



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ENCAPSULACIÓN DE VITAMINA C EN UN  
HIDROGEL DE AISLADO PROTEICO DE FRIJOL Y  
GOMA XANTANA”**

**TESIS INDIVIDUAL**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

**DANIELA PORRAS MALDONADO**

DIRIGIDA POR

**Dra. SANDRA OLIMPIA MENDOZA DÍAZ**

**M. en C. MARÍA DEL CARMEN CORTEZ TREJO**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2022**



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de  
Información



Encapsulación de vitamina C en un hidrogel de aislado  
proteico de frijol y goma xantana

**por**

Daniela Porras Maldonado

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

**Clave RI:** FQLIC-267746-0223-323



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ENCAPSULACIÓN DE VITAMINA C EN UN  
HIDROGEL DE AISLADO PROTEICO DE FRIJOL Y  
GOMA XANTANA”**

**TESIS INDIVIDUAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**DANIELA PORRAS MALDONADO**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. SANDRA OLIMPIA MENDOZA DÍAZ**

**M. en C. MARÍA DEL CARMEN CORTEZ TREJO**

**SINODALES**

**Dra. SANDRA OLIMPIA MENDOZA DÍAZ**

**DIRECTORA**

**M. en C. MARÍA DEL CARMEN CORTEZ TEJO**

**CODIRECTORA**

**Dra. DORA MARINA GUTIÉRREZ AVELLA**

**SINODAL**

**Dra. ROCÍO CAMPOS VEGA**

**SINODAL**

## **DEDICATORIA**

A familia en especial a mi mamá, papá y hermana mi Ale, de quienes siempre he recibido amor y apoyo incondicional en todas mis decisiones.

A Jaime, quien ha sido mi compañero de vida por 10 años y ha hecho que todo sea mejor.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis directoras de tesis, la Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz y la M. en C. María del Carmen Cortez Trejo, por brindarme todo su apoyo, paciencia, conocimientos y confianza para realizar los trabajos experimentales y teóricos del presente trabajo.

A la Dra. Rocío Campos Vega y a la Dra. Dora Marina Gutiérrez Avella, por la confianza y el apoyo sin el cual no hubiera sido posible este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de nutracéuticos de la UAQ, quienes siempre estuvieron dispuestos a ayudar en lo que fuera necesario.

A todos mis profesores de carrera, por todos los conocimientos que me brindaron y transmitieron.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada a través del proyecto de CB A1-S-49661 para la realización de este proyecto de tesis.

A mamá, papá, mi hermana Ale, Jaime, Agustín, y amigos de la UAQ, quienes cada uno a su manera me apoyaron y animaron en el transcurso de este trabajo.

# ÍNDICE GENERAL

| Contenido   | Página |
|---|--------|
| ÍNDICE GENERAL  | iii    |
| ÍNDICE DE CUADROS   | vi     |
| ÍNDICE DE FIGURAS   | vii    |
| RESUMEN   |        |
| 1. ANTECEDENTES   | 1      |
| 1.1 Hidrogeles  | 1      |
| 1.1.2 Clasificación de los hidrogeles                                 | 1      |
| 1.2 Polímeros empleados en la formación de hidrogeles                 | 2      |
| 1.2.1 Hidrogeles a base de proteína                                   | 3      |
| 1.2.2 Hidrogeles a base polisacáridos                                 | 5      |
| 1.2.3 Hidrogeles mixtos (proteína- polisacárido)                      | 8      |
| 1.2.3.1 Formación de hidrogeles (proteína-polisacárido)               | 9      |
| 1.3 Empleo de hidrogeles en la encapsulación de compuestos bioactivos | 11     |
| 1.3.1 Encapsulación   | 11     |
| 1.3.2 Compuestos bioactivos   | 13     |
| 2. HIPÓTESIS  | 18     |
| 3. OBJETIVOS  | 19     |
| 3.1 General   | 19     |
| 3.2 Específicos   | 19     |

|   |    |
|---|----|
| 4. METODOLOGÍA  | 20 |
| 4.1 Materiales  | 20 |
| 4.2 Métodos y diseño experimental                     | 20 |
| 4.2.1 Obtención de APF                                | 20 |
| 4.2.2 Preparación de los hidrogeles                   | 20 |
| 4.2.3 FTIR  | 21 |
| 4.2.4 Microscopía electrónica de barrido (MEB)        | 22 |
| 4.2.5 Capacidad de retención de agua (CRA)            | 22 |
| 4.2.6 Sinéresis                                       | 23 |
| 4.2.7 Mediciones oscilatorias de pequeña amplitud     | 23 |
| 4.2.8 Fuerza de gel                                   | 23 |
| 4.2.9 Capacidad antioxidante                          | 24 |
| 4.2.10 Análisis estadísticos                          | 24 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES                           | 25 |
| 5.1 FTIR  | 25 |
| 5.2 MEB   | 32 |
| 5.3 CRA y sinéresis                                   | 34 |
| 5.4 Propiedades reológicas y fuerza de los hidrogeles | 35 |
| 5.5 Capacidad antioxidante                            | 39 |
| 6. CONCLUSIONES                                       | 44 |
| 7. REFERENCIAS  | 46 |

## ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro |   | Página |
|--------|---|--------|
| 1      | Materiales comúnmente utilizados para microencapsulación en la industria alimentaria. | 3      |
| 2      | Ejemplos de compuestos bioactivos que son candidatos para ser encapsulados.           | 14     |
| 3      | CRA y sinéresis de las muestras de hidrogel APF:GX con y sin VC.                      | 35     |
| 4      | Fuerza de los hidrogeles APF:GX con y sin VC.   | 39     |
| 5      | Capacidad antioxidante de los hidrogeles APF:GX con y sin VC.                         | 42     |



## ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura |   | Página |
|--------|---|--------|
| 1      | Clasificación de hidrogeles.  | 2      |
| 2      | Estructura química de la goma xantana.  | 7      |
| 3      | Hidrogeles preparados a partir de polímeros naturales.  | 8      |
| 4      | Hidrogeles APF:GX después de las 18 horas de gelificación.  | 25     |
| 5      | Espectros infrarrojo de VC, APF, GX, hidrogel sin VC e hidrogel con VC.   | 26     |
| 6      | Espectros FTIR de VC, hidrogel APF:GX con y sin VC.   | 29     |
| 7      | Segunda derivada de espectros infrarrojo de APF, GX, hidrogeles APF:GX con y sin VC.  | 30     |
| 8      | Micrografías MEB de geles APF.  | 32     |
| 9      | Variación de $G'$ , $G''$ y $\tan \delta$ con la frecuencia (Hz) de los hidrogeles APF:GX con y sin VC.                     | 36     |
| 10     | Variación de $G'$ y ajuste del modelo de ley de potencia con la frecuencia (rad/s) para los hidrogeles APF:GX con y sin VC. | 37     |
| 11     | Capacidad antioxidante de hidrogeles APF:GX con y sin VC.   | 41     |

## RESUMEN

Los hidrogeles son materiales poliméricos capaces de incorporar grandes cantidades de agua o fluidos biológicos en sus redes tridimensionales. En hidrogeles mixtos (proteína-polisacárido) el tipo de interacción que une a los biopolímeros es principalmente de tipo electroestática. En la industria alimentaria estos geles pueden usarse para la encapsulación de compuestos bioactivos. En el proceso de encapsulación, se busca que el compuesto encapsulado se mantenga estable y pueda liberarse de forma controlada en el lugar y tiempo requeridos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de encapsulación de vitamina C de un hidrogel basado en aislado proteico de frijol (APF) y goma xantana (GX). Los hidrogeles mixtos se desarrollaron mediante acidificación lenta con glucono- $\delta$ -lactona (GDL), añadiendo la vitamina C (VC) junto con la adición de GDL. En el presente trabajo los hidrogeles APF:GX con carga y sin carga de VC fueron sometidos a diversas evaluaciones, las cuales brindaron información sobre las interacciones entre los componentes, sobre su microestructura, su capacidad de retener agua, su sinéresis, sus propiedades reológicas y además se obtuvo información sobre capacidad antioxidante. Los resultados obtenidos indican que al encapsular VC en el hidrogel, la VC se une por medio de puentes de hidrógeno a los polímeros, sin embargo, la adición de VC provocó una disminución de las interacciones electrostáticas entre APF y GX, y por consecuencia, se obtuvo un gel menos fuerte y con menor capacidad de retención de agua. En cuanto a la capacidad antioxidante los hidrogeles con VC tuvieron un porcentaje de inhibición mayor que el hidrogel sin VC, pero menor que el de la solución pura de VC.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Hidrogeles

Los hidrogeles son materiales poliméricos que tienen la capacidad de incorporar grandes cantidades de agua o fluidos biológicos en sus redes tridimensionales (Hu y col., 2020). Por cada gramo de biopolímero, estos materiales pueden retener varios gramos de agua (Le y col., 2017).

Los hidrogeles son capaces de absorber gran cantidad de agua debido a la presencia de grupos hidrofílicos (hidroxilo amino, carboxilo, hidroxilo, sulfhídrico) (Pragnesh y Gor, 2018). Dependiendo de la estructura del hidrogel, tendrán distintas capacidades de respuesta hacia el ambiente que los rodea (pH, fuerza iónica, enzima y temperatura) lo que afectará la liberación y adsorción de ingredientes bioactivos (Lui y col., 2021).

#### 1.1.2 Clasificación de los hidrogeles

Los hidrogeles pueden ser clasificados dependiendo de diversas características. La forma más general de clasificarlos es por el origen del polímero, ya sea natural o sintético (Hu y col., 2020). El primer hidrogel fue desarrollado con polímeros sintéticos y desde entonces los hidrogeles sintéticos se han aplicado ampliamente en biomedicina y agricultura y el desarrollo de biomateriales. En lo que respecta a la industria alimentaria, los hidrogeles preparados con polímeros naturales (proteínas y polisacáridos) han atraído mucha atención debido a su baja toxicidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad (Lui y col., 2021).

Otra manera de clasificar a los hidrogeles es por su composición polimérica. Se denomina homopolímero cuando es usado un solo polímero, en cambio cuando se

emplean dos monómeros diferentes con al menos un componente hidrofílico se les llama co-polímeros, y por último los hidrogeles multi-poliméricos son aquellos formados por más de dos polímeros los cuales pueden ser naturales, sintéticos o semi-sintéticos (Espinosa-Andrews y García-Márquez, 2017). En la Figura 1 se presentan algunas de las clasificaciones de hidrogeles más utilizadas.

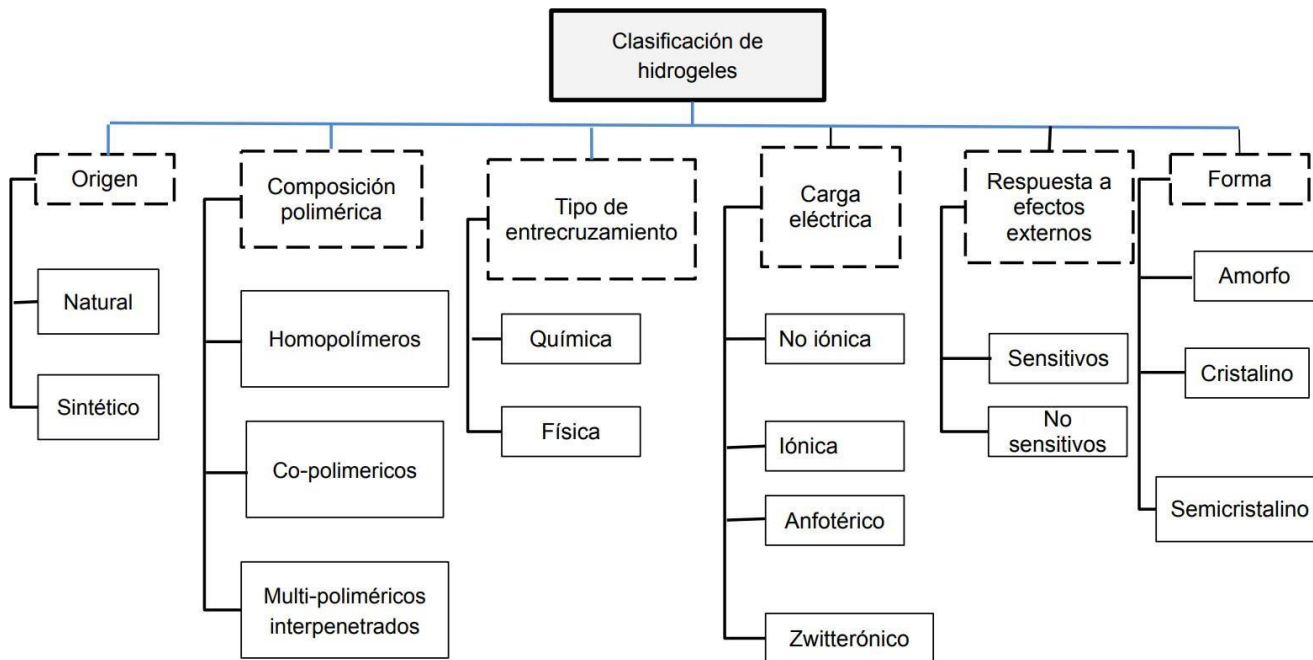


Figura 1. Clasificación de hidrogeles (Espinosa-Andrews y García-Márquez, 2017).

