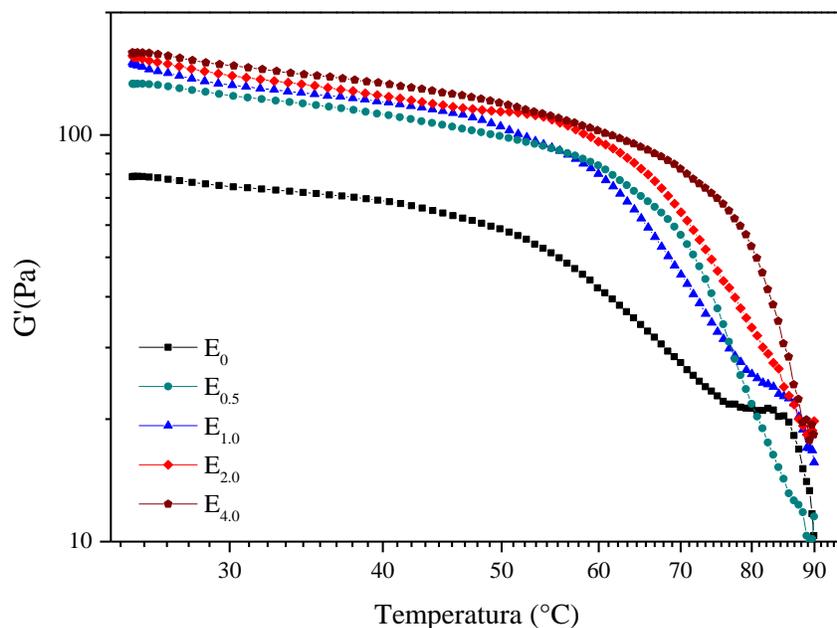


Figura 26. Comportamiento del módulo elástico con respecto a la temperatura.

Las curvas del módulo elástico en función de la temperatura son mostradas en la Figura 26, se puede observar una disminución lenta y progresiva correspondiente a las características de un sólido con respecto al aumento de la temperatura, a partir de los 60° C se marca bruscamente la caída, hasta esta temperatura se podría garantizar la estabilidad de los emulgeles.

El decaimiento del módulo viscoso presentado en la Figura 27 (G'') es más sutil que el del módulo elástico, es decir las propiedades atribuidas al comportamiento de un líquido soporta un intervalo más amplio de cambio de temperatura entre 70 y 80 °C antes de disminuir bruscamente. Esto podría ser comparado más adelante en un análisis similar de los hidrogeles para poder identificar a que es atribuible este comportamiento, si a la incorporación de partículas o de gotas de aceite.

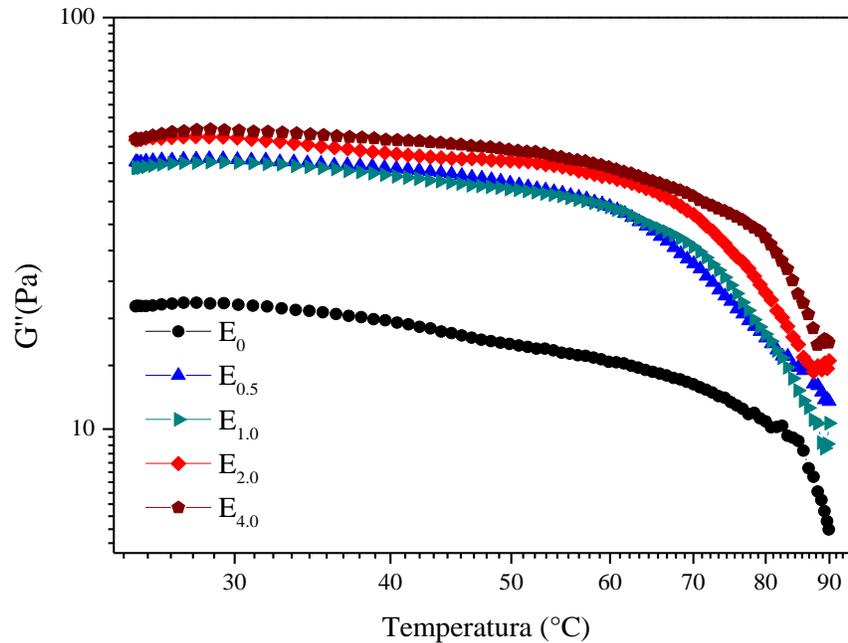


Figura 27. Comportamiento del módulo viscoso con respecto a la temperatura.

Hasta el momento se puede decir que el comportamiento viscoelástico es diferente entre los hidrogeles y emulgeles, siendo estos últimos menos resistentes, lo que puede ser atribuible a que las gotas de aceite provocan una disminución en la consolidación de la estructura lo que hace disminuir las condiciones a las que las propiedades permanecen constantes.

En los barridos de temperatura a amplitud (1 %) y frecuencia (1 Hz) de deformación constantes existe una diferencia significativa en el aumento de la estabilidad térmica de las propiedades viscoelásticas de los emulgeles con respecto al contenido de arcilla, lo que es conveniente en ciertas aplicaciones en donde se busca garantizar la estabilidad mecánica y térmica de los materiales (*e.g.* productos cosméticos o farmacéuticos).

7.3.4 Distribución de tamaño de gota

Para poder evaluar la estabilidad de los emulgeles, se realizó la medición del tamaño de gota. La Figura 28 (a) muestra la distribución del tamaño de gota de los emulgeles, se puede observar que la muestra con mayor variación en el tamaño de las gotas, que varían desde 1-100 μm , es el emulgel que no tiene contenido de Mt (E_0), lo cual corresponde a lo mostrado por la microscopía óptica.

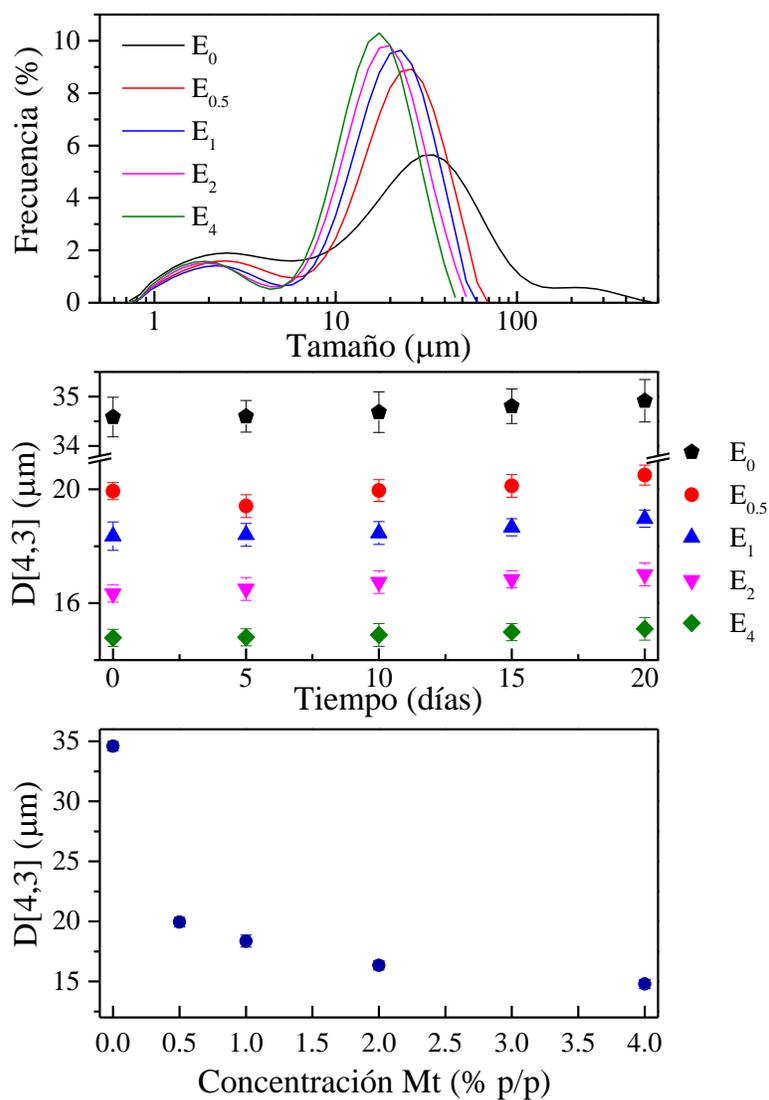


Figura 28. (a) Distribución de tamaño de gota, (b) Monitoreo del tamaño promedio de gota, (c) tamaño promedio de gota en función de la concentración de Mt de emulgeles.

El monitoreo del tamaño de gota $D_{[4,3]}$ de los emulgeles se presenta en la Figura 28(b), donde se observa claramente que hasta ese periodo de tiempo son sumamente estables, y prácticamente no existen cambios en el tamaño de las gotas de aceite. Cabe mencionar que el tamaño más pequeño es atribuible a la emulsión con el mayor contenido de Mt (E_4) como se muestra en la Figura 28(c) en donde se presenta el tamaño promedio $D_{[4,3]}$ en función del contenido de Mt.

Lo anterior está en concordancia con el análisis de microscopía óptica, sin embargo es prudente señalar que la medición podría ser afectada por la deformación de las gotas y/o el aglomeramiento de las partículas de Mt, ya que a mayor concentración de arcilla parece haber un tamaño más pequeño de las gotas de aceite.

7.3.5 Estudio de la estabilidad acelerada

De acuerdo con lo propuesto en la metodología, se realizó una prueba de estabilidad acelerada con el objetivo de hacer una proyección del tiempo en el que los emulgeles conservarían sus propiedades originales. Como resultado, se obtuvieron las cinéticas de separación (gráficas mostradas en Anexos) con lo que se pudo calcular el porcentaje de separación y el tiempo virtual en el que se alcanzaría. En la Figura 29 se muestran los tubos correspondientes a cada uno de los emulgeles después de la prueba. Se puede observar que en el emulgel que presenta dos fases claramente marcadas es el que no tiene contenido de Mt (E_0) en donde la fase de abajo correspondería al hidrogel y la fase de arriba al cremado del material en donde pueden coexistir prácticamente todas las gotas de aceite (de no haber coalescido) y en menor cantidad restos de hidrogel. Con características similares se encuentran los emulgeles $E_{0.5}$ y E_1 pero con una menor separación de fases al aumentar el contenido de Mt. Para los casos de E_2 y E_4 no existe separación aparente de fases, lo que sugiere una gran estabilidad.

La Tabla 1 muestra la velocidad de separación de los emulgeles, como se puede observar, el valor de la velocidad va decreciendo E_0 a E_4 . De igual manera ocurre con el porcentaje de separación bajo fuerza centrífuga. Este comportamiento puede ser debido a que la Mt forma interacciones electrostáticas con GX, fenómenos ya mencionado en los resultados de la Fase I, dando así mayor fuerza al gel, lo que ocasiona que el movimiento de las gotas sea menor a mayor concentración de Mt (Lu *et al.*, 2018). Se ha reportado que las gotas de aceite pueden ser atrapadas y mantenidas en la red polimérica de hidrogeles con alta viscosidad (Veverka *et al.* 2018) a través de la interacción de segmentos de cadenas y de las zonas de unión de la red. La última columna de la Tabla 1, muestra que es factible el uso de Mt para la estabilización de emulgeles, ya que comparado con la formulación sin Mt (E_0) en condiciones de 1 fuerza g, es posible llegar a conservar la estabilidad (formulación E_4) hasta en un ~95% más.

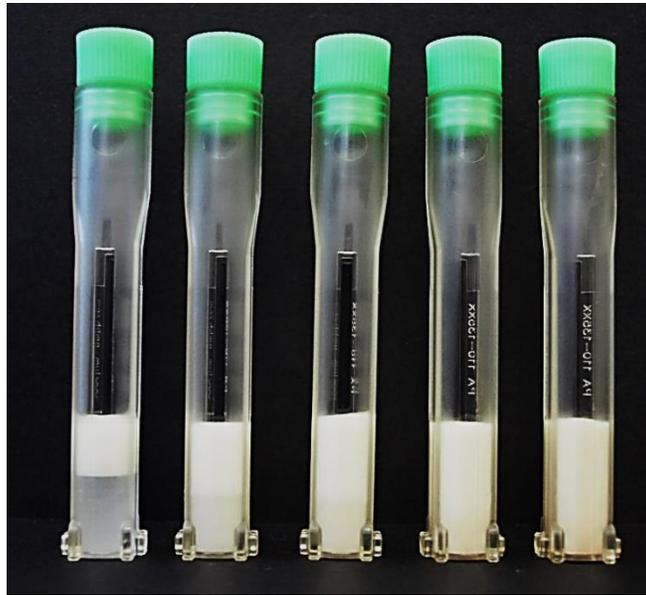


Figura 29. Fotografía de emulgeles después del estudio de estabilidad.