## 1.2 Polímeros empleados en la formación de hidrogeles

Los hidrogeles basados en polímeros naturales imitan muchas características de la matriz extracelular y muchos de ellos han demostrado una mejor biocompatibilidad y biodegradabilidad que los basados en polímeros sintéticos. Debido a que los polímeros naturales son macromoléculas con alto peso molecular, se pueden usar para preparar hidrogeles sin agregar ningún iniciador para iniciar la polimerización (Tang y col., 2019). Los materiales más utilizados para la encapsulación de compuestos bioactivos en la industria alimentaria se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Materiales naturales comúnmente utilizados para encapsulación de compuestos bioactivos en la industria alimentaria.

| Origen                | Polímeros de carbohidratos   | Proteínas  | Lípidos   |
|-----------------------|--|--|---|
| Vegetal               | Almidón y sus derivados<br>Celulosa y sus derivados<br>Polisacáridos<br>Exudados vegetales:<br>Goma arábica, goma karaya, goma de semilla de lino, goma de semilla de chía y goma de algarrobo.<br>Extractos de plantas:<br>Galactomananos y polisacáridos solubles de soya. | Gluten (maíz)<br>Aislados<br>(Guisante, soja, semilla de chía y trigo) | Ácidos grasos<br>Glicéridos<br>Ceras<br>Fosfolípidos  |
| Microbiano/<br>Animal | Goma xantana<br>Gellan<br>Dextrano<br>Quitosano  | Caseínas<br>Proteínas de suero<br>Gelatina                             | Ácidos grasos<br>Glicéridos,<br>Ceras<br>Fosfolípidos |
| Algas                 | Carragenina<br>Alginato  |  |   |

Fuente: Timilsena y col., 2020.

### 1.2.1 Hidrogeles a base de proteínas

Las proteínas son macromoléculas presentes en todos los sistemas vivos, desde bacterias hasta vertebrados y mamíferos superiores, conformando más del 50 por ciento del peso seco de las sus células. Las proteínas tienen varios grupos funcionales (amino, carboxilo, hidroxilo, sulfhídrico y fenólico), los cuales pueden actuar como sitios reactivos para modificaciones químicas y entrecruzamiento. Además, las proteínas se pueden unir a otras biomoléculas como carbohidratos, lípidos, grupos fosfato, ácidos nucleicos, flavinas e iones metálicos por medio de enlaces covalentes o no covalentes (Panahi y Baghban-Salehi, 2019). Actualmente ha habido un interés en el desarrollo de nanoestructuras (hidrogeles, películas y

complejos) a base de proteínas, siendo los hidrogeles los materiales de mayor interés. Estas estructuras pueden ser utilizadas para facilitar la encapsulación de diversos compuestos bioactivos (Bourbon y col., 2019).

Respecto al desarrollo de hidrogeles, las proteínas pueden gelificar mediante tratamientos físicos (enfriamiento, calentamiento, alta presión), químicos (acidificación y adición de sal) o enzimáticos. Esta red tridimensional es estabilizada mediante enlaces no covalentes (interacciones hidrofóbicas, interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno) o enlaces covalentes (puentes disulfuro). Las propiedades funcionales de hidrogeles proteicos, como la fuerza de gel, elasticidad y capacidad de retención de agua van a depender de las características propias de la proteína, así como de factores extrínsecos (concentración de proteína, fuerza iónica, pH, etc.) y de las condiciones utilizadas para inducir la gelificación (temperatura, tiempo, velocidad de calentamiento, tratamiento a alta presión, etc.) (Le y col., 2017; Bourbon y col., 2019).

Dentro de las fuentes de proteína para el desarrollo de hidrogeles, la tendencia actual es la búsqueda de ingredientes de origen vegetal que sustituyan a los de origen animal por diversas razones, ya sean por salud, por ética, por motivos económicos etc. (Peña-Cháidez y col., 2021). En este sentido, el uso de aislados proteicos vegetales representa una buena alternativa.

En los últimos años, se han utilizado muchas proteínas de leguminosas en el procesamiento de alimentos debido a sus buenas propiedades gelificantes. Su uso en la industria alimentaria ha estimulado la investigación para aprovechar al máximo sus propiedades gelificantes. Existe un interés creciente en desarrollar proteínas con mejores propiedades gelificantes a concentraciones de proteína más bajas (Yang y col., 2018).

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), es una de las leguminosas con más importancia en la alimentación humana, y se encuentra ampliamente distribuido en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Los granos de frijol contienen un alto contenido en fibra, proteínas y compuestos bioactivos además tiene una alta capacidad antioxidante y se le han atribuido efectos benéficos contra diabetes, estrés oxidativo, inflamación intestinal y enfermedades cardiovasculares. Como se mencionó anteriormente, el frijol destaca por su alto contenido en proteínas que varía entre el 15 y el 30% (Quintana-Blanco y col, 2016; Palacio-Márquez y col., 2021). Las proteínas de frijol han atraído mucha atención debido a sus propiedades funcionales, por ejemplo, solubilidad de proteínas, propiedades emulsionantes y capacidad para formar geles inducidos por calor (Ma y col., 2013). Además, el uso de aislados proteicos de frijol como ingredientes funcionales para mejorar la calidad nutricional de los productos, ha ido en aumento (Wani y col., 2015).

Anteriormente algunos autores (Ma y col., 2013; Peña-Cháidez y col., 2021), han reportado el uso de un asilado proteico de frijol en un sistema proteína: polisacárido para el desarrollo de materiales encapsulantes. Sin embargo, existe poca información sobre la gelificación de aislados proteicos de frijol, lo cual impacta negativamente en el desarrollo de geles de alta calidad (Peña -Cháidez y col., 2021).

### 1.2.2 Hidrogeles a base polisacáridos

Los polisacáridos son la clase más abundante de biopolímeros y pueden ser obtenidos de animales, plantas, microbios y algas. Algunas de sus características es que son estables, renovables, no tóxicos, intrínsecamente biodegradables, relativamente baratos y de naturaleza hidrófila debido a la presencia de grupos funcionales como hidroxilamino y ácido carboxílico. El uso de polisacáridos para la formación de hidrogeles ha sido ampliamente estudiado. Se ha reportado la utilización de polisacáridos como goma arábica, goma ghatti, goma guar, goma de

algarrobo, xilano, quitosano, goma tragacanto, goma carragenina, goma gellan, salecan, sodio, alginatos, goma tara, escleroglucano e hialuronano (Pragnesh y Gor., 2018).

En cuanto a la gelificación, se ha reportado que para la formación de los geles se necesitan concentraciones de polisacárido inferiores al 1%, valores muy inferiores a los necesarios para la gelificación de proteínas. Adicionalmente, otros factores que influyen en la gelificación de los polisacáridos son: peso molecular, composición de monosacáridos, densidad de carga, temperatura, la presencia de contraiones específicos y pH (Le y col., 2017).

Dentro de los polisacáridos más empleados para la formación de hidrogeles destaca la utilización de gomas naturales, siendo carragenina, goma gelana y goma xantana, las más utilizadas en la industria de alimentos. La goma xantana es (GX) ampliamente utilizada por sus propiedades reológicas únicas (Sukriti y col., 2017; Pragnesh y Gor., 2018; Kumar y col., 2018). La goma xantana es un polisacárido extracelular de alto peso molecular producida por *Xanthomonas* (un género de bacterias Gram-negativas que exhibe varias especies diferentes). Es un heteropolisacárido compuesto principalmente de unidades repetidas de pentasacáridos (dos unidades de glucosa, dos unidades de manosa y un ácido glucurónico en la relación molar de 2.8: 2.0: 2.0). Su estructura química se muestra en la Figura 2. en donde se observa la estructura primaria que consiste en un esqueleto lineal (1-4) de  $\beta$ -D-glucosa con una cadena lateral de trisacárido en cada glucosa alterna ubicada en la posición C-3, que contiene un residuo de ácido glucurónico unido (1-4) a una unidad terminal de manosa y (1-2) a una segunda manosa que se conecta a la columna vertebral (Pragnesh y Gor., 2018). La presencia tanto de ácido glucurónico como de ácido pirúvico es la principal responsable del carácter aniónico de la goma xantana (Sukriti y col., 2017).



Este polisacárido, es soluble en agua fría y caliente, llega a formar una solución muy viscosa a una concentración muy baja y muestra un comportamiento pseudoplástico (Kumar y col., 2018; Cheng y col., 2020). A pesar de que la goma de xantana se considera un polisacárido no gelificante, se ha informado que puede formar geles en combinación con proteínas bajo condiciones asociativas (Lui y col., 2021).

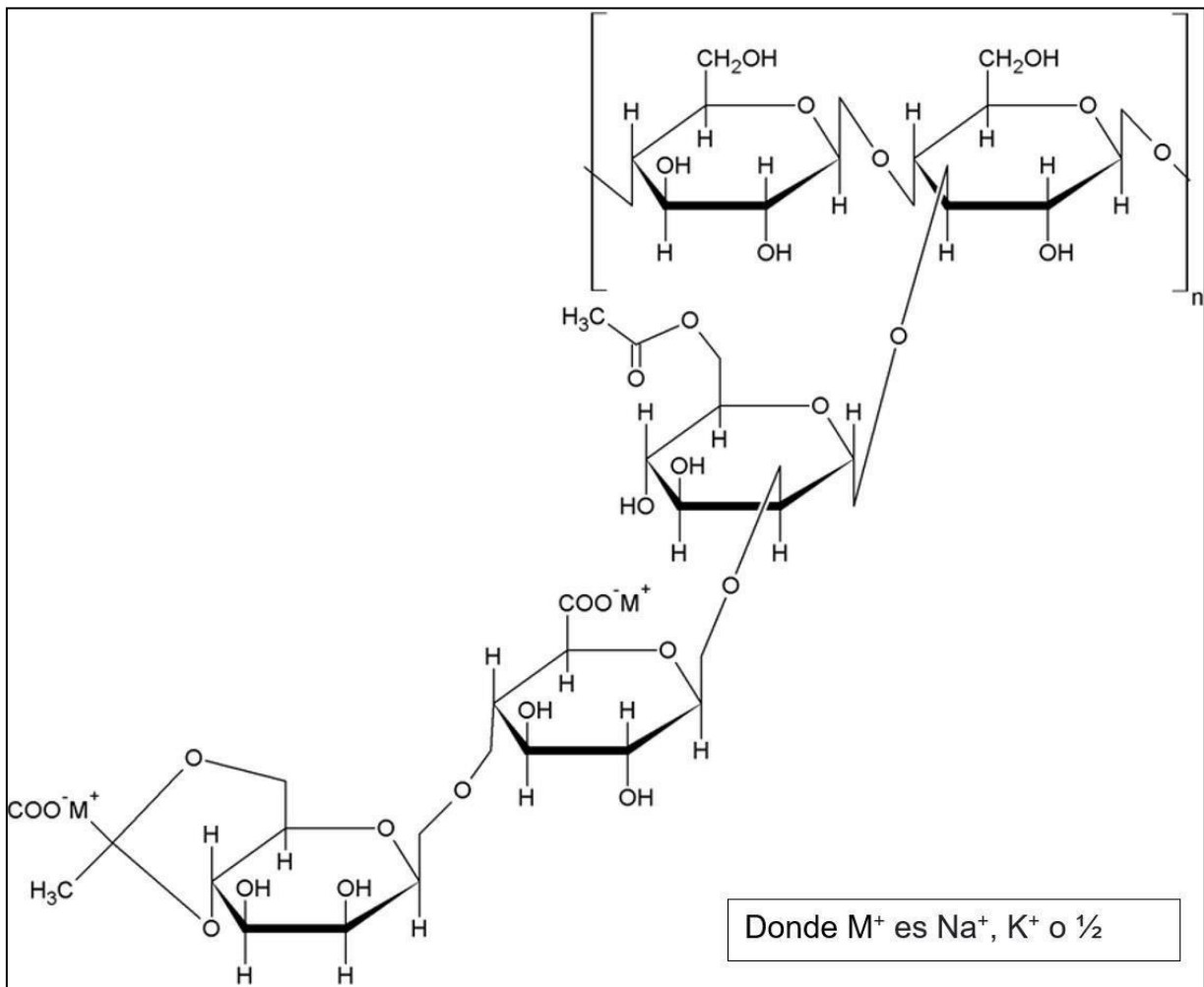


Figura 2. Estructura química de la goma xantana (Pragnesh y Gor., 2018)

### 1.2.3 Hidrogeles mixtos proteína-polisacárido

Los hidrogeles que son desarrollados a partir de proteínas o de polisacáridos tienen algunas limitaciones como una baja resistencia, poca capacidad de retención de agua, inestabilidad térmica y lumínica. En este sentido, los hidrogeles desarrollados a partir de su combinación (hidrogeles binarios) pueden ser una buena opción para superar estas desventajas debido al efecto sinérgico de las propiedades de ambos biopolímeros (Lui y col., 2021).

Tanto proteínas como los polisacáridos son usados comúnmente como ingredientes principales en productos alimenticios por su importante función en la estructura y estabilidad de los alimentos procesados, como agentes espesantes, estabilizantes, gelificantes y emulsionantes (Le y col., 2017; Timilsena y col., 2020; Florowska y col., 2020).

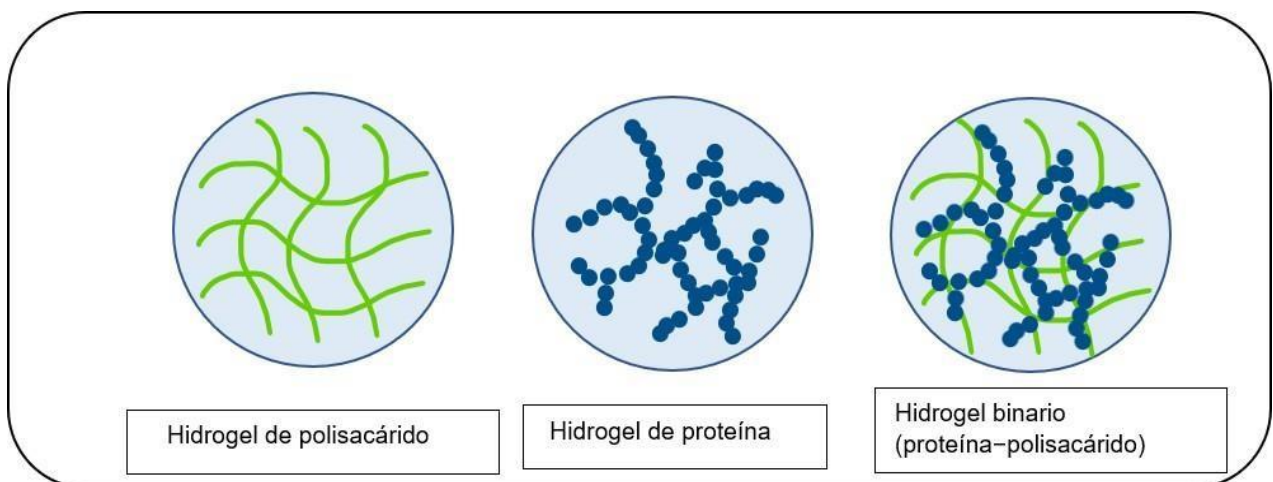


Figura 3. Hidrogeles preparados a partir de polímeros naturales (Lui y col, 2021).

Las propiedades de los geles mixtos obtenidos a partir de mezclas proteína-polisacárido dependerán de las características de ambos biopolímeros (peso, conformación, densidad de carga y rigidez de cada uno), así como de la proporción

proteína:polisacárido y las condiciones del medio (como pH, fuerza iónica, temperatura, etc.) (Bourbon y col, 2019). En soluciones acuosas, la principal fuerza impulsora en la asociación de proteínas y polisacáridos son las interacciones electrostáticas. Se denominan geles electrostáticos o geles acoplados debido a la participación de dos moléculas diferentes para formar las zonas de unión. (Le y Turgeon, 2013). En la Figura 3 se observa una representación gráfica de hidrogeles preparados a partir de polímeros naturales.

#### 1.2.3.1 Formación de los hidrogeles proteína- polisacárido

Un sistema proteína-polisacárido puede comportarse de diferentes formas dependiendo de las condiciones ambientales (pH y fuerza iónica). A baja concentración de biopolímero o en mezclas con biopolímeros de tamaño molecular pequeño o intermedio generalmente ocurre un fenómeno de cosolubilidad. Por otra parte, a concentraciones mayores, puede ocurrir incompatibilidad termodinámica (interacciones segregantes) o compatibilidad (interacciones agregativas). Tanto la incompatibilidad termodinámica como la incompatibilidad involucran fuerzas físicas y químicas de diferente magnitud y dirección. La incompatibilidad termodinámica prevalece cuando los fenómenos de repulsión superan las interacciones asociativas en el sistema, por ejemplo, entre una proteína y un polisacárido neutro o entre un polisacárido que lleva cargas similares a la proteína (como polisacárido aniónico con  $\text{pH} > \text{pI}$  punto isoelectrico (pI) de la proteína). Por otro lado, la compatibilidad termodinámica suele ser inducida por interacciones electrostáticas asociativas entre proteínas y polisacáridos. Estas interacciones generalmente se producen a un pH entre el pI de las proteínas y la pKa de los polisacáridos, aunque se ha demostrado que incluso a pH por encima del pI de las proteínas, algunas zonas positivamente cargadas son capaces de interactuar con las cargas negativas del polisacárido. En estas condiciones se pueden formar diferentes tipos de estructuras como los

coacervados, complejos y geles dependiendo de las condiciones de preparación (Le y col., 2017; Florowska y col., 2020).

Como se mencionó anteriormente, en soluciones acuosas, la principal fuerza impulsora en la asociación de proteínas y polisacáridos son las interacciones electrostáticas, en este caso los polisacáridos en una solución acuosa adoptan una conformación extendida para reducir la repulsión electrostática y la entropía. Los autores (Le y Turgeon., 2013) descubrieron un nuevo sistema de gel que utiliza proteínas y polisacáridos nativos a una concentración de sólidos totales muy baja.

La gelificación de estos polímeros se indujo mediante acidificación *in situ*, a temperatura ambiente y a un pH en el que ambas moléculas llevan cargas netas opuestas y la estructura del gel se estabiliza mediante interacción electrostática. El mecanismo de gelificación entre polisacáridos y proteínas lo explican mediante formación de un gel electrostático obtenido a partir de soluciones acuosas mixtas de  $\beta$ -lactoglobulina (blg) y goma xantana, la GX muestra un comportamiento pseudoplástico debido a una asociación de extremo a extremo de las moléculas de GX o asociación lateral, esto da como resultado una red tenue de moléculas de GX en solución. A partir de los resultados de la microscopía confocal, reológica y de dispersión de luz, se propuso que la gelificación cinética de la mezcla de goma de  $\beta$ -lactoglobulina-XG consistía en tres etapas. Durante la primera etapa, la mezcla (proteína-polisacárido) es acidificada, el pH se acerca al pI de la proteína, ocurriendo una interacción entre las zonas cargadas positivamente de la blg con los grupos cargados negativamente (COO<sup>-</sup>) en las cadenas de GX, dando como resultado una mezcla soluble. Después con una mayor disminución del pH en la mezcla, se adhieren más proteínas en las cadenas de GX reduciendo la carga neta del sistema soluble. Durante la segunda etapa se generan zonas de unión en donde dos cadenas de XG podrían compartir las mismas moléculas de proteína y finalmente durante la tercera etapa a medida que aumentan las interacciones asociativas electrostáticas

dará como resultado una transición sólido-gel hasta llegar al punto de gelificación. Estas etapas demuestran que la red de cadenas de GX proporciona un marco para la organización del gel y la adhesión de la proteína lo largo de las cadenas de GX, demostrando la posibilidad de ser un agente que favorezca el entrecruzamiento. Esta explicación solo se enfoca en el sistema de blg-GX, sin embargo, estos hallazgos son valiosos para entender la gelificación electrostática de otras mezclas de proteínas y polisacáridos (Le y col., 2017).

### 1.3 Empleo de hidrogeles en la encapsulación de compuestos bioactivos

#### 1.3.1 Encapsulación

Anteriormente la encapsulación se ha descrito como una tecnología para proteger sustancias sensibles, como lo son los componentes bioactivos inestables, contra las influencias de entornos adversos. En la encapsulación el compuesto de interés, conocido también como núcleo, queda atrapado y estable dentro de otro material de revestimiento, matriz o membrana, denominado “material de pared”. Esta membrana actúa como una barrera física para el oxígeno u otras moléculas, evitando la degradación del compuesto de interés. Por otra parte, el compuesto encapsulado puede liberarse de forma controlada en sistemas biológicos complejos o en aplicaciones de productos (Ahmed-Wani y col., 2015).

Uno de los objetivos más importantes del proceso de encapsulación es que el compuesto encapsulado se mantenga estable. Algunos reportes mencionan que la estabilidad del ingrediente activo depende en gran medida de la estructura y funcionalidad de la matriz, las condiciones de procesamiento y las interacciones núcleo-matriz. Para que la técnica de encapsulación tenga éxito se debe comprender qué tan sensibles son los ingredientes activos frente a factores físicos, químicos y ambientales, se debe comprender si estos factores pueden causar la pérdida de

funcionalidad biológica, degradación química o una liberación prematura o incompleta de los compuestos activos (Ahmed–Wani y col., 2015; Timilsena y col., 2020).

Dependiendo de la naturaleza del núcleo y del uso que se le dará al producto terminado, se han investigado varias técnicas de encapsulación. Existen varios métodos de micro / nanoencapsulación que han sido aplicados en alimentos, productos farmacéuticos, agricultura, textiles, papel y otras industrias afines. Las micropartículas son partículas esféricas con tamaños desde 1 a 250  $\mu\text{m}$  y las nanopartículas son sistemas poliméricos submicrónicos ( $<1 \mu\text{m}$ ) (Valdiviezo-Morales y col., 2017). Algunas de estas técnicas de micro / nanoencapsulación son las siguientes: recubrimiento del compuesto activo, la cual es una de las técnicas más simples; secado por aspersion es una técnica de encapsulación muy eficaz y ampliamente utilizada en las industrias alimentaria y farmacéutica; revestimiento de lecho fluidizado, el cual es usado comúnmente para el recubrimiento secundario de los productos principalmente encapsulados para mejorar la estabilidad; recubrimiento por extrusión, el cual es conveniente para producir productos encapsulados altamente densos; atrapamiento de liposomas el cual es muy popular en la industria de administración de fármacos y nutraceuticos; la coacervación, fue el primer proceso de encapsulación reportado para la producción industrial de productos micro encapsulados y la gelificación ionotrópica que implica la interacción de un polímero iónico con un ión de carga opuesta que conduce un entrecruzamiento entre los dos polímeros (Timilsena y col., 2020).

Anteriormente se ha demostrado que la encapsulación empleando hidrogeles es una alternativa rentable y práctica para mejorar la estabilidad y biodisponibilidad de diferentes compuestos bioactivos o nutrientes (Lui y col., 2021).