Estos resultados están relacionados con los de microscopia y tamaño de partícula, donde se puede inferir que el uso de Mt mejora la estabilidad de los emulgeles por un lado al inmovilizar las gotas debido a la consolidación del hidrogel y otro posible mecanismo que puede estar presente es la estabilización de las gotas a través de las partículas de Mt por un fenómeno de la estabilización tipo Pickering. Por lo tanto, se puede sugerir un uso comercial (uso cosmético) de la formulación E₄, garantizando su estabilidad por más de 12 meses de almacenamiento.

Tabla 1. Parámetros de estabilidad acelerada de los emulgeles.

Muestra	Velocidad de separación (µm/s)	% de separación en centrifugación	% de separación en 12 meses (1 xg)
E ₀	90.48±0.21	57.14±0.18	10.61±0.01
E _{0.5}	77.01±0.42	9.42±0.40	7.96±0.03
E ₁	68.54±0.14	6.28±0.17	5.30±0.05
E ₂	39.11±0.28	3.14±0.20	2.65±0.02
E ₄	2.23±0.09	0.62±0.07	0.53±0.01

Los valores son promedios de 3 mediciones ± desviación estándar.

8. Conclusiones

Uno de los objetivos planteados en este trabajo fue obtener hidrogeles con propiedades funcionales mejoradas a través del uso de partículas de Mt. Los resultados obtenidos en la Fase I muestran que utilizando la concentración del 2 % p/p (H₂) se logra este objetivo, los cuales indican que la Mt contribuye al entrecruzamiento de las moléculas de GX debido a la naturaleza ácida de las partículas.

La concentración de Mt tiene un efecto importante sobre las propiedades estructurales y reológicas de los hidrogeles. Los resultados obtenidos de los patrones de difracción de XRD y las micrografías TEM indican que a bajas concentraciones de Mt las partículas se encuentran homogéneamente dispersas y exfoliadas, y a partir del 2 % p/p las partículas forman agregados. Por otro lado, los obtenidos en SAX y FTIR indican que las partículas de Mt actúan como puntos de unión (nodos) en donde las moléculas de XG se encuentran unidas por puentes de hidrógeno principalmente.

La relevancia de los resultados obtenidos recae en el hecho de que la GX no tiene la capacidad de formar geles verdaderos por sí sola, no obstante, con la incorporación de partículas de Mt, específicamente a partir del 2 % p/p, se inducen la formación de hidrogeles consolidados. De modo similar en el caso de la estabilización de gotas de aceite, esta misma concentración de Mt logra mantener prácticamente inalterada la estructura (~3% de separación) durante 12 meses de almacenamiento.

Entre las posibles aplicaciones se encuentra la industria cosmética, donde hidrogeles y/o emulgeles de uso tópico requieren materiales con una alta elasticidad para poder aplicar capas delgadas, y tiempos prolongados de estabilidad, lo que se logra a bajas concentraciones de Mt. Por otro lado, la aplicación en la industria farmacéutica puede requerir de condiciones de mayor estabilidad contra los efectos de corte para lo que sería recomendable una concentración mayor de Mt.

Desde un punto de vista práctico, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la concentración de Mt y de fase oleosa puede ser utilizada como un parámetro de diseño para mejorar las propiedades mecánicas de hidrogeles y emulgeles de GX-Mt. En este sentido, la

combinación de la composición de la fase oleosa de y la matriz del hidrogel GX-Mt reforzada en un emulgel, puede ser explotada para la entrega transdérmica de bioactivos tanto hidrofílicos como lipofílicos.

9. Bibliografía

- Adekogbe, I., & Ghanem, A. (2005). Fabrication and characterization of DTBP-crosslinked chitosan scaffolds for skin tissue engineering. *Biomaterials*, 26(35), 7241-7250.
- Ahmed, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of advanced research*, 6(2), 105-121.
- Ali, S., & Bandyopadhyay, R. (2015). Evaluation of the exfoliation and stability of Na-montmorillonite in aqueous dispersions. *Applied Clay Science*, 114, 85-92.
- Anglin, E. J., Cheng, L., Freeman, W. R., & Sailor, M. J. (2008). Porous silicon in drug delivery devices and materials. *Advanced drug delivery reviews*, 60(11), 1266-1277.
- Bianco, A., Kostarelos, K., & Prato, M. (2005). Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current opinion in chemical biology*, 9(6), 674-679.
- Bignotti, F., Lebon, F., & Peroni, I. (2007). Effect of filler networking on the response of thermosensitive composite hydrogels. *European polymer journal*, 43(5), 1996-2006.
- Block, K. A., Trusiak, A., Katz, A., Alimova, A., Wei, H., Gottlieb, P., & Steiner, J. C. (2015). Exfoliation and intercalation of montmorillonite by small peptides. *Applied clay science*, 107, 173-181.
- Branca, C., Crupi, C., D'Angelo, G., Khouzami, K., Rifici, S., Visco, A., & Wanderlingh, U. (2015). Effect of montmorillonite on the rheological properties of dually crosslinked guar gum-based hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(5).
- Bresolin, T. M. B., Milas, M., Rinaudo, M., Reicher, F., & Ganter, J. L. M. S. (1999). Role of galactomannan composition on the binary gel formation with xanthan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26(4), 225-231.
- Brown, D. R., & Rhodes, C. N. (1997). Brønsted and Lewis acid catalysis with ion-exchanged clays. *Catalysis Letters*, 45(1-2), 35-40.
- Bueno, V. B., Bentini, R., Catalani, L. H., & Petri, D. F. S. (2013). Synthesis and swelling behavior of xanthan-based hydrogels. *Carbohydrate polymers*, 92(2), 1091-1099.
- Burey, P., Bhandari, B. R., Howes, T., & Gidley, M. J. (2008). Hydrocolloid gel particles: formation, characterization, and application. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(5), 361-377.
- Carretero, M. I. (2002). Clay minerals and their beneficial effects upon human health. A review. *Applied Clay Science*, 21(3-4), 155-163.
- Carrillo-Navas, H., Hernández-Jaimes, C., Utrilla-Coello, R. G., Meraz, M., Vernon-Carter, E. J., & Alvarez-Ramirez, J. (2014). Viscoelastic relaxation spectra of some native starch gels. *Food Hydrocolloids*, 37, 25-33.

- Chen, J., & Dickinson, E. (1999). Effect of surface character of filler particles on rheology of heat-set whey protein emulsion gels. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 12(3-6), 373-381.
- Córdoba, A. L., Deladino, L., & Martino, M. (2013). Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants. *Carbohydrate polymers*, 95(1), 315-323.
- Coviello, T., Matricardi, P., Marianecchi, C., & Alhaique, F. (2007). Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *Journal of controlled release*, 119(1), 5-24.
- Croisier, F., & Jérôme, C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49(4), 780-792.
- Darby, R. (2001). *Chemical Engineering Fluid Mechanics*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Darder, M., Colilla, M., & Ruiz-Hitzky, E. (2003). Biopolymer– clay nanocomposites based on chitosan intercalated in montmorillonite. *Chemistry of Materials*, 15(20), 3774-3780.
- Deladino, L., Anbinder, P. S., Navarro, A. S., & Martino, M. N. (2008). Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*, 71(1), 126-134.
- Elmore, A. R. (2003). Final report on the safety assessment of aluminum silicate, calcium silicate, magnesium aluminum silicate, magnesium silicate, magnesium trisilicate, sodium magnesium silicate, zirconium silicate, attapulgit, bentonite, Fuller's earth, hectorite, kaolin, lithium magnesium silicate, lithium magnesium sodium silicate, montmorillonite, pyrophyllite, and zeolite. *International Journal of Toxicology*, 22, 37-102.
- Espinosa-Andrews, H., Sandoval-Castilla, O., Vázquez-Torres, H., Vernon-Carter, E. J., & Lobato-Calleros, C. (2010). Determination of the gum Arabic–chitosan interactions by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. *Carbohydrate Polymers*, 79(3), 541-546.
- Farris, S., Schaich, K. M., Liu, L., Piergiovanni, L., & Yam, K. L. (2009). Development of polyion-complex hydrogels as an alternative approach for the production of bio-based polymers for food packaging applications: a review. *Trends in food science & technology*, 20(8), 316-332.
- Fayad, S. J., Zanetti-Ramos, B. G., Barreto, P. L., Soldi, V., & Minatti, E. (2013). Morphology of soy protein isolate at oil/water and oil/air interfaces. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24(6), 1012-1017.
- Gao, W., Vecchio, D., Li, J., Zhu, J., Zhang, Q., Fu, V., ... & Zhang, L. (2014). Hydrogel containing nanoparticle-stabilized liposomes for topical antimicrobial delivery. *ACS nano*, 8(3), 2900-2907.
- Gbassi, G. K., Vandamme, T., Ennahar, S., & Marchioni, E. (2009). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. *International Journal of Food Microbiology*, 129(1), 103-105.

- Ginebra, M. P., Traykova, T., & Planell, J. A. (2006). Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review. *Journal of Controlled Release*, 113(2), 102-110.
- Glatter, O., & Gruber, K. (1993). Indirect transformation in reciprocal space: desmearing of small-angle scattering data from partially ordered systems. *Journal of applied crystallography*, 26(4), 512-518.
- Harris, P. (2012). *Food gels*. Springer Science & Business Media.
- Holzwarth, G., & Prestridge, E. B. (1977). Multistranded helix in xanthan polysaccharide. *Science*, 197(4305), 757-759.
- Iijima, M., Shinozaki, M., Hatakeyama, T., Takahashi, M., & Hatakeyama, H. (2007). AFM studies on gelation mechanism of xanthan gum hydrogels. *Carbohydrate polymers*, 68(4), 701-707.
- Kampeerappun, P., Aht-ong, D., Pentrakoon, D., & Srikulkit, K. (2007). Preparation of cassava starch/montmorillonite composite film. *Carbohydrate Polymers*, 67(2), 155-163.
- Kataoka, M. F., Tokunaga, F., & Engelman, D. (1994). AIP Conf. Proc. B. Chanse; J. D. S., Ebashi; D. T., Goodhead; H. E., Huxley, Eds. Clarendon Press: Oxford, 87.
- Kwak, D. H., Yoo, J. B., & Kim, D. J. (2010). Drug release behavior from nanoporous anodic aluminum oxide. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 10(1), 345-348.
- Lapasin, R. Weak gel matrices: rheology and applications. 10.13140/2.1.1057.0888.
- Leal-Calderon, F., Thivilliers, F., & Schmitt, V. (2007). Structured emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 12(4-5), 206-212.
- Leal-Calderon, F., & Schmitt, V. (2008). Solid-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 13(4), 217-227.
- Li, Y., Liu, Y. Z., Long, T., Yu, X. B., Tang, T. T., Dai, K. R., ... & Zhu, Z. A. (2013). Mesoporous bioactive glass as a drug delivery system: fabrication, bactericidal properties and biocompatibility. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(8), 1951-1961.
- Liang, L., Liu, J., & Gong, X. (2000). Thermosensitive poly (N-isopropylacrylamide)- clay nanocomposites with enhanced temperature response. *Langmuir*, 16(25), 9895-9899.
- Liu, K. H., Liu, T. Y., Chen, S. Y., & Liu, D. M. (2008). Drug release behavior of chitosan-montmorillonite nanocomposite hydrogels following electrostimulation. *Acta Biomaterialia*, 4(4), 1038-1045.
- Lobato-Calleros, C., Rodriguez, E., Sandoval-Castilla, O., Vernon-Carter, E. J., & Alvarez-Ramirez, J. (2006). Reduced-fat white fresh cheese-like products obtained from W1/O/W2 multiple emulsions: Viscoelastic and high-resolution image analyses. *Food Research International*, 39(6), 678-685.
- Lobato-Calleros, C., RECILLAS-MOTA, M. T., Espinosa-Solares, T., Alvarez-Ramirez, J., & VERNON-CARTER, E. J. (2009). Microstructural and rheological properties of low-fat

stirred yoghurts made with skim milk and multiple emulsions. *Journal of texture studies*, 40(6), 657-675.