Los hidrogeles al ser biocompatibles y tener la capacidad de retener compuestos bioactivos, se han dado a conocer como biomateriales con potencial para ser aplicados en la industria farmacéutica, biomédica y agroalimentaria, entre otras. En la industria alimentaria existen una gran variedad de compuestos que han sido encapsulados utilizando hidrogeles entre los que se encuentran los compuestos fenólicos. En la actualidad se han caracterizado más de mil compuestos fenólicos en plantas que han sido utilizados en la industria alimentaria para la aumentar el valor nutricional de los alimentos. Por ejemplo, son usados como colorantes naturales y agentes conservadores de sabor. Los polifenoles por su naturaleza antioxidante previenen la peroxidación lipídica de algunos alimentos, de esta manera ayudan a incrementar la estabilidad de estos alimentos. El uso de los hidrogeles en la industria alimentaria puede servir ya sea como matrices de compuestos bioactivos o como empaques que protegen la integridad de los alimentos por un largo periodo de tiempo, así mismo los hidrogeles sirven como agentes texturizantes, por ejemplo, los hidrogeles de pectina los cuales llegan a mejorar la textura de algunos productos alimenticios. Por otra parte, los hidrogeles pueden ser usados en la industria farmacéutica y biomédica gracias su potencial de absorber agua, permitiendo tener la biocompatibilidad y la flexibilidad de un tejido natural, sin embargo, aún siguen persistiendo ciertas limitaciones en el área biomédica. En el caso de la industria farmacéutica gracias a la porosidad de los hidrogeles, se han usado como sistemas de liberación controlada de compuestos con efectos benéficos para la salud. Además, varias investigaciones médicas se han centrado en usar compuestos antioxidantes con el fin de evitar la formación de radicales libres. De esta manera los compuestos con actividad antioxidante han empezado a recibir más interés en distintas industrias, un ejemplo es el uso de la encapsulación de antioxidantes en hidrogeles (Espinosa-Andrews y García-Márquez., 2017).

### 1.3.2 Compuestos bioactivos

Cuadro 2. Ejemplos de compuestos bioactivos que son candidatos para ser encapsulados.

| Compuestos bioactivos | Función del compuesto encapsulado   | Ejemplos y beneficio a la salud  |
|-----------------------|---|--|
| Compuestos fenólicos  | Protege y mejora de las actividades antioxidantes y funcionales.  | <p style="text-align: center;">Resveratrol</p> <p>Tiene propiedades de antienvjecimiento, anticancerígenas, antiinflamatorias y antioxidantes. También mejora la sensibilidad a la insulina en pacientes diabéticos tipo 2.</p> <p style="text-align: center;">Catequinas</p> <p>Neutraliza los radicales libres, reduce el riesgo de cáncer, protege la piel del daño inducido por la radiación UV.</p> <p style="text-align: center;">Antocianinas</p> <p>Es un antioxidante, anticancerígeno, también mejora la capacidad visual y el funcionamiento cognitivo.</p> <p style="text-align: center;">Quercetinas</p> <p>Funciona como un potente antioxidante, antiinflamatorio, antialérgico y anticancerígeno, también inhibe la proteína quinasa activada por mitocondrias (MAP) en las células del carcinoma epidérmico humano e inhibe el crecimiento tumoral.</p> |
| Carotenoides          | Estabilización, liberación controlada eficiente, expansión de su aplicación industrial (como colorantes y antioxidantes). | <p style="text-align: center;">Licopeno</p> <p>Tiene función antioxidante y ayuda a reducir el cáncer de próstata.</p> <p style="text-align: center;">Alfa caroteno</p> <p>Neutraliza los radicales libres que pueden dañar las células, aumenta las defensas antioxidantes celulares, protege la córnea de la luz ultravioleta</p>  |
| Vitaminas             | Protección a la oxidación.  | <p style="text-align: center;">Vitaminas (A, B, C, E, K)</p> <p>Función antioxidante, también ayuda al para crecimiento y desarrollo, coagulación sanguínea, cicatrización de heridas.</p>   |

Fuente: Pateiro y col., 2021.



Los compuestos bioactivos de interés pueden ser entregados y liberados desde la ingestión hasta la digestión de manera exitosa por medio de la encapsulación. Un componente bioactivo de un alimento, llamado también agente nutracéutico, es aquel que aporta un beneficio a la salud más allá de los considerados como nutrición básica. Este tipo de componentes se pueden encontrar en pequeñas cantidades sobre todo en productos de origen vegetal. Algunos de estos compuestos bioactivos son: polifenoles, flavonoides, carotenoides y vitaminas (Aguilera–Garca y col., 2007; Ahmed–Wani y col., 2015; Lui y col., 2021). En el Cuadro 2 se encuentran algunos compuestos bioactivos de interés en la industria alimentaria (Pateiro y col., 2021).

Es necesario señalar que, muchos de estos compuestos son sensibles al calor, la luz, el oxígeno, los ácidos gástricos, las enzimas y las sales biliares, por lo que su estabilidad y biodisponibilidad son bajas (Le y col., 2017). Se ha demostrado que los métodos convencionales de administración de nutrientes no proporcionan perfiles cinéticos satisfactorios ya que la concentración de estos nutrientes decae rápidamente por debajo de los niveles deseados. Entonces para evitar este problema es necesario el diseño de sistemas en donde exista una administración controlada del nutriente. Estos sistemas utilizan vehículos o agentes acarreadores que contienen al compuesto bioactivo y lo liberan de forma controlada para mantener las concentraciones del nutriente en los niveles deseados durante un período de tiempo determinado (Hu y col., 2020).

Dentro de los diferentes compuestos bioactivos ya mencionados, existe una gran cantidad de literatura donde se ha estudiado la encapsulación sobre todo de compuestos fenólicos y carotenoides. Sin embargo, la encapsulación de vitaminas sigue siendo un área de oportunidad. Las vitaminas son compuestos complejos de naturaleza orgánica presentes en los alimentos, las cuales son esenciales para la salud humana, el crecimiento, el desarrollo, la reproducción y el mantenimiento. De todas las vitaminas existentes, 13 son consideradas como las de mayor importancia,

estas se clasifican como vitaminas solubles en agua y solubles en grasa. Las vitaminas A, E, K y D son vitaminas solubles en grasa, mientras que las vitaminas B1, B2, B3, B5, B6, B9, B12, la vitamina C (VC) y la biotina son vitaminas solubles en agua. A pesar de encontrarse en una amplia gama de fuentes dietéticas que incluyen fuentes vegetales y animales para estas vitaminas, si hay una ingesta deficiente en la dieta de las personas puede provocar graves problemas de salud, por eso es de gran importancia del consumo adecuado de cada una de ellas (Maqbool y col., 2017).

La vitamina C es un nutriente soluble en agua el cual es necesario para preservar algunos procesos fisiológicos saludables en los seres humanos como son: promover la biosíntesis de colágeno, proporcionar fotoprotección, reducir la melanina, eliminar los radicales libres y mejorar la inmunidad (efecto antiviral). También se ha descrito que la VC está implicada en la prevención del escorbuto, en reducir el riesgo de cáncer y enfermedades cardiovasculares y en mejorar la absorción de hierro para prevenir la anemia. Se ha mencionado en la literatura que hasta 20-120 mg / día de VC se absorben activamente en el intestino delgado. La VC, al igual que otras vitaminas, es sensible y puede degradarse en condiciones ambientales extremas como altas temperaturas y pH extremo, disminuyendo su actividad antioxidante (Wardhani y col., 2020). Para evitar la degradación de la vitamina y que su consumo y efectos terapéuticos sean significativos, es necesario que se proteja del líquido gástrico para que esta pueda llegar de una manera intacta a los intestinos. Una alternativa para proteger a la vitamina de ambientes adversos es su encapsulación (Hu y col., 2020).

Anteriormente las técnicas más comúnmente utilizadas para la encapsulación de la VC eran el secado por aspersión, el enfriamiento por aspersión, el recubrimiento en lecho fluidizado, los liposomas y la extrusión, entre otras (Abbas y col., 2013). En la actualidad se han encontrado más métodos de encapsulación como el método de

gelificación con glucomanano desacetilado (Wardhani y col., 2020), el uso de gomitas de caseína (Yan y col., 2021) y el uso de nano cápsulas de nano cristales de celulosa modificada / quitosano (Baek y col., 2021).

En cuanto al uso de hidrogeles para la encapsulación de la VC, Hu y col., (2020) utilizaron un sistema binario (polisacárido-polisacárido) para la encapsulación de la VC demostrando que es posible encapsular en hidrogeles binarios. Actualmente en el grupo de trabajo se encontró que mezclas de aislado proteico de frijol (APF) y GX a 1% de biopolímero son capaces de producir hidrogeles a temperatura ambiente por acidificación lenta Cortez-Trejo y col., (2021), basándose en este estudio, se consideró realizar un hidrogel de APF y GX para la encapsulación de la VC. Como se mencionó anteriormente los hidrogeles desarrollados a partir de proteínas o de polisacáridos tienen desventajas que pueden ser superadas por hidrogeles binarios desarrollados a partir biopolímeros distintos debido al efecto sinérgico de las propiedades de ambos biopolímeros.

## **2. HIPÓTESIS**

El hidrogel mixto a base de APF y GX encapsula vitamina C manteniendo su capacidad antioxidante.

### **3. OBJETIVOS**

#### 3.1 General

Evaluar la capacidad de encapsulación de vitamina C de un hidrogel de aislado proteico de frijol y goma xantana.

#### 3.2 Específicos

- Determinar las condiciones experimentales para la encapsulación de vitamina C empleando un hidrogel a base de aislado proteico de frijol y goma xantana.
- Caracterizar fisicoquímicamente el hidrogel cargado con vitamina C.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Materiales

La goma xantana, la glucono- $\delta$ -lactona y todos los demás reactivos para la realización de las pruebas experimentales se obtuvieron de Sigma - Aldrich Co, a menos que se indique lo contrario.

### 4.2. Métodos y diseño experimental

#### 4.2.1 Obtención del APF

El APF se preparó utilizando el método descrito por Cortez-Trejo y col., (2021). Los frijoles se dejaron reposar en agua durante 16 horas, después de este tiempo se retiró la cáscara manualmente y los cotiledones se secaron a 40° C durante 12 horas. Posteriormente, los granos se procesaron en un molino de laboratorio para producir harina con un tamaño de partícula equivalente a 60 mallas. La harina se resuspendió en agua (1 g de frijol / 10 mL agua) y el pH se ajustó a 8.0 con 0.1 M de NaOH y la extracción de proteínas se realizó a 35° C con agitación durante 1 hora. La mezcla se centrifugó a 5000 g durante 15 minutos a 4° C, después se recolectó el sobrenadante. El precipitado se re-extrajo en condiciones idénticas para maximizar el rendimiento, y las dos extracciones se combinaron. Se ajustó el pH del sobrenadante a 4.3 con HCl para precipitar las proteínas, seguida de una de centrifugación a 10000 g durante 20 minutos a 4° C. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se re-suspendió en agua, fue neutralizado y liofilizado. Finalmente, se almacenó a -20°C hasta su uso.

#### 4.2.2 Preparación del hidrogel

Los hidrogeles APF: GX se prepararon siguiendo la metodología de Cortez-Trejo y col., (2021). Se preparó una mezcla proteína-goma xantana a 1% de concentración de biopolímero y proporción proteína-polisacárido 1:1 p/p. Primero se prepararon a temperatura ambiente las dispersiones acuosas individuales de BPI (3% p/v) y XG (0.8% p/v) las cuales fueron agitadas magnéticamente durante 3 h. Después de este tiempo se mezclaron y homogenizaron en vórtex. La dispersión de APF se ajustó a pH 10.0, 30 min previo al término de las 3 h, mientras que la dispersión de GX se ajustó a este mismo valor de pH inmediatamente previo al mezclado. Una vez obtenida la mezcla, esta se gelificó mediante acidificación lenta a temperatura ambiente, para esto se usó la cantidad correspondiente de glucono- $\delta$ -lactona (GDL) para acidificar hasta pH 4.0, se homogeneizó en vórtex y después se dejó reposar por 18 h, tiempo después del cual se consideró completa la gelificación.

Para la preparación de los geles con vitamina C al 0.8% (p/v), se siguió el método anterior con algunas modificaciones. Se pesaron 8 mg de VC los cuales se disolvieron en 250  $\mu$ l de agua destilada y esta solución de VC se añadió a 250  $\mu$ l de la solución de GDL previamente preparada, la solución de GDL:VC se mezcló en el vórtex y posteriormente se añadió a la mezcla de APF: GX previamente preparada, se homogenizó en vórtex y se dejó reposar por 18 h a temperatura ambiente.

#### 4.2.3 FTIR

La espectroscopia infrarroja fue utilizada para determinar las interacciones intermoleculares entre los componentes del hidrogel APF: GX con y sin VC. Se obtuvieron los espectros IR de los biopolímeros individuales de los hidrogeles siguiendo del método de (Cortez-Trejo y col., 2021). Antes del análisis, los hidrogeles se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  y se liofilizaron. Los espectros infrarrojos de los geles liofilizados fueron registrados en un rango de  $4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$  utilizando un

espectrómetro Spectrum GX (Perkin Elmer). Los resultados se expresaron como porcentaje de transmitancia o absorbancia.

#### 4.2.4 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

La morfología de los hidrogeles APF: GX con y sin VC se examinó por MEB de acuerdo con el método descrito por Cortez-Trejo y col., (2021). Brevemente los polvos de las muestras previamente liofilizadas se unieron a una cinta de carbono de doble cara y se cubrieron con una capa de oro de 50 nm de espesor utilizando un ionizador de metal. Las muestras se examinaron con un voltaje acelerado de 10 kV con un microscopio EVO-50 (Carl Zeiss, Jena, Alemania) y las micrografías fueron tomadas a 100, 500 y 10 000 aumentos.

#### 4.2.5 Capacidad de retención de agua (CRA)

La CRA de los hidrogeles APF: GX con y sin VC se determinó siguiendo la metodología de Hidalgo y col., (2020) con algunas modificaciones. Los hidrogeles (~10 g) se prepararon *in situ* en tubos centrífugos de 45 mL. Después de la gelificación completa (18 h), los tubos se centrifugaron a 200 × g durante 15 min a 4 °C. El porcentaje del agua expulsada se cuantificó registrando los pesos antes y después del proceso de centrifugación. La CRA se calculó utilizando la fórmula siguiente:

$$\% \text{ CRA} = \frac{p_0 - p}{p_0 * 100}$$

Donde  $p_0$  es el peso inicial del agua en el gel (g) y  $p$  es el peso del agua expulsada (g).



#### 4.2.6 Sinéresis

La sinéresis de los hidrogeles APF: GX con y sin VC se determinó siguiendo el método de (Wei y col., 2020) con algunas modificaciones. Los geles (~10 g) se prepararon en viales de 10 mL. Después de 18 h de gelificación, los viales se invirtieron y se colocaron en papel de filtro durante 120 min. El peso del agua expulsada se cuantificó registrando el peso de los geles antes y después de la inversión. La sinéresis se calculó mediante la fórmula siguiente:

$$\% \text{Sinéresis} = \frac{p}{p_0 * 100}$$

Donde p es el peso del agua expulsada (g) y p<sub>0</sub> es el peso inicial del agua en el gel

#### 4.2.7 Mediciones oscilatorias de pequeña amplitud

Se determinó el módulo de almacenamiento o elástico (G'), módulo de pérdida o viscoso (G'') y el ángulo de fase δ de los geles APF: GX con carga y sin carga de VC siguiendo la metodología de Cortez-Trejo col., (2020). Después de la gelificación completa de los geles (18 h), se realizaron mediciones de oscilación dinámica con un reómetro ARES (Rheometric Scientific) equipado con una geometría plato-plato con diámetro de 50 mm. El espacio entre los platos se mantuvo en 0.5 mm. Se realizaron barridos de frecuencia para cada muestra en un rango de 0.1 Hz-100 Hz a una deformación constante de 0.5%.

#### 4.2.8 Fuerza de gel

La fuerza de los hidrogeles APF:GX con carga y sin carga de VC se obtuvo mediante un analizador de textura TA-TX2 plus texture analyzer (Stable MicroSystems). Los hidrogeles se prepararon en viales cilíndricos (20 mm de altura, 25 mm de diámetro). Después de la gelificación completa de las muestras (18 h), los hidrogeles fueron

analizados por una probeta cilíndrica (P/0,5 R) a un 40% de compresión. Las velocidades pre-test, test y post-test fueron de 1, 0.5 y 2 mm/s, respectivamente.

#### 4.2.9 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante los hidrogeles APF:GX con y sin VC se determinó mediante los ensayos de ABTS y DPPH, después de 18, 26, 72 y 84 horas de gelificación. Para esto muestras de hidrogel preparadas de acuerdo con la sección 4.2.2 fueron mezcladas con metanol siguiendo la metodología de Thongchai y col., (2020), con algunas modificaciones. Después de las horas de almacenamiento respectivas, a cada gel se le agregó 10 mL de metanol, y la mezcla fue homogenizada con ayuda de un ultraturax.

Para los análisis ABTS y DPPH se siguió el método de Nikolaos y Sigalas, (2008). Primero se prepararon las soluciones de ABTS y DPPH, de estas soluciones se tomaron 230 y 200  $\mu$ L respectivamente y se añadieron a 20  $\mu$ L de cada muestra (hidrogeles y controles), las muestras se dejaron reposar durante 30 minutos en la oscuridad (Ryu y col., 2018, Esposito y col., 2020). Después de los 30 minutos, las absorbancias se registraron en un lector de microplacas UV-Vis Spectra Max (Molecular Devices) y la capacidad antioxidante se determinó empleando una curva estándar de Trolox y se calculó el porcentaje (%) de inhibición de radicales.

#### 4.2.10 Análisis estadísticos

Cada análisis se realizará por duplicado o triplicado. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y para la comparación de medias se utilizó según el caso, la prueba de Tukey o de Dunnet ( $p < 0.05$ ) utilizando el programa JMP 8.0. Todos los resultados se expresarán como la media  $\pm$  la desviación estándar.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 FTIR

La Figura 4 muestra los hidrogeles de APF:GX con y sin VC.

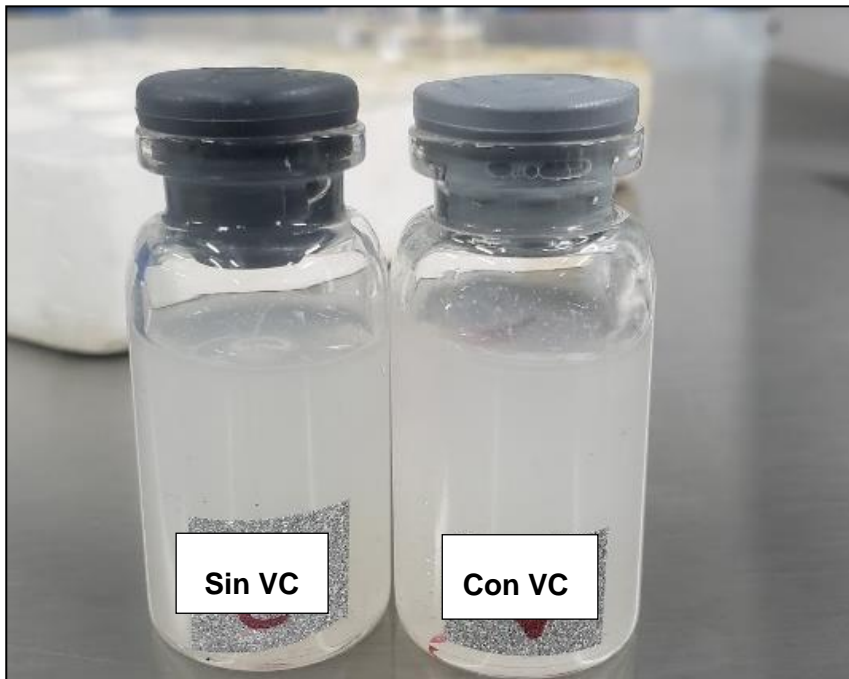


Figura 4. Hidrogeles APF:GX después de las 18 horas de gelificación (Fuente propia, 2022).

Para comprender las posibles interacciones entre los componentes de los hidrogeles APF:GX con carga y sin carga de VC, los espectros FTIR de VC, APF, GX e hidrogeles mixtos se muestran en la Figura 5.

La VC tiene numerosas bandas que sirven para su identificación, las cuales se mencionan a continuación. Las bandas observadas a  $3500-3200\text{ cm}^{-1}$  y a  $2990-2920\text{ cm}^{-1}$ , se deben al estiramiento del grupo hidroxilo (OH) y al estiramiento C-H, respectivamente. El estiramiento del grupo carbonilo (C=O) se observa a  $1750\text{ cm}^{-1}$  y la banda a  $1650\text{ cm}^{-1}$  pertenece al estiramiento C=C. Por otro lado, las bandas

entre los números de onda 1271-1113  $\text{cm}^{-1}$  pertenecen al estiramiento C-O-C y la flexión C-OH se puede detectar en 1313  $\text{cm}^{-1}$ , mientras que la flexión C-H se puede observar a 1022, 989 y 869  $\text{cm}^{-1}$ . Finalmente, las bandas de C-C se pueden observar a 819, 752 y 721  $\text{cm}^{-1}$  (Sk & Yue., 2014; Ahmed y col., 2018; Yan y col., 2021). Es de importancia mencionar que las bandas de absorción más representativas de VC son las encontradas a 1750, 1650, 1313 y 1113  $\text{cm}^{-1}$ .

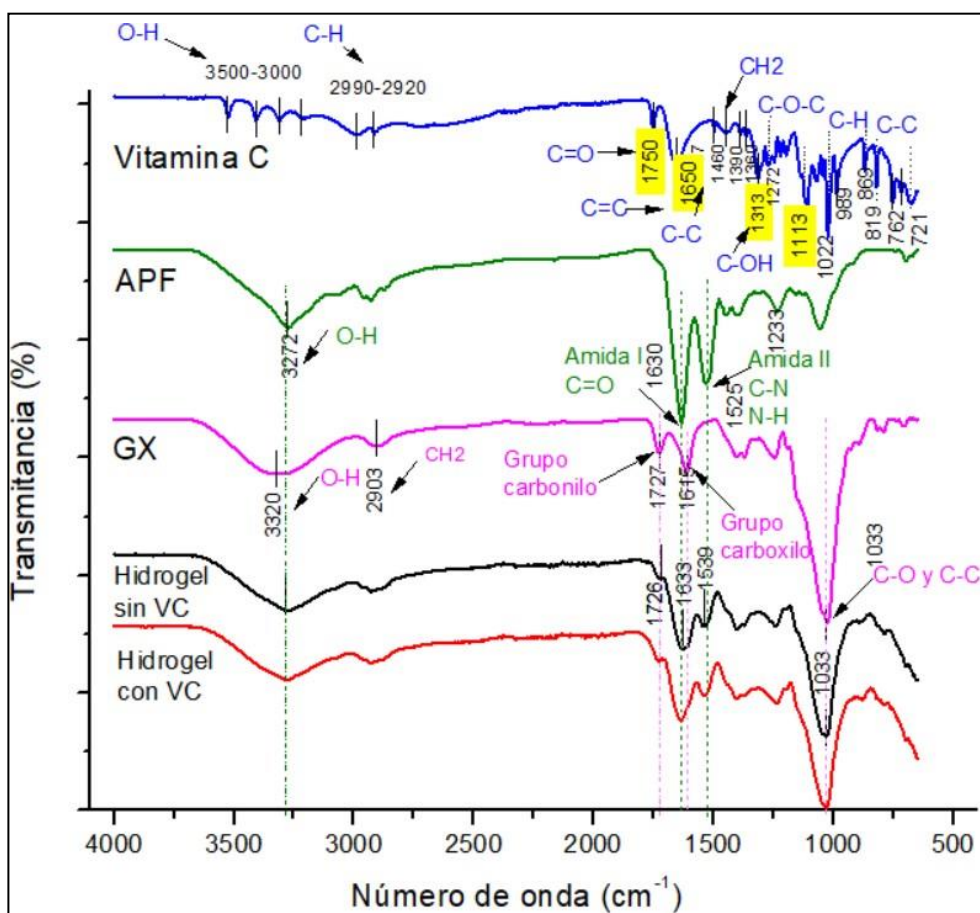


Figura 5. Espectros infrarrojo de VC, APF, GX, hidrogel sin VC e hidrogel con VC.