- Lobato-Calleros, C., Sosa-Pérez, A., Rodríguez-Tafoya, J., Sandoval-Castilla, O., Pérez-Alonso, C., & Vernon-Carter, E. J. (2008). Structural and textural characteristics of reduced-fat cheese-like products made from W1/O/W2 emulsions and skim milk. *LWT-Food Science and Technology*, 41(10), 1847-1856.
- Lu, W., Zheng, B., & Miao, S. (2018). Improved emulsion stability and modified nutrient release by structuring O/W emulsions using konjac glucomannan. *Food Hydrocolloids*.
- Madejová, J., Janek, M., Komadel, P., Herbert, H. J., & Moog, H. C. (2002). FTIR analyses of water in MX-80 bentonite compacted from high salinary salt solution systems. *Applied clay science*, 20(6), 255-271.
- Madejová, J. (2003). FTIR techniques in clay mineral studies. *Vibrational spectroscopy*, 31(1), 1-10.
- Matalanis, A., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2012). Inhibition of lipid oxidation by encapsulation of emulsion droplets within hydrogel microspheres. *Food Chemistry*, 132(2), 766-772.
- McClements, D. J. (2010). Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components. *Annual review of food science and technology*, 1, 241-269.
- McClements, D. J., Decker, E. A., & Weiss, J. (2007). Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of food science*, 72(8).
- McMaster, W. A., Wang, X., & Caruso, R. A. (2012). Collagen-templated bioactive titanium dioxide porous networks for drug delivery. *ACS applied materials & interfaces*, 4(9), 4717-4725.
- Mun, S., Kim, Y. R., & McClements, D. J. (2015). Control of β -carotene bioaccessibility using starch-based filled hydrogels. *Food chemistry*, 173, 454-461.
- Oakenfull, D. (1987). Gelling agents. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 26, 1-31.
- Oliver, L., Wieck, L., & Scholten, E. (2016). Influence of matrix inhomogeneity on the rheological properties of emulsion-filled gels. *Food Hydrocolloids*, 52, 116-125.
- Paciotti, G. F., Kingston, D. G., & Tamarkin, L. (2006). Colloidal gold nanoparticles: a novel nanoparticle platform for developing multifunctional tumor-targeted drug delivery vectors. *Drug development research*, 67(1), 47-54.
- Park, H. M., Lee, W. K., Park, C. Y., Cho, W. J., & Ha, C. S. (2003). Environmentally friendly polymer hybrids Part I Mechanical, thermal, and barrier properties of thermoplastic starch/clay nanocomposites. *Journal of Materials Science*, 38(5), 909-915.
- Pereira, F. A. R., Sousa, K. S., Cavalcanti, G. R. S., Fonseca, M. G., de Souza, A. G., & Alves, A. P. M. (2013). Chitosan-montmorillonite biocomposite as an adsorbent for copper (II)

cations from aqueous solutions. *International journal of biological macromolecules*, 61, 471-478.

- Petri, D. F. (2015). Xanthan gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(23).
- Pongjanyakul, T., & Rongthong, T. (2010). Enhanced entrapment efficiency and modulated drug release of alginate beads loaded with drug–clay intercalated complexes as microreservoirs. *Carbohydrate Polymers*, 81(2), 409-419.
- Ramsay, J. D. F., & Lindner, P. (1993). Small-angle neutron scattering investigations of the structure of thixotropic dispersions of smectite clay colloids. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 89(23), 4207-4214.
- Romero-Bastida, C. A., Bello-Perez, L. A., Velazquez, G., & Alvarez-Ramirez, J. (2015). Effect of the addition order and amylose content on mechanical, barrier and structural properties of films made with starch and montmorillonite. *Carbohydrate polymers*, 127, 195-201.
- Saha, D., & Bhattacharya, S. (2010). Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review. *Journal of food science and technology*, 47(6), 587-597.
- Schnitzler, I., Hausen, C., & Klein, C. (2013). *U.S. Patent Application No. 13/639,065*.
- Segad, M., Jönsson, B., & Cabane, B. (2012). Tactoid formation in montmorillonite. *The Journal of Physical Chemistry C*, 116(48), 25425-25433.
- Sherman, P. (1968). *Emulsion Science*. London, Academic Press: 217-351.
- Song, K. W., Kim, Y. S., & Chang, G. S. (2006). Rheology of concentrated xanthan gum solutions: Steady shear flow behavior. *Fibers and Polymers*, 7(2), 129-138.
- Steffe, J. F. (1996). *Rheological Methods in Food Process Engineering*. East Lansing, MI, Freeman Press.
- Tournassat, C., & Appelo, C. A. J. (2011). Modelling approaches for anion-exclusion in compacted Na-bentonite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75(13), 3698-3710.
- Tournassat, C., Bizi, M., Braibant, G., & Crouzet, C. (2011). Influence of montmorillonite tactoid size on Na–Ca cation exchange reactions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 364(2), 443-454.
- Van Vliet, T. (1988). Rheological properties of filled gels. Influence of filler matrix interaction. *Colloid and Polymer Science*, 266(6), 518-524.
- Vasiljevic, D., Parojcic, J., Primorac, M., & Vuleta, G. (2006). An investigation into the characteristics and drug release properties of multiple W/O/W emulsion systems containing low concentration of lipophilic polymeric emulsifier. *International journal of pharmaceutics*, 309(1-2), 171-177.

- Vervoort, S., & Budtova, T. (2005). Shear-induced solvent release from a swollen microgel in the vorticity direction. *Colloid Surf. A Physicochem. Eng. Asp*, 262(1-3), 132-138.
- Viseras, C., Aguzzi, C., Cerezo, P., & Lopez-Galindo, A. (2007). Uses of clay minerals in semisolid health care and therapeutic products. *Applied Clay Science*, 36(1-3), 37-50.
- Wei, Z., Moldowan, J. M., Dahl, J., Goldstein, T. P., & Jarvie, D. M. (2006). The catalytic effects of minerals on the formation of diamondoids from kerogen macromolecules. *Organic Geochemistry*, 37(11), 1421-1436.
- Xiao, C., & Yang, M. (2006). Controlled preparation of physical cross-linked starch-g-PVA hydrogel. *Carbohydrate Polymers*, 64(1), 37-40.
- Zanina, A., & Budtova, T. (2002). Hydrogel under shear: a rheo-optical study of the particle deformation and solvent release. *Macromolecules*, 35(5), 1973-1975.
- Zhang, Z., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2014). Encapsulation, protection, and release of polyunsaturated lipids using biopolymer-based hydrogel particles. *Food research international*, 64, 520-526.
- Zhang, Z., Zhang, R., Tong, Q., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2015). Food-grade filled hydrogels for oral delivery of lipophilic active ingredients: Temperature-triggered release microgels. *Food Research International*, 69, 274-280.

10. Anexos

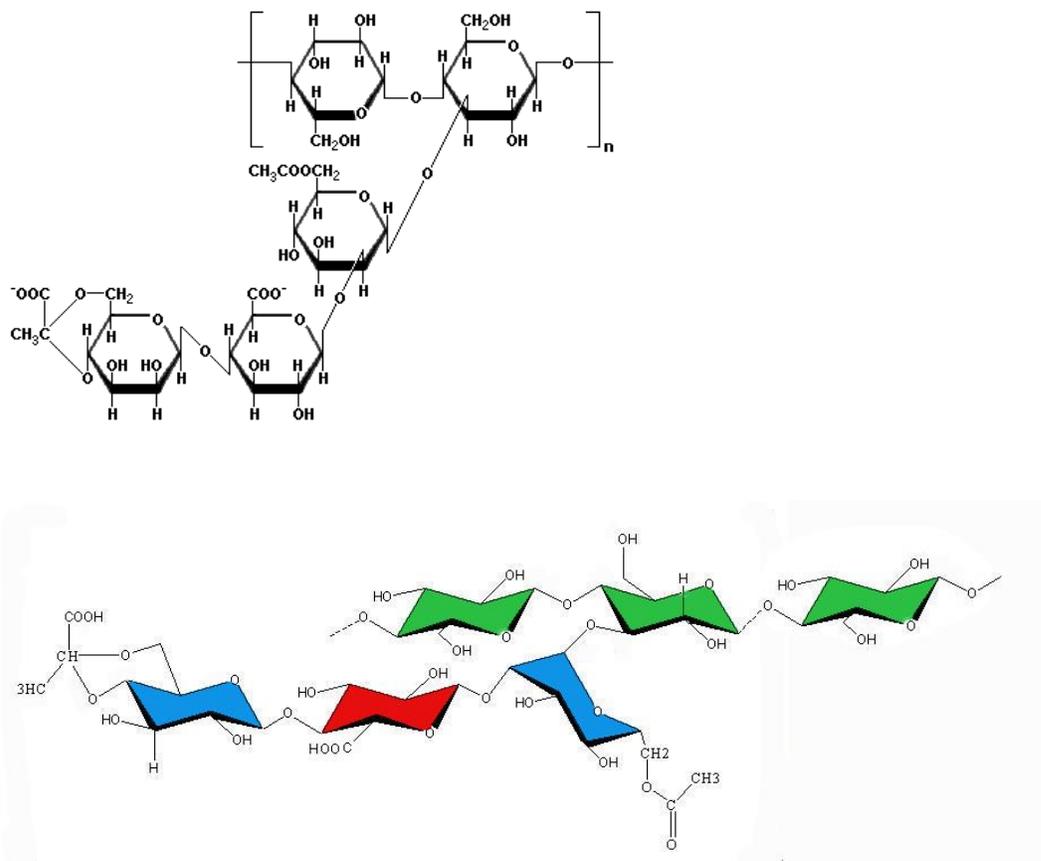
Pruebas de Creep Compliance

La reología de acuerdo a la IUPAC, se define como el estudio del flujo y deformación de la materia bajo la influencia de una fuerza mecánica. Aquellos materiales que presentan propiedades intermedias a las descritas por la Ley de Hooke (para sólidos elásticos) y la Ley de Newton (líquidos viscosos) se les denominan materiales viscoelásticos (Steffe, 1996). Así pues, el término de “viscoelasticidad” hace referencia a la coexistencia de propiedades viscosas y elásticas de un material. Desde este enfoque, un hidrogel es considerado como un material viscoelástico, caracterizado por una contribución elástica (módulo elástico o de almacenamiento, G') y una contribución viscosa (módulo de pérdida o viscoso, G''). La viscoelasticidad de materiales se puede evaluar mediante pruebas estacionarias (rotación angular) y pruebas dinámicas (oscilatorias) (Sherman, 1968).

La prueba de fluencia-relajación (creep compliance), $J(t) = [\text{deformación angular en el tiempo, } \varepsilon(t) / \text{esfuerzo cortante constante } (\tau)]$, es una prueba estacionaria que permite obtener una curva del comportamiento viscoelástico de materiales. Una curva característica del creep-compliance se puede subdividir en tres regiones características: (a) la aplicación de un esfuerzo cortante constante muy pequeño, produce una deformación instantánea del material, caracterizado por un estiramiento elástico de los enlaces. Si la deformación no continúa más allá de este punto, la recuperación del material es completa cuando el esfuerzo cortante es retirado; (b) Una región en donde la deformación del material rebasa el límite elástico, en donde los enlaces se rompen y reforman a distintas tasas, caracterizadas por un tiempo característico de retardo, y por una gama de elasticidades de retardo y viscosidades de retardo; (c) Una región donde la relación la deformación del material es constante, conocida como la relación $\varepsilon(t)/\tau$ Newtoniana, en donde todos los enlaces han sido rotos, y el tiempo requerido para su reformación es mayor que el tiempo de prueba.