En cuanto al espectro de APF, los resultados fueron comparables con lo reportado en la literatura. La banda a 3272  $\text{cm}^{-1}$  está relacionada con las vibraciones de estiramiento O-H. La banda a 1630  $\text{cm}^{-1}$  está asociado con la Amida I (vibraciones

de estiramiento C=O), la banda  $1525\text{ cm}^{-1}$  se atribuye a la Amida II (estiramiento CN, flexión NH) y por último la banda  $1233\text{ cm}^{-1}$  pertenecen a bandas de proteínas Amida III (estiramiento CN, flexión NH) (He y col., 2013; Ismael y col., 2019; Moghadam y col., 2021, Cortez y col., 2021).

La goma xantana también muestra varias bandas de interés en su espectro. Las principales bandas presentes en el espectro de GX fueron de  $3322$ ,  $2903$ ,  $1727$ ,  $1615$  y  $1033\text{ cm}^{-1}$ . Las bandas anchas observadas a  $3322\text{ cm}^{-1}$  y  $2903\text{ cm}^{-1}$  se asignan a las vibraciones de estiramiento de los grupos O-H y  $-\text{CH}_2$ ,  $-\text{CH}_3$  alifáticos en GX. Las bandas encontradas a  $1727$  y  $1615\text{ cm}^{-1}$  se deben al grupo carbonilo (C=O) y el grupo carboxilo (COO-) que pertenecen a un grupo acetilo y a un ácido glucurónico, respectivamente. La banda a  $1033\text{ cm}^{-1}$  se debe a la vibración de estiramiento C-O del grupo alcohólico (Santoshi-Kumari y col., 2015). También se ha reportado que el perfil típico de los polisacáridos ha sido visible en el rango de  $920$ - $1100\text{ cm}^{-1}$  en el espectro de goma xantana (estiramiento de enlaces C-O y C-C) (Djenar y col., 2018).

En la Figura 6 se muestran a detalle los espectros infrarrojo de los hidrogeles APF:GX con carga y sin carga de VC. Primero se debe describir qué es lo que sucede en el hidrogel sin VC. La banda observada a  $3280\text{ cm}^{-1}$  puede considerarse como una combinación de los grupos hidroxilo y N-H de GX y APF, respectivamente. Los grupos hidroxilo pueden formar enlaces de hidrógeno, lo cual se ha reportado que confirma la formación del hidrogel (Djenar y col., 2020). Sin embargo, esta banda disminuyó en número de onda y en intensidad respecto a la mostrada en el espectro de GX individual ( $3320\text{ cm}^{-1}$ ) y se mantuvo similar a la de APF ( $3272\text{ cm}^{-1}$ ), esta disminución puede deberse a la presencia de otro tipo de interacciones entre los biopolímeros, como las interacciones electrostáticas entre los grupos funcionales de la proteína y el polisacárido las cuales también participan en la formación del hidrogel (Kurt y col., 2019).

Asimismo, es importante mencionar los cambios que sufrieron los grupos característicos de ambos biopolímeros al formar el hidrogel. En el caso de la GX dos grupos característicos disminuyeron su intensidad, uno fue grupo carbonilo (C=O) y el otro grupo corresponde a la estructura de la GX, los cuales se encuentran en el espectro del hidrogel a  $1726\text{ cm}^{-1}$  y a  $1033\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. La disminución de intensidad de ambos podría deberse a la posible interacción electrostática del grupo carbonilo (negativo) y zonas cargadas positivamente en la proteína originando un cambio en el esqueleto de la GX debido a esta interacción. Además, el grupo característico carboxilo ( $\text{COO}^-$ ) también se vio afectado, sin embargo, este se encuentra superpuesto con la banda Amida I de la proteína (C=O), la banda resultante se observó a  $1633\text{ cm}^{-1}$ .

En el caso del aislado proteico de frijol se vieron afectados los grupos Amida I y II. La banda observada a  $1633\text{ cm}^{-1}$  en el hidrogel sin VC disminuyó su intensidad respecto a la banda Amida I del APF individual. Esta disminución en la intensidad puede asociarse a las interacciones electrostáticas de los grupos negativos (carboxilo) del polisacárido y los grupos positivos (amino) de la proteína (Ran y col., 2021). Además, la banda observada a  $1539\text{ cm}^{-1}$  (corresponde a Amida II) también disminuyó su intensidad. Esta disminución en la intensidad de Amida I y II puede atribuirse a un cambio en la estructura secundaria de la proteína (Szyk-Warszynska y col., 2019).

Para observar más a detalle la interacción entre la superposición entre el grupo Amida I (C=O) y grupo carboxilo ( $\text{COO}^-$ ), se realizó un análisis de segunda derivada de los espectros expresados como absorbancia (Figura 7). El análisis se realizó entre la región  $1635\text{-}1615\text{ cm}^{-1}$ . El espectro del hidrogel sin VC disminuyó su intensidad respecto al espectro de APF y se mantiene similar al de la GX con ligeras modificaciones, lo que confirma una gran disminución del grupo Amida I al formar interacciones electrostáticas con GX (Sizeland y col, 2018).

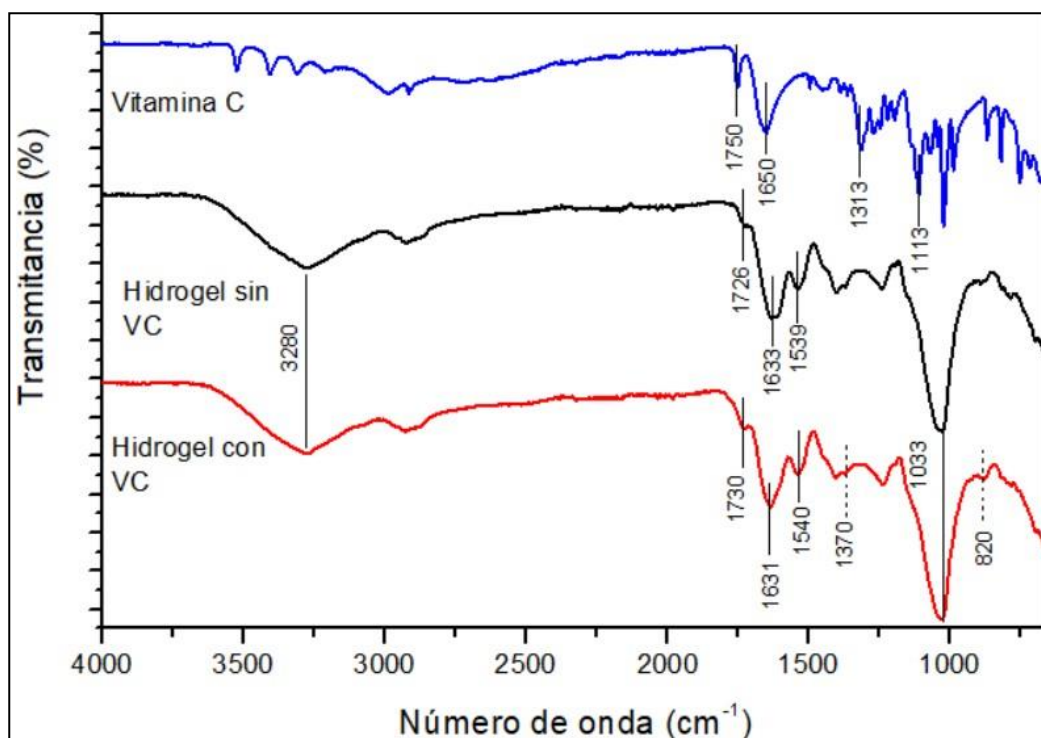


Figura 6. Espectros FTIR de VC, hidrogel APF:GX con y sin VC.

Finalmente, se describe el espectro del hidrogel APF:GX cargado con VC (Figura 6), el cual muestra un espectro muy similar al hidrogel sin VC con algunos cambios sutiles pero importantes de explicar. La similitud de ambos geles puede indicar que se mantienen mayormente las interacciones intermoleculares aún con la adición de VC. Por otra parte, el espectro del hidrogel cargado con VC mostró cambios evidentes en los grupos funcionales respecto a la VC individual. Por ejemplo, en el rango de 3600-2800  $\text{cm}^{-1}$  se mantiene similar al hidrogel sin VC, con una ligera disminución en la intensidad de la banda, lo que puede indicar una disminución en los enlaces de hidrógeno sin embargo no llegan a percibirse las bandas agudas como las del espectro de la VC individual. La banda a 1730  $\text{cm}^{-1}$  aumentó ligeramente su intensidad en comparación con la del hidrogel sin VC, este aumento podría deberse a la coincidencia del estiramiento del grupo carbonilo de la VC y de la GX (Yan y col., 2021). En la banda a 1631  $\text{cm}^{-1}$  (correspondiente a la Amida I de la proteína la cual

se traslapa con el grupo carboxilo de GX), no hubo cambio notable en la intensidad, pero sí hubo una disminución en el ancho de la banda. El análisis de segunda derivada (Figura 7) muestra que el espectro de hidrogel con VC retoma ligeramente una forma más similar a la de APF individual, esto puede indicar que se vieron afectadas las interacciones electroestáticas entre de APF y GX. Por otra parte, la banda a  $1033\text{ cm}^{-1}$  (correspondiente a la disposición molecular de las cadenas la GX) (Figura 6), no se vio afectada por la adición de la vitamina C, lo cual indica que la estructura de la GX se mantuvo igual que en el hidrogel control (Hoyos-Leyva y col 2018).

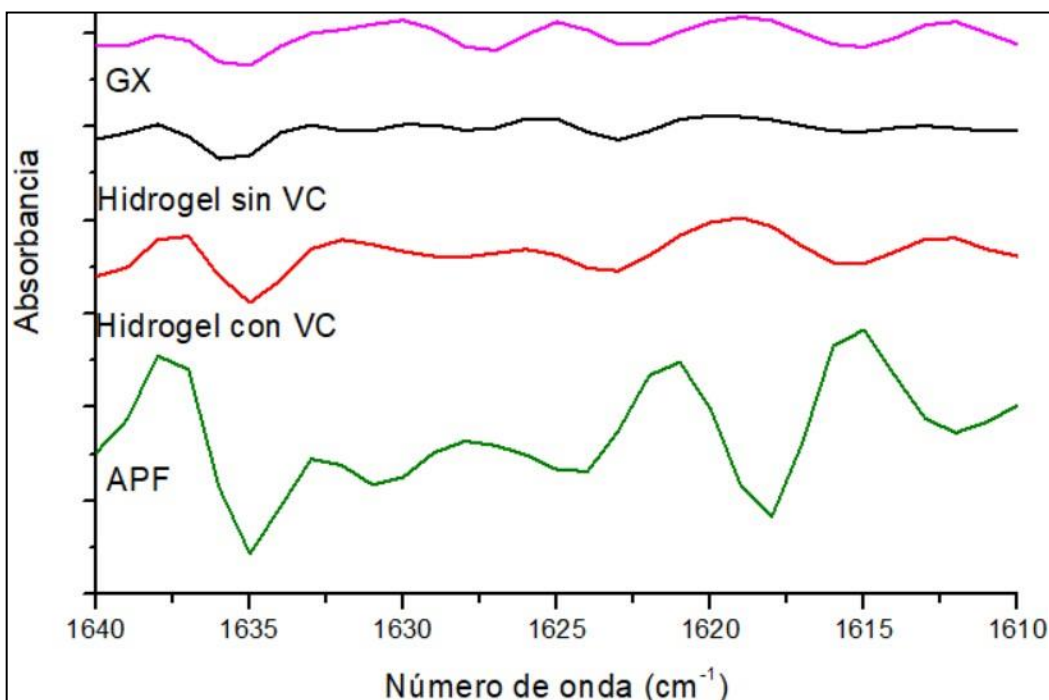


Figura 7. Segunda derivada de espectros infrarrojo de APF, GX, hidrogeles APF: GX con y sin VC.

Continuando con la Figura 6, entre las zonas de  $1370/1130\text{ cm}^{-1}$  y  $950/820\text{ cm}^{-1}$  del hidrogel APF:GX con VC respecto al hidrogel APF:GX sin VC las bandas se mantienen muy similares, aumentando ligeramente su intensidad, esto podría



deberse a la presencia de los grupos de bandas agudas (C-O y C-H) de la VC individual. En cambio, la única zona con importancia que disminuyó de intensidad respecto al hidrogel sin VC fue la banda a  $1540\text{ cm}^{-1}$  (correspondiente a la Amida II de la proteína), pudiendo indicar algún cambio en la estructura secundaria de la proteína o una disminución en las interacciones electrostáticas en donde participan los grupos de la Amida II (Hoyos-Leyva y col., 2018).

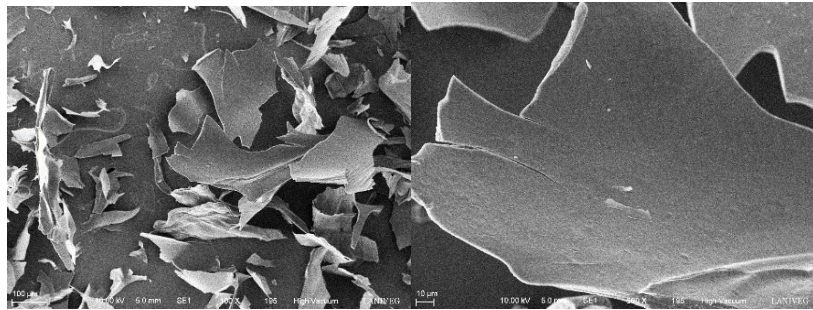
Adicionalmente, al ser la VC encapsulada, sus bandas de absorción características ( $1750$ ,  $1650$ ,  $1313$  y  $1113\text{ cm}^{-1}$ ) no fueron evidentes en el espectro del hidrogel con VC y quedaron sobrepuestas en las bandas formadas por APF y GX. La única banda característica de VC que disminuyó notablemente su intensidad al encapsularse fue la de  $1313\text{ cm}^{-1}$ , esta banda corresponde al grupo C-OH lo que sugiere su unión por puentes de hidrógeno a la matriz del hidrogel.

Por otro lado, debido a que el espectro del hidrogel APF:GX con VC es más parecido al del hidrogel control (sin VC) que al de la VC individual, sugiere una interacción entre los grupos hidrofílicos de la VC y los grupos hidrofílicos de los biopolímeros (amino, carbonilo) de acuerdo con Song y col., (2022).

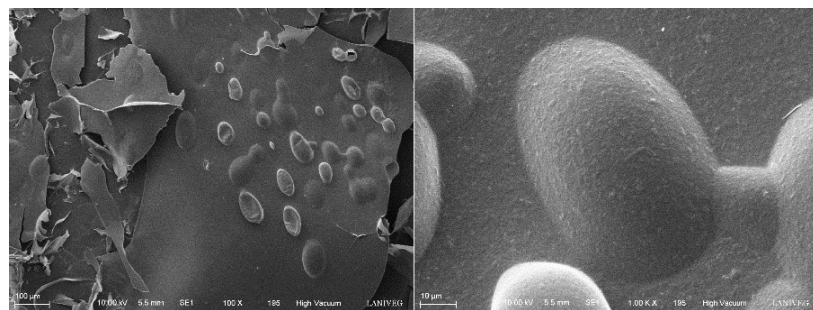
Esta interacción conduce a la alteración de las frecuencias vibratorias de los grupos funcionales de la VC y ocasiona una superposición con los grupos de los polímeros (Lai y col., 2015). Además, Hoyos-Leyva y col., (2018), reportaron ligeros cambios en el número de onda de las bandas características de la VC y una disminución en su intensidad al ser microencapsulada con almidón. Estos autores atribuyeron estos resultados a la formación de enlaces de hidrógeno entre la VC y el almidón el cual es rico en grupos hidroxilo (OH) presentes en su unidad monomérica (D-glucosa). Adicionalmente, Nesterenko y col., (2014) mencionan que las proteínas de soya pueden encapsular eficientemente VC con una eficiencia de retención de 91.8 %,

debido al carácter hidrofílico del aislado proteico de soya, y, por tanto, la formación de puentes de hidrógeno con la VC.

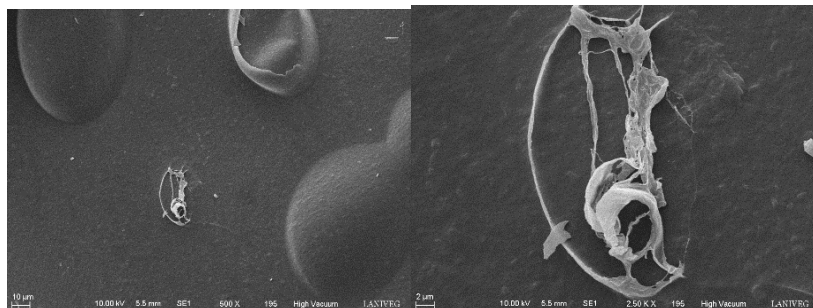
## 5.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB)



5.2.1 Hidrogel sin VC



5.2.2 Hidrogel con VC



5.2.3 Aglomerado GX

Figura 8. Micrografías MEB de geles APF: GX liofilizados (a) Hidrogel sin VC, (b) Hidrogel con VC, (c) Aglomerado GX.

Las microestructuras de los hidrogeles APF:GX liofilizados con carga y sin carga de VC se muestran en la Figura 8. El hidrogel sin VC (Figura 8a) mostró estructuras que se han denominado en la literatura como una “estructura aglomerada” las cuales son comunes en partículas que han sufrido liofilización (Talita y col., 2015). Este tipo de estructura es similar a las estructuras de otros geles mixtos (proteína - polisacárido). Por ejemplo, en la investigación desarrollada por Yang y col., 2022 obtuvieron geles de proteína de coco (CP) y goma xantana, en donde observaron por MEB una estructura de gel densa con poros pequeños. Estos autores reportaron a las interacciones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas como las fuerzas principales responsables de la formación de los geles CP-GX.

Por otro lado, la Figura 8b muestra las estructuras de los hidrogeles APF:GX con VC, las cuales son muy similares a las del hidrogel sin VC. Sin embargo, la diferencia se encuentra en la formación de una estructura ovoide sobre la estructura aglomerada formada por la APF y la GX, esto podría indicar que la VC se unió a ambos polímeros por medio de puentes de hidrógeno, como se mencionó anteriormente. Da Cruz y col, (2022) realizaron una microencapsulación VC en un sistema de gelatina y pectina, en sus resultados, mostraron micrografías de microcápsulas con paredes continuas y sin grietas y poros, similares a las realizadas en este trabajo. Sin embargo, no fue posible comparar las micrografías obtenidas en este trabajo con otros artículos en donde se encapsule VC en hidrogeles ya que existe poca investigación respecto a la encapsulación de esta vitamina en hidrogeles mixtos.

En la Figura 8c se muestran las micrografías en donde se observan un aglomerado blanco al añadir la VC al hidrogel APF: GX. Este aglomerado es similar a las microestructuras mostradas en el artículo de Amaral y col., (2021), los autores describen una muestra de GX pura, como una estructura filamentosa delgada y homogénea, con apariencia de “hojas” separadas. Esto sugiere que la adición de la VC pudo afectar la interacción de la GX con la APF.

### 5.3 Capacidad de retención de agua (CRA) y sinéresis

La CRA y la sinéresis de los hidrogeles APF: GX con y sin carga de VC se muestran en el Cuadro 3. La CRA promedio de los geles sin VC fue de  $92.60 \pm 5.48\%$ , mientras que los geles con VC presentaron un valor de  $90.87 \pm 5.44\%$ . Como se observa, al añadir VC la CRA del gel disminuyó. La CRA depende de varios factores, como el tamaño de poro del gel, de las características de los biopolímeros empleados y de la interacción específica entre las moléculas de agua y las cadenas de polímeros (Thivya y col., 2022). El gel al estar formado por una red de polímeros con grupos hidrófilos tiene una alta afinidad hacia el agua, lo cual refleja una mayor CRA. En cambio, la VC, causó una disminución en su capacidad de retener agua, esto puede deberse a que el agua encontrada entre las cadenas de los polímeros se vio reemplazada por la VC, al ser una vitamina hidrofílica, los grupos hidrofílicos de los polisacáridos forman enlaces de hidrógeno con la vitamina, disminuyendo la interacción y retención de los polímeros con el agua (Zahra y Mehdi, 2020). Además, los hidrogeles con VC tienden a tener una textura más heterogénea que los hidrogeles sin VC como se demostrará más adelante. Se sabe que una disminución en la CRA se puede deber a la formación no homogénea en el gel (Du y col., 2021).

En cuanto a los resultados del porcentaje de sinéresis de los geles, la pérdida de agua de la red de gel aumentó cuando se añadió la vitamina C. El hidrogel sin VC tuvo un valor de  $0.29 \pm 0.04 \%$ , y el gel con vitamina tuvo un valor menor ( $0.97 \pm 0.04 \%$ ). Estos resultados concuerdan con lo obtenido en la CRA y además confirman que la adición de la VC aumenta la pérdida del agua de los geles (Kruif y col., 2015).

Además, el análisis estadístico realizado indica que existe una diferencia significativa en el porcentaje de sinéresis, ya que la pérdida de agua fue mayor en el hidrogel con VC. En cambio, en cuanto a la capacidad de retención de agua no hay una diferencia

significativa ya que los porcentajes de CRA son similares, siendo menor el porcentaje en el hidrogel con VC.

Cuadro 3. CRA y sinéresis de las muestras de hidrogel APF: GX con y sin VC.

| Muestra         | CRA (%)      | Sinéresis %  |
|-----------------|--------------|--------------|
| Hidrogel sin VC | 95.18 ± 2.25 | 0.29 ± 0.04* |
| Hidrogel con VC | 92.95 ± 4.30 | 0.97 ± 0.04  |

Los resultados son el promedio ± D.E. de tres determinaciones.

Los datos de las muestras fueron comparados contra los controles utilizando el método de Dunnet. Los asteriscos (\*) representan la diferencia significativa de las muestras de hidrogel con VC comparados con el control (Hidrogel sin VC). Valor p significativo < 0.05.

#### 5.4 Propiedades reológicas y fuerza de los hidrogeles

El módulo de almacenamiento ( $G'$ ), el módulo de pérdida ( $G''$ ) y la tangente  $\delta$  ( $\tan \delta = G''/G'$ ) del hidrogel APF:GX con carga y sin carga de VC se presentan en la Figura 9. Se observa que ambos geles muestran un módulo de almacenamiento mayor al módulo de pérdida, esto indica que ambas muestras tienen una naturaleza de gel. Para que un material se considere como gel, el componente sólido o elástico ( $G'$ ) debe ser mayor que el componente líquido o viscoso ( $G''$ ) (Priya y col., 2015). Además, es importante mencionar que un gel es considerado como “verdadero” cuando en su régimen de viscoelasticidad lineal sus módulos de elasticidad y viscoso son independientes de la frecuencia (Vargas y col, 2008). Comparando el módulo de almacenamiento de ambas muestras, el hidrogel con VC presenta una mayor dependencia hacia la frecuencia en comparación con el hidrogel sin VC.

En la Figura 9, fue posible observar que ambos geles obtuvieron valores de  $\tan \delta$  menores a 1, indicando que tienen un comportamiento elástico (Moniri y col., 2020). Sin embargo en el caso del gel sin VC más de la mitad de los valores fueron < 0.1 en cambio para el gel con VC, la mayoría de sus valores fueron > 0.1 y de acuerdo con

Moniri y col., (2020) los valores de  $\tan \delta$  superiores a 0.1 definen que las muestras no son un gel verdadero y su estructura está entre la de un biopolímero concentrado y un gel real.