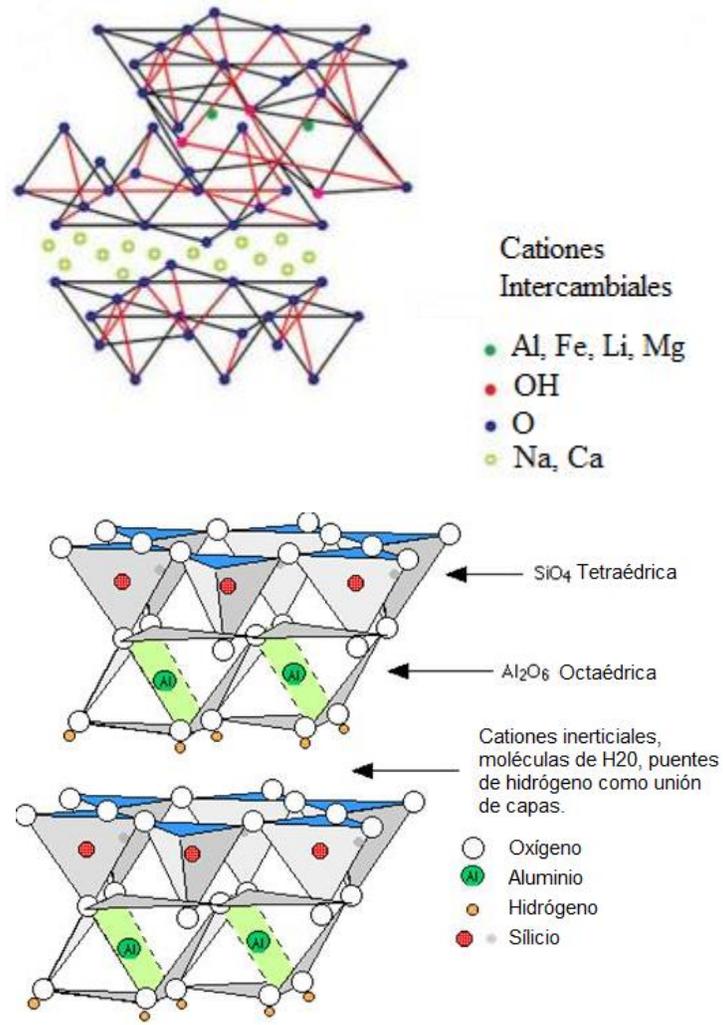
Estructura de la Gomza Xantana y Montmorillonita

Goma Xantana



En verde, unidades de glucosa unidas de la misma forma que en la celulosa, en azul, unidades de manosa, y en rojo, ácido glucurónico.

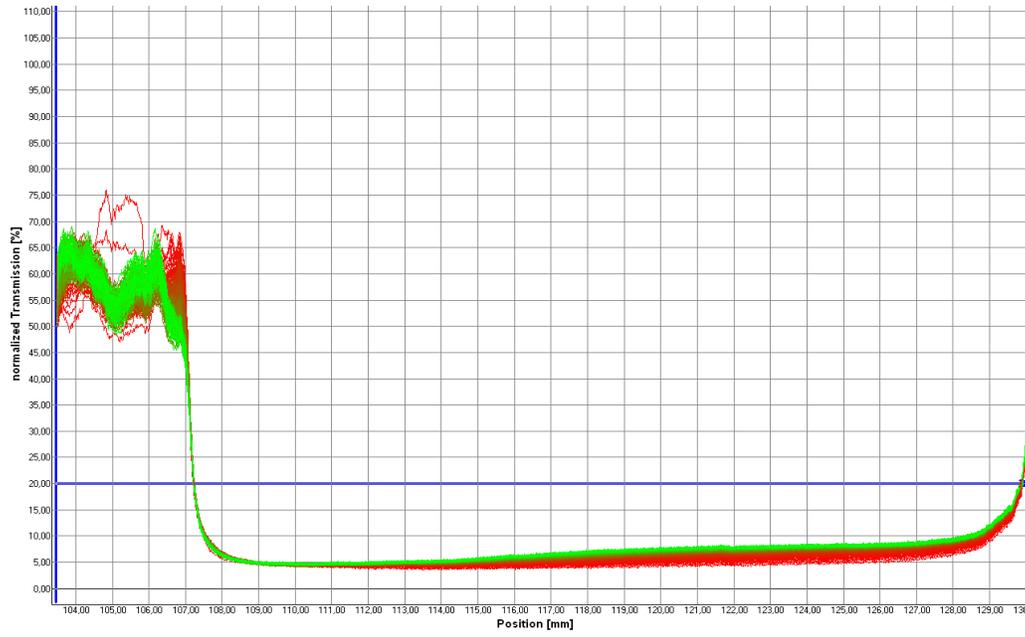
Montmorillonita



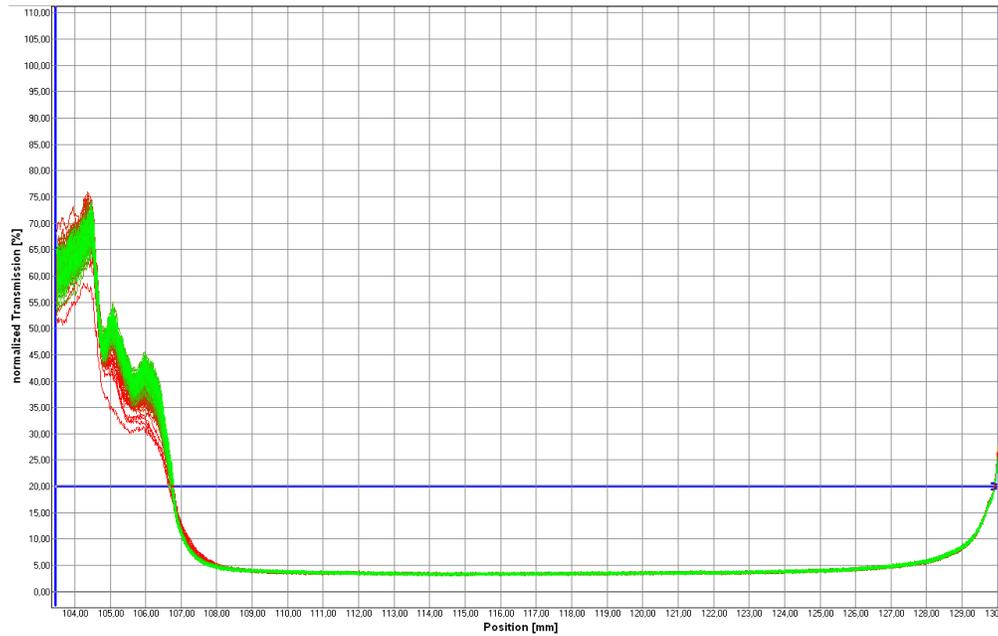
Estructura de la Montmorillonita.

Perfiles de separación de fases, LUMiSizer

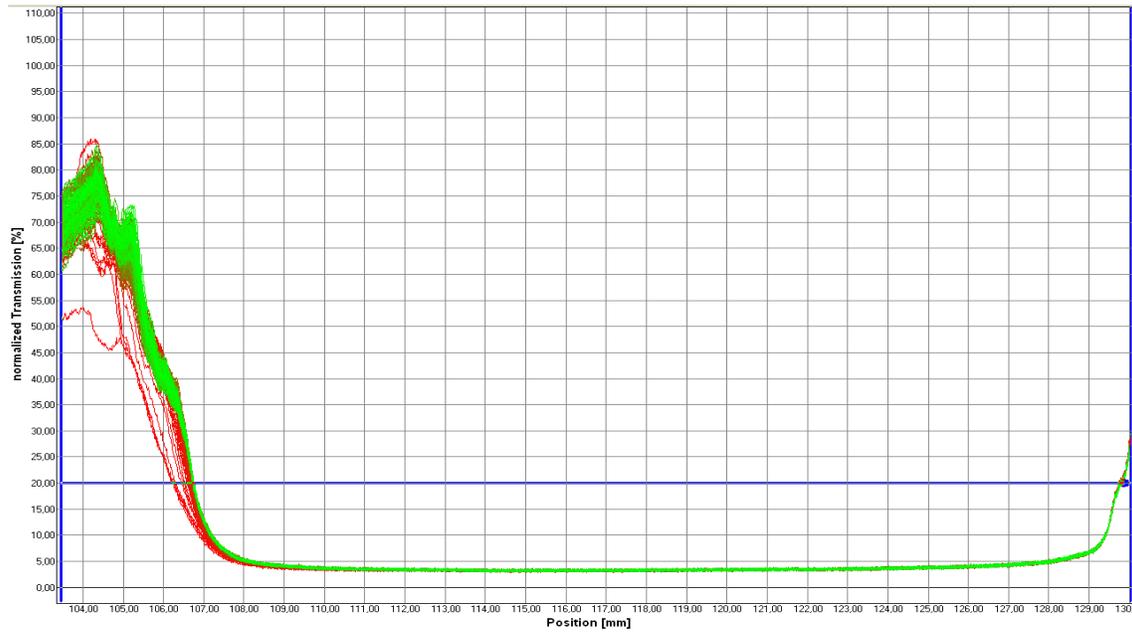
Emulgel E₀



E₁



E4



Effects of clay concentration on the morphology and rheological properties of xanthan gum-based hydrogels reinforced with montmorillonite particles

A. Garcia-Hernandez,¹ C. Lobato-Calleros,² E.J. Vernon-Carter,¹ E. Sosa-Hernandez,³ J. Alvarez-Ramirez¹

¹Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Apartado Postal 55-534, Ciudad de México, 09340, México

²Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, Texcoco, 56230, México

³Instituto Mexicano del Petróleo, Grupo de Evaluación de Riesgo en Ductos, Ciudad de México, 07355, México

Correspondence to: J. Alvarez-Ramirez (E-mail: jjar@xanum.uam.mx)

ABSTRACT: This work presents results of the morphology and rheological properties of xanthan gum (XG)-based hydrogels reinforced by montmorillonite (MMT) particles. The results show that hydrogels exhibit self-supporting characteristics when a critical MTT concentration of approximately 2.0% w/w is used. Wide-angle, small-angle X-ray diffraction patterns and transmission electron microscopy reveal that for concentrations up to about 1.0% w/w the MTT particles are homogeneously distributed and exfoliated in the XG matrix. MTT particles aggregate at higher concentrations, contributing to the formation of junction points leading to hydrogels consolidation. Fourier transform infrared analysis indicates that the mechanism that enables the hydrogels formation might be attributed to hydrogen bonds crosslinking XG molecules with the surface of MTT particles. The storage modulus is higher as MTT concentration increases, but the loss modulus remains practically unchanged. Increasing temperature produces a drop in storage modulus, but the drop is minimized over a wider temperature range, as the MTT concentration is higher. © 2016 Wiley Periodicals, Inc. *J. Appl. Polym. Sci.* 2017, 134, 44517.

KEYWORDS: rheology; swelling; viscosity; viscoelasticity; X-ray

Received 21 June 2016; accepted 28 September 2016

DOI: 10.1002/app.44517

INTRODUCTION

Hydrogels are tridimensional polymeric networks with the ability of retaining large quantities of aqueous solutions. Retention of water molecules within the reticulated polymeric microstructure occurs via chemical and physical interactions. Hydrogels appear as solid-like structures and one of their most interesting properties is their ability of keeping their shape even when the polymer concentration is relatively low (<2% w/w). Additionally, because of their rheological properties, hydrogels have found some applications in a diversity of fields, including the production of food, cosmetics, and biomedical products. Commonly, hydrogels are used as carriers for active compounds, for instance antioxidants in food,¹ cosmetic products for skin care,² antimicrobials for skin treatment,³ among many others.

Hydrogels are commonly based on synthetic polymers with crosslinking agents.⁴ However, the use of synthetic polymers is restricted in food, cosmetics and biomedical applications. The

main limitation relies on biocompatibility, health risk (e.g., toxicity), biodegradability, and sustainability issues. In this regard, natural and modified biopolymers constitute promising alternatives for hydrogels design. Hydrogels have been made from guar gum for antibacterial and dye removal applications,^{5,6} alginate for drug delivery systems,⁷ chitosan for biomedical applications,⁸ and xanthan gum for encapsulation of food juices⁹ and for cell delivery systems.¹⁰

Hydrogels tend to suffer relatively large deformations and to release large amounts of water under the influence of shear.^{11,12} Cross-linking methods have been used for enhancing the integrity of hydrogels.^{11,12} Linear polymer chains can be covalently bound with chemical crosslinking agents.^{13,14} Chemical crosslinking has the drawback of residual fractions of chemical components that pose a risk for human consumption. An alternative is to form physically crosslinked hydrogels.¹⁵ Nevertheless, physically crosslinked hydrogels are fragile with low

mechanical integrity and high degradation rate.¹⁶ In this regard it has been reported that coupled chemical and physical crosslinking can improve mechanical properties and chemical stability.¹⁷ Likewise, the mechanical stability of hydrogels can be improved with the incorporation of passive or active fillers. Passive fillers act only as mechanical reinforcers in the face of shear strains.¹ In contrast, active fillers interact with the hydrogel components via the formation of hydrogen bonds, leading to a further consolidation of the tridimensional network.¹⁸ Agarose–cellulose nanowhiskers,¹⁹ guar gum–clay,²⁰ gelatine–cellulose nanocrystals²¹ are examples of composites made of biopolymers and reinforcing particles. In particular, biopolymer–clay composites have attracted research interest because of their biocompatibility, biodegradability, and bioaccessibility properties.²²

Xanthan gum (XG) a biopolymer commonly used for hydrogels fabrication in pharmaceutical and cosmetic industries. XG is an anionic, high molecular weight, exo-polysaccharide produced by aerobic fermentation of sugars by *Xanthomonas campestris*. Its main chain is made-up of glucose units with added side chains of trisaccharides. The side chain consists of α -D-mannose that contains an acetyl group, β -D-glucuronic acid, and a β -D-mannose terminal unit, linked to a pyruvate group. Its unique properties include high solubility in cold water, stability over a wide range of temperature and pH conditions, resistance to enzymatic degradation, non-toxicity, biocompatibility, degradability, readily available, and relative low cost.²³ The use XG for the formation of hydrogels for drug and actives delivery is an ongoing research topic that has attracted much attention. However, XG does not form true gels at any concentration or temperature.²⁴ Interestingly, when concentrated aqueous systems of locust bean gum, a galactomannan exhibiting a behavior typical of hypertangled macromolecular solutions, and XG whose flow and viscoelastic properties correspond to those of tenuous weak gel networks, are mixed together, true thermoreversible gels are formed.²⁵ An important goal of drug delivery is to obtain a constant release rate for a prolonged time. A problem common to all hydrogels is that the responsiveness and reversibility will decrease under the effect of several environmental factors encountered during their manipulation and application. The incorporation of an inorganic nano- or micro-phase is an attractive alternative for producing inorganic-organic nanocomposite hydrogel.²⁶ In this regard, montmorillonite (MTT) is a suitable alternative as reinforce for biopolymer-based hydrogels. MMT is a member of the smectite group (i.e., a 2:1 clay), and is a layered silicate, made up by two tetrahedral sheets of silica sandwiching a central octahedral sheet of alumina. The particles are plate-shaped with an average diameter around 1.0 μm and a thickness of 9.6 nm. MTT has been found to improve the mechanical properties of synthetic and natural polymer hydrogels, which is a weak point of these systems.^{26–28} Furthermore, the swelling and rheological properties of hydrogels can be tuned by adjusting the nature and quantities of each component, in order to increase the number of interactions. As a rule, fewer interactions will lead to a softer gel while a higher number of interactions will give a tighter and stiffer gel.²⁹ Thus, an interesting proposal worth pursuing is to establish if the addition of inorganic particles, that is, montmorillonite, to

non-gelling biopolymer dispersion, that is, xanthan gum, will promote the formation of hydrogels with suitable properties.

Based on these premises, the aim of this work was to evaluate if the incorporation of MTT particles to XG dispersion: (a) induced hydrogel formation, (b) the effects of different montmorillonite levels on the shear, dynamic, and temperature rheological response of the hydrogels. By doing this, it is expected that valuable insights are gained regarding the underlying phenomena leading to the structural consolidation of these nanocomposite systems.

EXPERIMENTAL

Materials

Xanthan gum (XG; Product #G1253; from *Xanthomonas campestris*; Brookfield viscosity of 800–1200 cps for 1% w/w solution) and montmorillonite K10 (MT; Product #281522; surface area of 220–270 m^2/g ; density of 2.3–2.5 g/cm^3) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO). All water used in the experiments was double distilled and deionized (DDW).

Preparation of Xanthan Gum-Montmorillonite Hydrogels

By separate XG (2.0% w/w) and MTT particles (0, 1.0, 2.0, 4.0, and 8.0% w/w) were dispersed in DDW, with continuous stirring for 12 h at room temperature to allow complete hydration of the powders. Afterward XG and MTT dispersions were mixed in a 1:1 volume ratio using continuous stirring (15.0 min). To avoid MTT aggregation, the dispersions were sonicated (Sigma Ultrasonic Processor, GEX60, Loveland, CO) at 48 W, 24 kHz, flat head probe, for 2.0 min. Subsequently, the dispersions were left to stand at room temperature for 2.0 h for hydrogels formation to occur. All the hydrogels had a XG concentration of 1.0% w/w, and MTT concentrations of 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, and 4.0% w/w, and were coded as H_x , where the subindex “x” denotes the MTT content. Some experimental determinations require the use of dry samples. Thus, when required, hydrogel samples were dried at 45 °C for 48 h.³⁰

Characterization

Wide-Angle X-ray Diffraction (WAXD). Hydrogels WAXD patterns were measured at room temperature with a Siemens D-5000 diffractometer (Karlsruhe, Germany) using $\text{Cu K}\alpha$ radiation ($k = 1.543$) and a secondary beam graphite monochromator was operated at 40 kV and 30 mA. Intensities were measured in the 5–50° range with a 0.03° step size and measuring time of 2.0 seconds per point.

Small-Angle X-ray Scattering (SAXS). A Kratky camera (Rigaku Ltd., Tokyo, Japan) coupled to a copper anode tube was used to measure the SAXS curves. The distance between the sample and the linear proportional counter was 25 cm, and a Ni filter selected the copper $\text{K}\alpha$ radiation. The intensity $I(h)$ was measured for 9 min to obtain good-quality statistics. A thin film of each hydrogel was placed in front of the X-ray beam that was scattered in the transmission geometry. The SAXS data were processed using the ITP program,³¹ where the angular parameter h is defined as

$$h = 4\pi \sin(\theta) / \lambda \quad (1)$$

where 2θ and λ are the X-ray scattering angle and the wavelength, respectively. The infinite slit height approximation was

used to analyze the data. For this study, the background obtained with the Porod plot was subtracted from the experimental intensity. The fractal dimension was estimated from the slope of $\log(I(h))$ against $\log(h)$. The globular, fibrous or layered shape of the scattering objects can be estimated from the Kratky plot $h^2I(h)$ versus h .³²

Transmission Electron Microscopy. The morphology and possible aggregation of the XG-MT hydrogels was characterized using transmission electron microscopy (TEM) (JEOL JEM-2100, Tokyo, Japan) operated at 200 kV. Samples for TEM analysis were sectioned with an ultra-microtome (RMC, model MTXL, Boeckeler Instruments, Tucson, AZ) to 80 nm thick slices.

ATR-FTIR Spectroscopy. Fourier Transform Infrared (FTIR) spectra were obtained using a Perkin Elmer spectrophotometer (Spectrum 100, Perkin Elmer, Waltham, MA) equipped with a crystal diamond universal ATR sampling accessory. The mirror velocity was 0.4 cm/s. Before each measurement, the ATR crystal was carefully cleaned with ethanol. During the measurement, the sample was in contact with the universal diamond ATR top-plate. A spectrum of the empty cell was used as background. The spectrum of water was subtracted from all hydrogels spectra in order to remove the distorting effect of water in the region 4000–400 cm^{-1} . For each sample, the spectrum represented an average of three scans with 1 cm^{-1} resolution. Also, spectra were baseline-corrected at 1200–900 cm^{-1} by drawing a straight line. In this case, the assumed line shape was Lorentzian with a half-width of 15 cm^{-1} . The resolution enhancement factor was set at 1.5.

Rheology. A Kinexus pro+ rheometer (Malvern Instruments, Ltd., Malvern, Worcestershire), with a cone-plate geometry, in which the cone had a diameter of 50 mm, cone angle of 2°, and a gap of 0.07 mm, was used to determine the rheological properties of the composite hydrogels. The sample (about 1.6 mL) carefully placed in the measuring system, and left to rest for 5 min at room temperature for structure recovery. Low viscosity silicone oil was used to reduce water evaporation during rheological tests. The following tests were performed: (a) amplitude sweeps 0.1–1000 strain% at 1 Hz; (b) temperature sweeps from 25 to 90 °C with a heating ramp of 5 °C/min at 1 Hz; (c) flow curves with shear rate sweeps from 0.001 to 1000 s^{-1} and backward; and (d) creep-compliance-time studies by applying a constant small shear stress of 4.0 MPa and then withdrawn for determining compliance recovery. All the measurements were performed at 25 °C. The pertinent rheological parameters were obtained from the equipment software (rSpace) in all cases.

Statistical Analyses

All quantitative data were expressed as means \pm standard deviation. Statistical analysis of the hydrogels experimental data was performed by analysis of variance using the Statgraphics 7 statistical analysis system (Statistical Graphics Corp. Manugistics Inc., Cambridge, MA). When it was pertinent, significant differences ($p \leq 0.05$) between means were detected with Tukey's test. All the experiments were done in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows images of XG alone (H_0) and XG-MT dispersions ($H_{0.5}$ – H_4) in inverse position. The xanthan gum dispersion at 1% w/w (H_0) flowed under the gravitational force, indicating that it was unable to support its own weight. It is well known fact that XG does not form hydrogels on its own.³³ The addition of a relative low amount of MTT (0.5% w/w) particles to the XG dispersion ($H_{0.5}$) did not endow the dispersion with the ability to support its own weight. However, the incorporation higher MTT concentrations (1, 2, and 4% w/w) to the XG dispersion resulted in the formation of hydrogels (H_1 , H_2 , and H_4) with self-supporting ability under gravitational force, and where syneresis was not observed for a period of up to 30 days. These results indicate that the addition of MTT particles above a certain critical concentration contributed to the consolidation of the XG structure, changing its behavior from a high viscous flowing dispersion to a self-supporting hydrogel structure. In this regard, an interesting question is to try to pinpoint the mechanisms involved for the consolidation of XG dispersions by MTT particles addition. In experiments using silicate at concentrations as high as 4% w/w, it was found that XG dispersions exhibited viscous flow. It is apparent that silicates are inert particles that act only as passive fillers within the XG matrix, and that the role-played by the MTT particles is rather that of active fillers. To delineate a possible explanation of the XG-MT interactions, let us consider the following. MTT particles display Brønsted and Lewis acidity, with a Hammett acidity function of -6 to -8 .³⁴ This means that MTT particles are a source of protons when immersed within the XG dispersion, involving dehydration and ester linkages formation between XG chains. On the other hand, the MTT particles, present a high surface area with cations on their surface, which have the ability to complex with polar compounds.³⁵ Bueno *et al.*³⁰ reported that the presence of citric acid turned the XG dispersions more rigid and stable, due to crosslinking effects of XG chains at pyranyl, acetyl, and OH groups. This suggests that MTT particles acted as proton donors producing a crosslinking effect between the XG molecules and the surface of the MTT particles. In turn, this crosslinking effect endowed the XG dispersions with self-supporting gel structural consolidation, as those displayed by H_1 , H_2 , and H_4 (Figure 1). In this way, the MTT particles can be considered as heterogeneous crosslinking agents, mainly via hydrogen bonding, between the XG moieties and the surface of the MTT particles. After protolytic equilibrium was achieved between the XG chains and the MTT, the particles (clay platelets) acted as a node (involving possibly electrostatic interactions) providing further stability to the hydrogel network. In other words, after the crosslinking, the XG molecules and the MTT particles formed junction points, that enabled the formation of a reticulated gel microstructure with high water-binding capacity.³⁵

Wide-Angle X-ray Diffraction (WAXD)

WAXD was used in order to gain insights regarding the XG-MT interactions. Figure 2(a) shows the WAXD pattern for the MTT particles dispersion. The diffraction pattern shows a strong peak at $2\theta = 5.93^\circ$, corresponding to a basal spacing of ≈ 10 Å. This diffraction peak is absent in $H_{0.5}$ and H_1 , suggesting that the

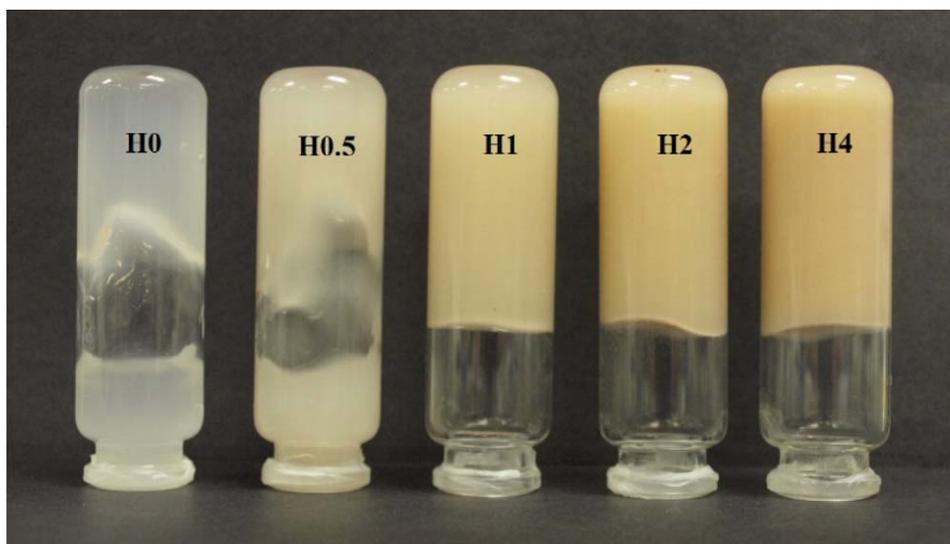


Figure 1. Images of the xanthan gum-montmorillonite hydrogels in inverted position. The dispersion containing only XG did not produce a real hydrogel. The addition of small amounts of MTT particles did not lead to self-supporting hydrogels ($H_{0.5}$; H_1). The addition of MTT particles in higher concentrations yielded self-supporting hydrogels (H_2 , H_4). [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

clay particles are exfoliated and homogeneously dispersed within the XG microstructure. It has been reported that immersion of low clay concentrations in water solutions renders the clay completely dispersed in the form of single sheets.³⁶ The WAXD pattern for H_2 and H_4 exhibited a diffraction peak at the same 2θ value. Branca *et al.*²⁰ studied guar gum-MT hydrogels, obtaining similar WAXD patterns, where no intercalation occurred between the biopolymer chains and the clay particles. This is in line with results stating that polysaccharides with coiled or helicoidal structures (as is the case of xanthan gum) can only be adsorbed on the external surface of the clay.³⁷ Figure 3(a) presents the TEM micrograph of $H_{0.5}$ showing that MTT are dispersed and exfoliated. Exfoliation is also observed in H_1 , although isolated aggregates can be seen [Figure 3(b)]. Aggregates of MTT particles are observed for higher concentrations, as shown by Figures 3(c,d) for H_2 and H_4 , respectively. Following the arguments of Branca *et al.*²⁰ and the results in Figures 2 and 3, it can be suggested that at lower concentrations (up to 1.0%) the MTT layers are fully and uniformly dispersed and exfoliated within the XG biopolymer matrix, whereas at higher concentrations MTT is present as composite-tactoids.

Small-Angle X-ray Scattering (SAXS)

Figure 4 presents the Kratky plot for the pure xanthan gum dispersion (H_0), and for illustrative cases of XG-MT hydrogels ($H_{0.5}$ – H_4). The trend of the Kratky plot for H_0 increases linearly with the intensity q , indicating that the XG molecules behave as rod-like objects homogeneously dispersed in the water medium. This is in line with the results by Holzwarth and Prestridge,³⁸ who showed that xanthan gum is a stiff rigid rod-like molecule. The addition of MTT particles led to a departure from the linear increasing tendency. Indeed, the Kratky plot achieved an asymptotic value for large values of the intensity q , suggesting the presence of Gaussian coils. MTT particles formed aggregates with size and shape following a Gaussian distribution. The effect was more accentuated as the MTT concentration was

increased. Figure 5 presents the fractal dimension obtained from SAXS analysis. The increase of the fractal dimension from about 1.74 for H_0 to about 2.0 for H_2 and H_4 suggests the formation of ordered aggregates (i.e., small clusters of clay platelets known as tactoid phases). In these tactoids, the platelets are

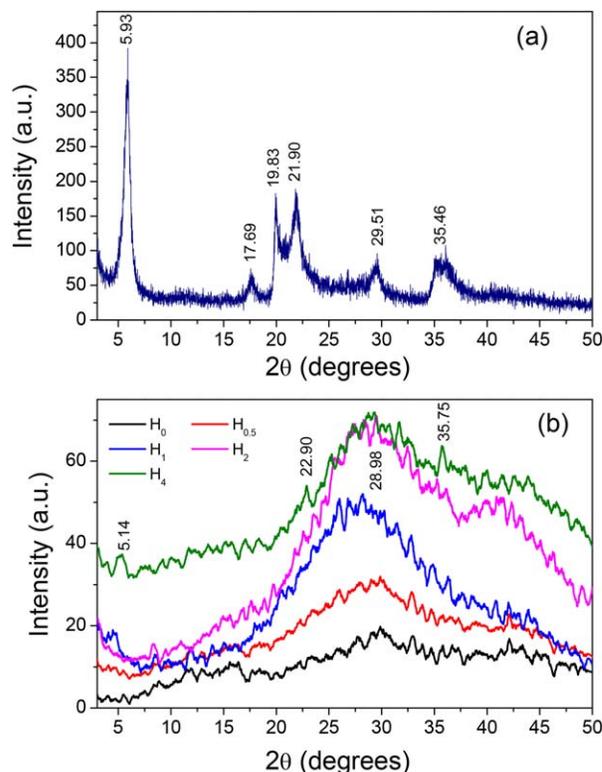


Figure 2. (a) Wide-angle X-ray diffraction (WAXD) of the MTT dispersion. (b) WAXD pattern of the xanthan gum-MT hydrogels. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

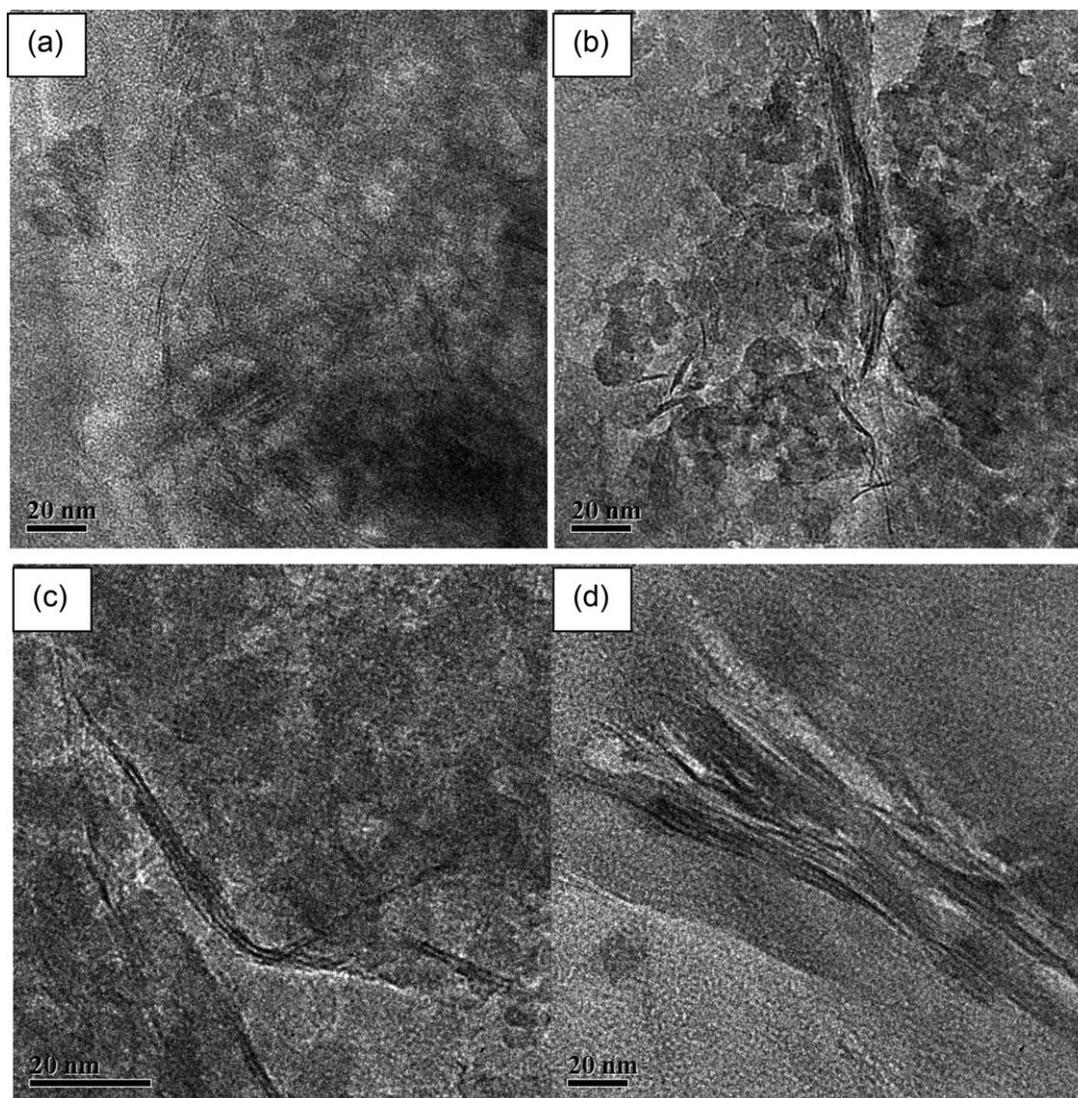


Figure 3. TEM micrographs of hydrogels: (a) $H_{0.5}$, (b) H_1 , (c) H_2 , and (d) H_4 .

arranged parallel to each other with a constant spacing of about 1 nm,³⁹ producing the effect of large 2D arrangements.

ATR-FTIR Spectroscopy

Figure 6(a) shows the spectral variations of the XG dispersion (H_0) in the region of 3750–500 cm^{-1} . The bands in the range 1100–920 cm^{-1} are characteristic of polysaccharides, with the peaks linked to CO/CC bond stretching. The band at 1600 cm^{-1} is characteristic of a carboxylate group. The peaks at 1084–1028 cm^{-1} are characteristic of anhydroglucose ring. The peaks at 1410–1404 cm^{-1} can be attributed to OH bending. The peak at 1645 cm^{-1} is caused by bound water. The band at 2932–2928 cm^{-1} is related to C–H stretching. The broadband at 3420–3434 cm^{-1} is due to hydrogen bonding to hydroxyl group (O–H) and is linked to the complex vibrational stretching, associated with free, inter-, and intramolecular bound hydroxyl groups.

Figure 6(a) also exhibits the spectra of MTT particles dispersion without xanthan gum. Some characteristic bands can be

described as follows.^{40,41} The peak at 3620 cm^{-1} is due to complex vibrational stretching of OH groups of water molecules weakly hydrogen bonded to the Si–O surface. The band at about 3450 cm^{-1} is attributed to symmetric $\nu_1(\text{O–H})$ stretching vibration of H-bonded water. The peak at 1634 cm^{-1} can be attributed to $\nu_2(\text{H–O–H})$ bending vibrations. The peak at 914 cm^{-1} can be due to Al–OH–Al bending vibration. The peak at 525 cm^{-1} is linked to Si–O–Al (IV) vibrations modes. The Si–O stretching vibrations correspond to the large peak at 1020 cm^{-1} .

Figure 6(b) presents the spectra of illustrative XG-MT hydrogels ($H_{0.5}$, H_1 , H_2 , H_4). The intensity of the band at 3300 cm^{-1} diminished with the addition of MTT, indicating a reduction of the bound water. The peak at 1380 cm^{-1} shifted to about 1420 cm^{-1} , which reflects changes in the xanthan alkane (–C–H) bending. The peak at 1015 cm^{-1} for H_0 shifted to 987 cm^{-1} for H_4 , which can be attributed to bonds formed between XG moieties and the MTT surface at the Al–OH–Al regions. The peaks at 786 and 512 cm^{-1} are characteristic of

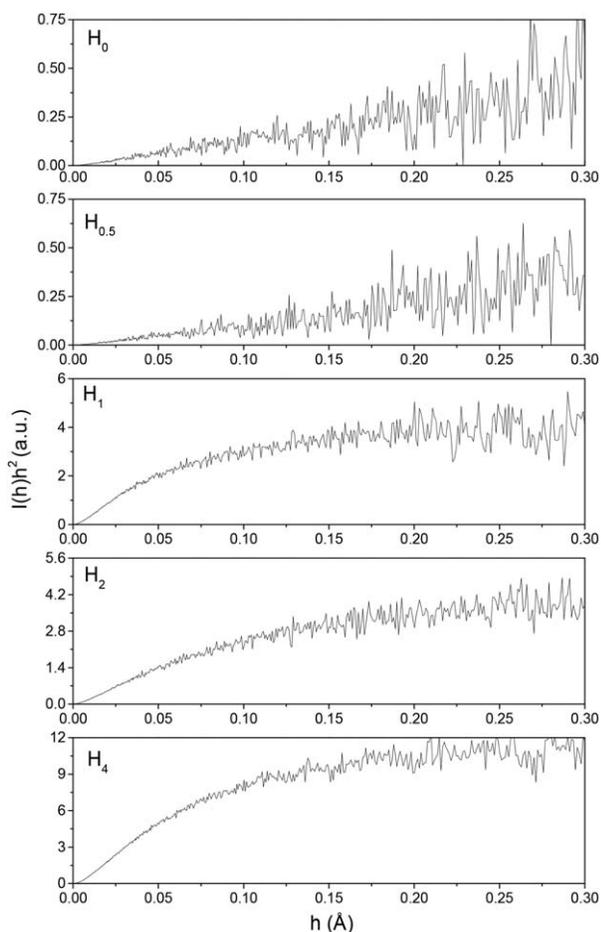


Figure 4. Kratky plots for the XG-MT hydrogels.

MTT. Overall, the results in Figure 6(b) indicated that the MTT acted as active filler by interacting with the xanthan gum molecules. Such interactions may be due to the acid nature of MTT particles, which provide protons that modify the xanthan gum molecules.

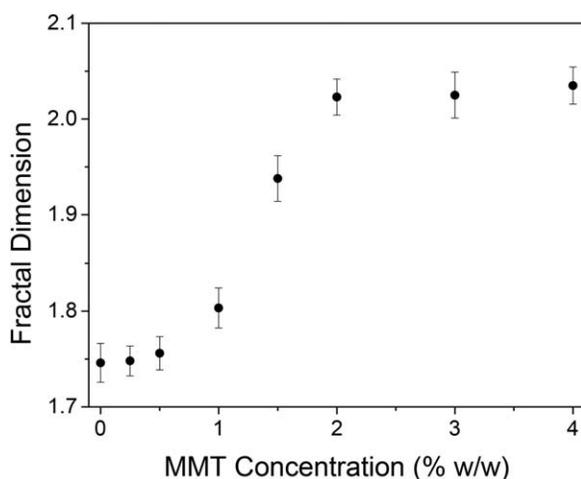


Figure 5. Fractal dimension obtained from SAXS data of MTT aggregates in the XG dispersions.

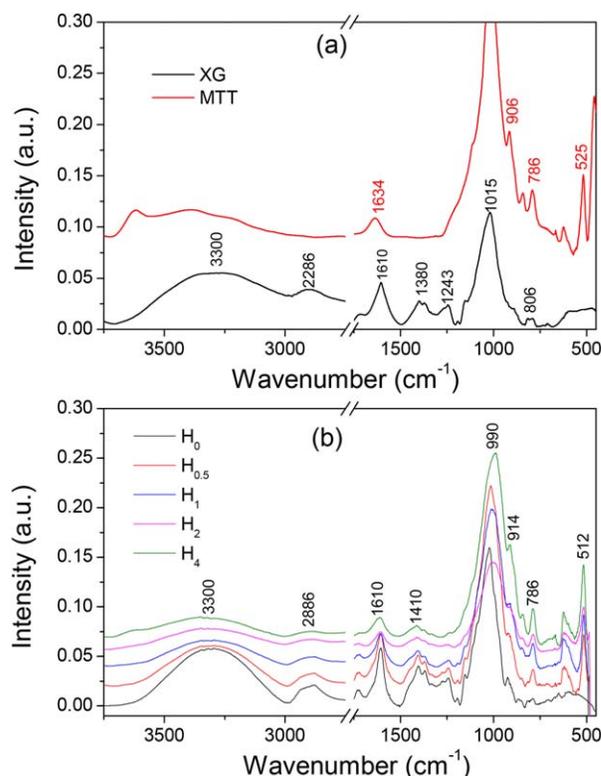


Figure 6. (a) FTIR spectra of XG and MTT dispersions in the range from 3750 to 500 cm^{-1} . (b) FTIR spectra of the XG-MT hydrogels. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Rheology

Flow Curves. Figure 7(a) shows the backward and forward flow curves (shear stress vs. shear rate) of the different hydrogels. H_0 exhibited irreversibility as the backward curve was below the forward curve. The decrease of the shear stress in the backward direction can be due to the alignment of the coiled xanthan gum molecules along with the flow direction. In fact, the forward curve can be considered as a pre-shearing treatment of the XG dispersion, such that the backward scanning exhibited a lower resistance to the flow. This suggests that MTT particles were easily aligned along the flow direction at high shear rates, while exhibiting a disordered distribution at relatively low shear rate values. The apparent viscosity of the hydrogels at the shear rate of 1.0 s^{-1} is shown in Figure 7(b). The addition of MTT had a great effect on the apparent viscosity of the hydrogels, which was significantly increased. The apparent viscosity of H_4 doubled that of H_0 , indicative of the microstructure strengthening induced by the MTT particles. Actually, for a given shear rate value the apparent viscosity can be described by an exponential function

$$\eta_{app} = \eta_{app,0} + K \exp[-([MT] - [MT]_0)/\tau] \quad (2)$$

where K and τ are constants dependent of the shear rate, and $[MT]$ is the MTT concentration. This means that relatively small amounts of MTT generate a large change of the apparent viscosity. For comparison, Figure 7(b) also shows the apparent viscosity of hydrogels with inert silicate particles. The apparent viscosity is similar to that of the dispersion for low

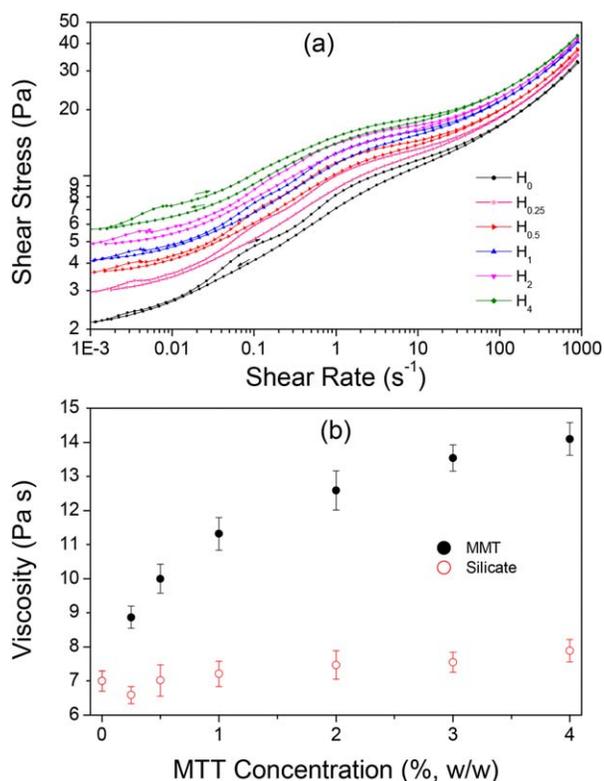


Figure 7. (a) Forward and backward flow curves of the XG-MT hydrogels. (b) Apparent viscosity at 1.0 s^{-1} as function of the MTT concentration. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

concentration of MTT particles, suggesting that the MTT particles act as agents that modify the dispersion microstructure.

Oscillatory Shear Strain Sweep. Figure 8(a) presents the strain sweep rheological response of the hydrogels. The viscoelastic linear region (LVR) for G' and G'' occurred from 0.1% to about 20% for all the hydrogels, with G' predominating over G'' values. The critical shear strain γ_c , where hydrogel structure breakdown onset began to occur, was about 30% in all cases. This means that MTT concentration did not affect the extent of the LVR. However, MTT concentration had a significant effect on the magnitude of the G' values in the LVR [Figure 8(b)]. The G' values were significantly higher as MTT concentration increased, indicative that the XG-MT hydrogels elasticity was increased and the structure consolidated, probably due to MTT particles acting as junction points where XG molecules adsorbed. A fast transition of storage modulus in the low concentration range (from 0.0 to 0.5% w/w) occurred. A possible explanation for this effect is that MTT particles are well dispersed and exfoliated at low concentrations, which maximizes the reinforcement effects. As the MTT concentration is increased, aggregates are formed (as shown by TEM micrographs in Figure 3), producing a more gradual increase of the hydrogel elasticity. On the other hand, the magnitude of G'' remained nearly constant at about 11.0 Pa, indicative that dissipation was probably dominated in the XG molecules dispersed in the bulk phase. Finally, a crossover between G' and G'' occurred at about 100% strain in the nonlinear viscoelastic

region (n-LVR), indicative of the high structural stability of the hydrogels that were able to withstand a great degree of deformation before the viscous properties superseded the elastic properties.

Oscillatory Shear Temperature Sweep. Structural (mechanical) stability in the face of temperature changes is a desirable feature of commercial hydrogels. The key point is that the hydrogel microstructure should withstand deformation despite fluctuations in temperature. Figure 9(a) presents the results of the temperature sweep (1 Hz; 25–90 °C). All the hydrogels showed a decrease in their viscoelastic moduli as temperature increased. This decrease was characterized by two different distinctive regions: (i) an initial gentle decreasing slope region, where viscoelastic moduli remained almost without change, followed by (ii) a pronounced decreasing slope region, where viscoelastic moduli decreased drastically. The xanthan gum hydrogel (H_0) showed the lowest G' and G'' values, exhibiting a sharp decline of the elastic properties (reflected by the storage modulus G') for temperatures higher than 36 °C. This means that the xanthan dispersion is quite unstable for even moderate temperatures, as the XG coiled molecules increase their kinetic energy to produce a disorganized microstructure. Under these conditions, the system is unable to retain the water, leading to the breakdown of the colloidal dispersion. The incorporation of MTT particles improves the stability of the XG hydrogels as reflected by an increase of the critical temperature at which the

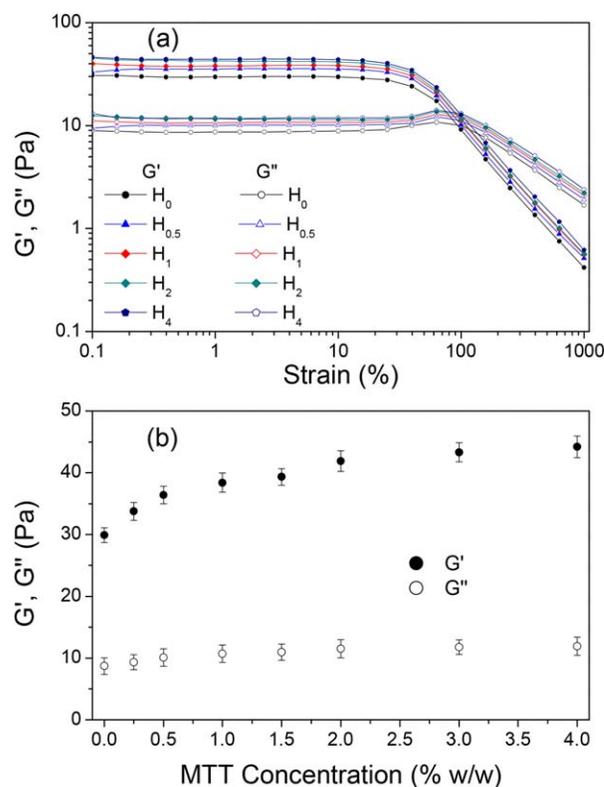


Figure 8. (a) Strain sweep oscillatory tests for the XG-MT hydrogels. (b) Storage (G') and loss (G'') moduli in the linear viscoelastic region as function of the MTT concentration. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

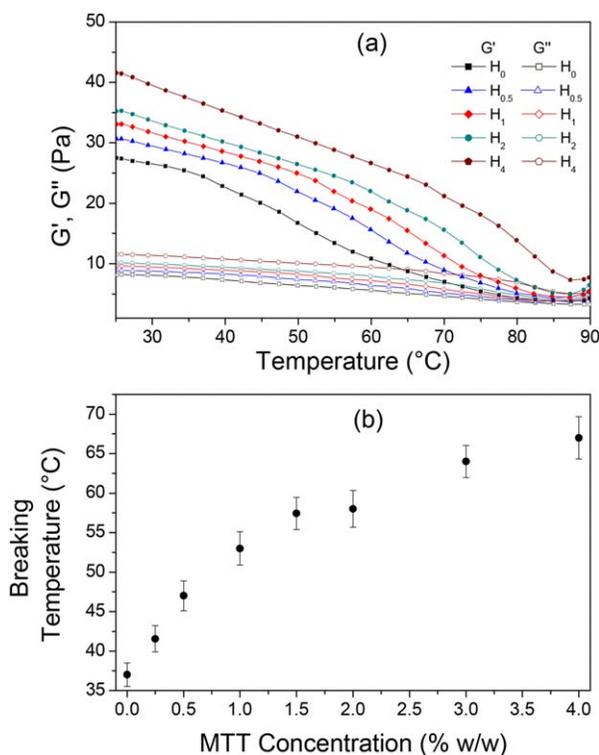


Figure 9. (a) Temperature sweep oscillatory tests for the XG-MT hydrogels. (b) Critical temperature as function of the MTT concentration, where drastic structure deformation onset commences. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

system exhibits a fast decay of the viscoelastic moduli. The linking of the xanthan gum molecules to the surface of the MTT particles improved the elasticity of the hydrogels, so that only slight detriments of the tridimensional hydrogel network occurred. Figure 9(b) presents the critical temperature as function of the MTT concentration. The critical temperature rose exponentially with the MTT concentration. The critical temperature above which the H_4 hydrogel began to suffer the onslaught of severe structural breakdown was of about 65 °C.

Creep Compliance Tests. The hydrogels exhibited typical creep compliance–time curves when subjected to a constant small shear stress [Figure 10(a)], was characterized by three regions. (a) a region of instantaneous elastic compliance where the bonds of the hydrogel are stretched elastically; (b) a region of retarded elastic compliance, in which bonds break and reform; and (c) a region of Newtonian compliance, when bonds have been ruptured, and the time required for them to reform is larger than the test period. The instantaneous elastic compliance [Figure 10(b)], which is defined as the inverse of the instantaneous elasticity ($J_0=1/E_0$), values were lower (elasticity values higher) as the MTT concentration increased. A characteristic fourth region can emerge in the creep–compliance–time curves, when the shear stress is withdrawn and strain does not continue. This fourth region provides a measure of the ability of a material to recover some structure after the removal of the applied stress. Figure 10(b) shows that structure recovery percentage was higher as the MTT concentration increased, while

Figure 10(c) shows that the mean retardation time constant (τ) estimated from the exponential fitting of the creep dynamics was a decreasing function of the MTT concentration. The parameter τ can be considered as the time it takes bonds to reform after the stress removal. Both the recovery percentage and the retardation time constant data, provide further evidence that MTT particles contribute to enhance the viscoelastic properties of the hydrogels.

Comparison with Similar Systems. MTT particles have been used in starch composites to improve mechanical and barrier properties.⁴² MTT particles also enhance the wettability and water adsorption properties.⁴³ The order of addition of particles and plasticizer affect to a large extent the properties of the biofilms.^{43,44} As intended in this work, the role of MTT particles is to produce self-supporting hydrogels. To achieve this task, about 2.0% w/w concentration of MTT particles suffices for the case of the XG-based hydrogels. In contrast, starch-based hydrogels require higher concentrations particles of approximately 10–15% w/w. This indicates that the physical and chemical mechanism underlying the hydrogel consolidation depends of the bio-polymer nature. This work postulated that MTT contributes to XG crosslinking thanks to the acidic nature of the clay particles. However, it is not clear whether this mechanism is taking place in starch-based hydrogels. The main problem is that this type of films incorporates plasticizers, which might mask the contribution of the MTT particles. In general, it assumed that MTT particles act as passive fillers that infringe mechanical stability in the face of shear actions. It has been shown that the plasticizer

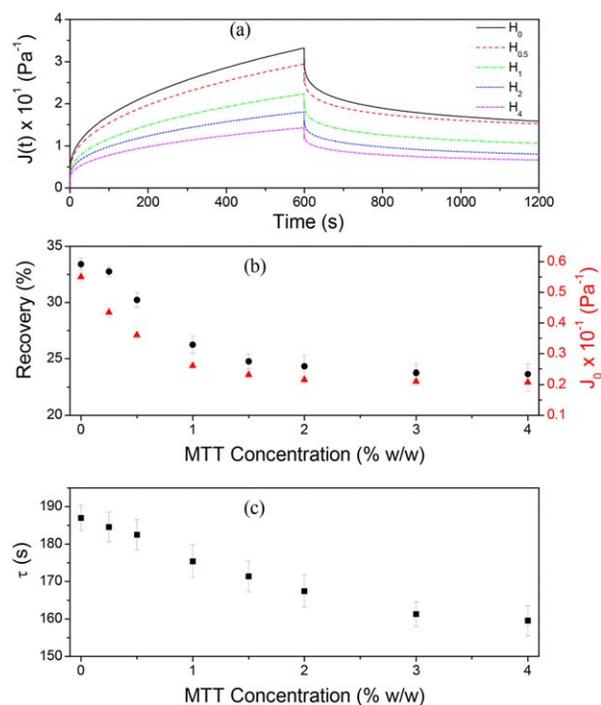


Figure 10. (a) Creep compliance dynamics of the XG-MT hydrogels. (b) Creep recovery percentage after stress removal as function of the MTT concentration. (c) Relaxation time-constant estimated by fitting the creep data with an exponential decay function. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

produces MTT aggregation, even for relatively low clay concentrations.⁴⁵ Chitosan-based composites with MTT particles have been also reported for pharmaceutical and biomedical applications, as well as for heavy metal removal.⁴⁶ In this case, although MTT particles improve hydrogel consolidation, crosslinking agents (e.g., penta sodium tripolyphosphate) have been considered to improve mechanical stability. Results have shown that the incorporation of a synthetic polymer (e.g., polyester) affects positively the mechanical and adsorption properties of biocomposites.⁴⁷ Overall, the results suggest that the mechanisms involved in hydrogel stabilization by the addition of MTT particles are not clear at all. Although many reports consider the MTT particles as passive fillers, some results (e.g., FTIR) suggest that the acidic nature of this nanoclay might play an important role in hydrogel stability.

CONCLUSIONS

The results in this work showed that the MTT concentration in XG-based hydrogels has important effects on the rheological and microstructural properties. X-ray diffraction patterns and TEM micrographs indicated that at low MTT concentrations, the particles are homogeneously dispersed and exfoliated. At MTT concentrations of about 2% w/w and higher, the particles form aggregates. SAXS and FTIR results indicated that the MTT particles acted as junction points to which XG molecules linked mainly through hydrogen bonds. The importance of these results relies on the fact that XG on its own is not able to form real hydrogels, but the incorporation of MTT particles at a critical concentration induces the formation of self-supporting hydrogels. Specifically, the results indicated that 2.0% w/w of MTT concentration is sufficient to obtain a consolidated hydrogel. From a practical standpoint, the results in this work suggest that MTT concentration can be used as a design parameter to tune up the rheological and swelling properties of XG-based hydrogels. For instance, hydrogels for skin applications require high elasticity to form thin films, which can be obtained by using relatively low MTT concentrations. In contrast, hydrogels for pharmaceutical applications might require high stability in the face of shear effects, which can be induced by using high MTT concentrations.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) of Mexico for partially financing this work through project 236500.

REFERENCES

1. López Córdoba, A.; Deladino, L.; Martino, M. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *95*, 315.
2. Schnitzler, I.; Hausen, C.; Klein, C. Google Patents **2013**.
3. Gao, W.; Vecchio, D.; Li, J.; Zhu, J.; Zhang, Q.; Fu, V.; Li, J.; Thamphiwatana, S.; Lu, D.; Zhang, L. *ACS Nano* **2014**, *8*, 2900.
4. Hoffman, A. S. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 3.
5. Sharma, R.; Kaith, B. S.; Kalia, S.; Pathania, D.; Kumar, A.; Sharma, N.; Street, R. M.; Schauer, C. *J. Environ. Manag.* **2015**, *162*, 37.
6. Kaith, B. S.; Sharma, R.; Kalia, S. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *75*, 266.
7. August, A. D. K.; Mooney, D. J. *Macromol. Biosci.* **2006**, *6*, 623.
8. El-Sherbiny, I. M.; El-Baz, N. M. In *Eco-friendly Polymer Nanocomposites: Chemistry and Applications*; Thakur, K. V.; Thakur, K. M., Eds., Springer India: New Delhi, **2015**; p 173.
9. Rutz, J. K.; Zambiasi, R. C.; Borges, C. D.; Krumreich, F. D.; da Luz, S. R.; Hartwig, N.; da Rosa, C. G. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *98*, 1256.
10. Argin, S.; Kofinas, P.; Lo, Y. M. *Food Hydrocolloid* **2014**, *40*, 138.
11. Zanina, A.; Budtova, T. *Macromolecules* **2002**, *35*, 1973.
12. Vervoort, S.; Budtova, T. *Colloid. Surf. A* **2005**, *262*, 132.
13. Lee, K. Y.; Rowley, J. A.; Eiselt, P.; Moy, E. M.; Bouhadir, K. H.; Mooney, D. J. *Macromolecules* **2000**, *33*, 4291.
14. Peak, C. W.; Wilker, J. J.; Schmidt, G. *Colloid Polym. Sci.* **2013**, *291*, 2031.
15. Xiao, C.; Yang, M. *Carbohydr. Polym.* **2006**, *64*, 37.
16. Adekogbe, I.; Ghanem, A. *Biomaterials* **2005**, *26*, 7241.
17. Moura, M. J.; Faneca, H.; Lima, M. P.; Gil, M. H.; Figueiredo, M. M. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3275.
18. Yang, T. I.; Huang, Y. C.; Yang, S. C.; Yeh, J. M.; Peng, Y. Y. *Mater. Chem. Phys.* **2015**, *152*, 158.
19. Le Goff, K. J.; Gaillard, C.; Helbert, W.; Garnier, C.; Aubry, T. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *116*, 117.
20. Branca, C.; Crupi, C.; D'Angelo, G.; Khouzami, K.; Rifici, S.; Visco, A.; Wanderlingh, U. *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, *132*, 41373.
21. Ooi, S. Y.; Ahmad, I.; Amin, M. C. I. M. *Ind. Crop. Prod.* **2016**, *93*, 227.
22. Kevadiya, B. D.; Joshi, G. V.; Mody, H. M.; Bajaj, H. C. *Appl. Clay Sci.* **2011**, *52*, 364.
23. Benny, I. S. G.; Ponnusami, V. *Int. J. Pharm. Tech. Res.* **2014**, *6*, 1322.
24. Bresolin, T. M. B.; Milas, M.; Rinaudo, M.; Ganter, J. L. M. S. *Int. J. Biol. Macromol.* **1998**, *23*, 263.
25. Copetti, G.; Grassi, M.; Lapasin, R.; Pricl, S. *Glycoconjugate J.* **1997**, *14*, 951.
26. Liu, K. H.; Liu, T. Y.; Chen, S. Y.; Liu, D. M. *Acta Biomater.* **2008**, *4*, 1038.
27. Liang, L.; Liu, J.; Gong, X. *Langmuir* **2000**, *16*, 9895.
28. Bignotti, F.; Lebon, F.; Peroni, I. *Eur. Polym. J.* **2007**, *43*, 1996.
29. Croisier, F.; Jérôme, C. *Eur. Polym. J.* **2013**, *49*, 780.
30. Bueno, V. B.; Bentini, R.; Catalani, L. H.; Petri, D. F. S. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *92*, 1091.
31. Glatter, O.; Gruber, K. *J. App. Crystallogr.* **1993**, *26*, 512.
32. Kataoka, M. F.; Tokunaga, F.; Engelman, D. AIP Conf. Proc. B. Chanse; J. D. S., Ebashi; D. T., Goodhead; H. E., Huxley, Eds. Clarendon Press: Oxford, **1994**; p 87.

33. Iijima, M.; Shinozaki, M.; Hatakeyama, T.; Takahashi, M.; Hatakeyama, H. *Carbohydr. Polym.* **2007**, *68*, 701.
34. Brown, D. R. R. *Catal. Lett.* **1997**, *45*(1-2), 35.
35. Wei, Z.; Michael Moldowan, J.; Dahl, J.; Goldstein, T. P.; Jarvie, D. M. *Org. Geochem.* **2006**, *37*, 1421.
36. Ramsay, J. D. F.; Lindner, P. *Faraday Trans.* **1993**, *89*, 4207.
37. Darder, M.; Colilla, M.; Ruiz-Hitzky, E. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 3774.
38. Holzwarth, G.; Prestridge, E. B. *Science* **1977**, *197*, 757.
39. Segad, M.; Jönsson, B.; Cabane, B. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 25425.
40. Madejová, J.; Janek, M.; Komadel, P.; Herbert, H. J.; Moog, H. C. *Appl. Clay Sci.* **2002**, *20*, 255.
41. Madejová, J. *Vibrat. Spec.* **2003**, *31*, 1.
42. Kampeerappun, P.; Aht-ong, D.; Pentrakoon, D.; Srikulkit, K. *Carbohydr. Polym.* **2007**, *67*, 155.
43. Romero-Bastida, C. A.; Bello-Perez, L. A.; Velazquez, G.; Alvarez-Ramirez, J. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *127*, 195.
44. Romero-Bastida, C. A.; Bello-Perez, L. A.; Velazquez, G.; Alvarez-Ramirez, J. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *127*, 195.
45. Pereira, F. A. R.; Sousa, K. S.; Cavalcanti, G. R. S.; Fonseca, M. G.; de Souza, A. G.; Alves, A. P. M. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *61*, 471.
46. Chivrac, F.; Pollet, E.; Dole, P.; Avérous, L. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *79*, 941.
47. Olivato, J. B.; Marini, J.; Pollet, E.; Yamashita, E.; Grossmann, M. V. E.; Avérous, L. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *118*, 250.