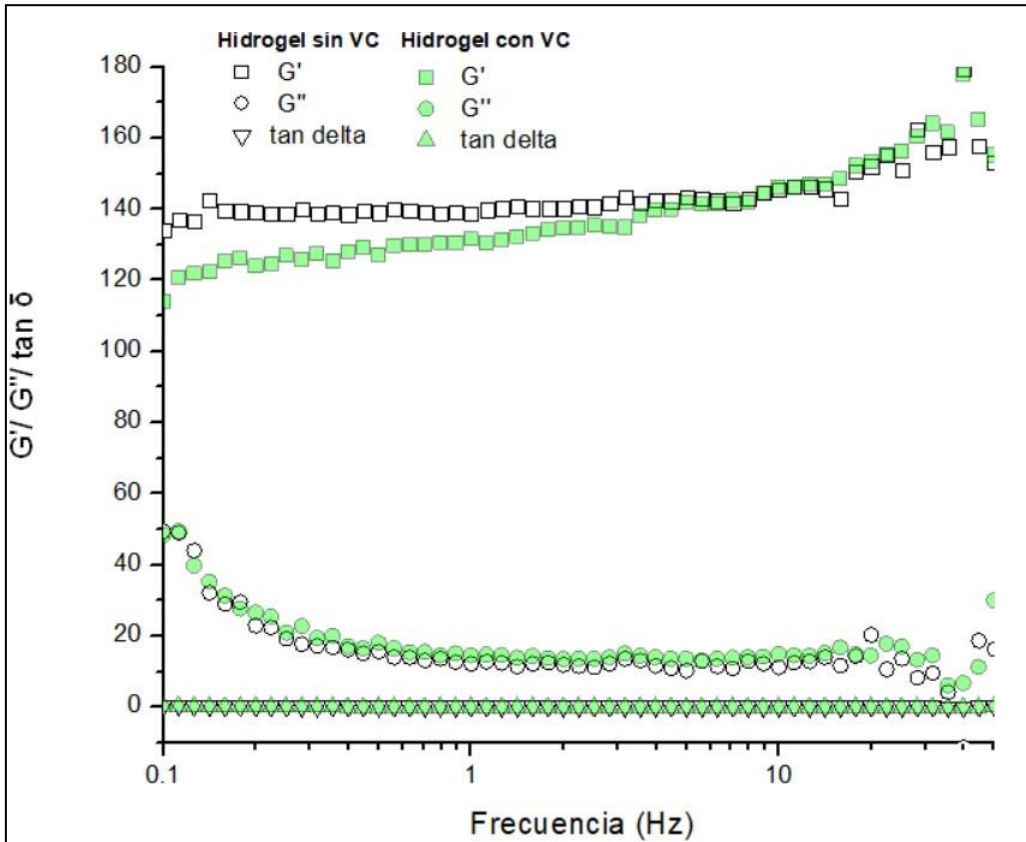


Figura 9. Variación de  $G'$ ,  $G''$  y  $\tan \delta$  con la frecuencia (Hz) de hidrogeles APF:GX con y sin VC.  $G'$  módulo de almacenamiento, Pa.  $G''$  módulo de pérdida, Pa. \*Zona de viscoelasticidad lineal hasta 10 Hz.

Para verificar la dependencia de la frecuencia del módulo elástico de los geles obtenidos se implementó el modelo de Ley de potencia y se obtuvo la constante de este modelo la cual representa la dependencia de  $G'$  frente a la frecuencia (Figura 10). Este valor aporta información respecto a las interacciones entre los polímeros que forman el hidrogel. Si los valores tienden a 0, se considera un gel fuerte, en

cambio si este valor va en aumento, se considera que disminuye la fuerza del gel (Ibarra y col., 2014). En este trabajo ambas muestras dan valores menores a 1, (0.00915 y 0.03872 con y sin VC respectivamente). Sin embargo, es importante mencionar que este modelo se ajustó mejor a los datos del gel con VC al tener un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0.9479, en cambio el valor de  $R^2$  del gel sin VC fue de 0.65097, indicando que este modelo no se ajustó a este gel al tener características de un gel más fuerte.

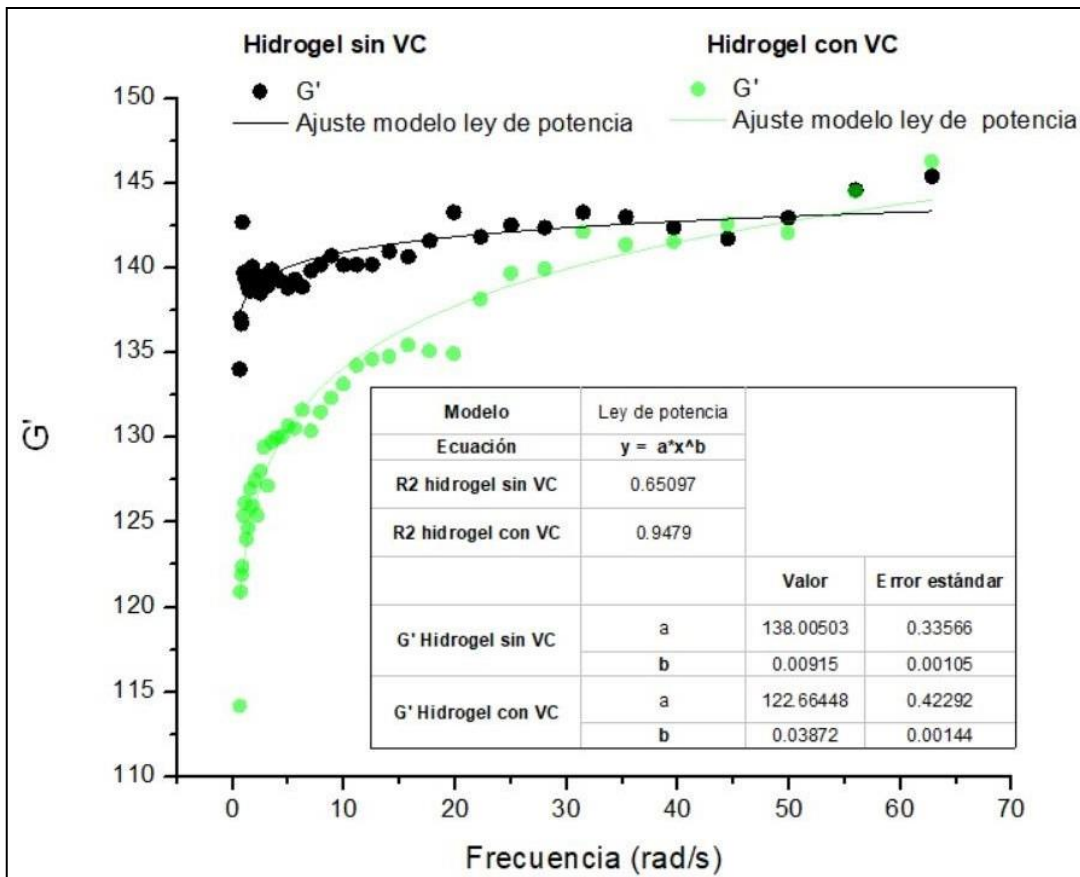


Figura 10. Ajuste de datos experimentales de  $G'$  en función de la frecuencia al modelo de Ley de potencia para los hidrogel APF:GX con y sin VC. Se tomaron en cuenta solo los valores de frecuencia en la región de viscoelasticidad lineal.

Otras investigaciones que han trabajado con hidrogeles mixtos han obtenido valores similares de dependencia de la frecuencia, por ejemplo, Priya y col., (2015) mencionan que hidrogeles de quitina-agarosa tuvieron valores de dependencia menores a 1. Además, Zhang y col., (2021) informaron valores entre 0.015 y 0.09 en geles de aislado de proteína de soya y carragenina, en donde encapsularon un compuesto hidrofílico.

Por otro lado, la fuerza máxima presenta la dureza y consistencia de un hidrogel (Hurler y col., 2012), y representa el trabajo necesario para romper los enlaces internos del material (Wroblewska y col., 2019). En este trabajo, la fuerza máxima de los geles fue de 0.063 N para el gel sin VC y 0.047 N para el gel cargado con VC (Cuadro 4). Asimismo, el análisis estadístico observado en el Cuadro 4 confirma que existe una diferencia significativa de fuerza entre ambos hidrogeles. Estos resultados indican que se requirió de una mayor fuerza para romper los enlaces internos del gel sin VC. En cambio, en el caso del gel con VC se requirió aplicar una menor fuerza para romper sus enlaces internos, pudiendo indicar que existe una cantidad menor de enlaces que conforman la estructura del gel o que sus interacciones son más débiles en comparación con el gel sin VC. Estos resultados se pueden relacionar con el análisis FTIR, el cual demuestra una disminución en las bandas Amida I y II al añadir VC al gel, esta disminución puede estar relacionada con una disminución en las interacciones electroestáticas que conforman estos hidrogeles.

Resultados similares se han reportado en hidrogeles formulados con polisacáridos, y al añadirles VC, estos se vuelven más débiles debido a una disminución de las interacciones moleculares en el interior del hidrogel (Niknam y col., 2022)



Cuadro 4. Fuerza de los hidrogeles APF: GX con y sin VC.

| Muestra         | Fuerza (N)     |
|-----------------|----------------|
| Hidrogel sin VC | 0.092 ± 0.027  |
| Hidrogel con VC | 0.049 ± 0.007* |

Los resultados son el promedio ± D.E. de tres determinaciones.

Los datos de las muestras fueron comparados contra los controles utilizando el método de Dunnet. Los asteriscos (\*) representan la diferencia significativa de las muestras de hidrogel con VC comparados con el control (Hidrogel sin VC). Valor p significativo < 0,05

### 5.5 Capacidad antioxidante

El Cuadro 5 muestra la capacidad antioxidante de los hidrogeles con y sin carga de VC. De igual manera en la Figura 11 se muestran los porcentajes de inhibición del radical (% de inhibición). Estas propiedades se determinaron a través de los ensayos DPPH y ABTS.

De acuerdo con los resultados del ensayo DPPH, los hidrogeles APF:GX cargados con VC a las 18, 36, 72 y 84 horas de gelificación presentaron capacidad antioxidante de 91.95 ± 1.18 %, 90.28 ± 2.72 %, 92.18 ± 0.80 % y 93.41 ± 1.34 % respectivamente. En los resultados de ABTS los hidrogeles cargados de VC a las 18, 36, 72 y 84 horas de gelificación presentaron capacidad antioxidante de 96.73 ± 0.50 %, 96.55 ± 0.89 %, 96.78 ± 0.29 y 96.74 ± 0.60 %, respectivamente. Además, como se observa en la Figura 10 en ambos ensayos, todas las muestras de hidrogel sin VC exhibieron una capacidad antioxidante mucho menor que las muestras de hidrogel con VC. Lo cual indica que efectivamente la VC está ejerciendo una capacidad antioxidante al añadirse a los geles. Esto fue un resultado que se esperaba ya que la VC es un poderoso antioxidante debido a su capacidad para donar átomos de hidrógeno para neutralizar los radicales libres (Coelho y col., 2022).

Por otra parte, se analizó la capacidad antioxidante de soluciones de VC control, las cuales experimentaron las mismas condiciones que los hidrogeles para su

evaluación. Estas condiciones, como se menciona en la metodología, fueron diferentes tiempos de almacenamiento (18, 36, 72 y 84 horas) a temperatura ambiente, la adición del metanol y agitación (ultraturrax). A pesar de experimentar las mismas condiciones que los hidrogeles, las soluciones de VC control tuvieron una capacidad antioxidante mayor que los hidrogeles cargados con la vitamina. Estos resultados podrían indicar que un tiempo de almacenamiento de hasta 84 horas a temperatura ambiente, el contacto con el oxígeno (por el uso del ultraturrax) y la adición de metanol no fueron los factores causantes de la disminución del % de inhibición del hidrogel con VC. En cambio, las condiciones que pudieron ocasionar la disminución en el % de inhibición en los geles con VC, fueron dos factores que no experimentó la solución de VC control. Uno fue la presencia de los polímeros en el gel, (los cuales no están presentes en solución de VC), en este caso la VC interacciona con los polímeros (como se discutió en los resultados anteriores), pudiendo cambiar la capacidad antioxidante de la VC al estar encapsulada. Song y col., (2022) mencionan que las interacciones no covalentes de las antocianinas (antioxidantes) con proteínas y/o carbohidratos podrían afectar las propiedades de las antocianinas, incluida la biodisponibilidad y la eliminación de radicales.

El segundo factor que pudo ocasionar la disminución en el % de inhibición del hidrogel con VC fue cambio de pH que sufre la VC al incorporarse al gel. Como ya se mencionó, la VC es un compuesto sensible a ciertos factores como altas temperaturas, pH alcalinos, luz, oxígeno y tiempo de almacenamiento, entre otros (Yin y col., 2022). Estos factores podrían deteriorar su capacidad antioxidante incluso conducir a la formación de compuestos tóxicos (Lai y col., 2015). Como se menciona en la metodología, la VC se añadió junto con GDL a la mezcla de APF:GX, esta mezcla (APF:GX) se encuentra a un pH alcalino (pH 10) y el pH final del hidrogel (APF:GX:GDL:VC) es de 4, no obstante, la VC tiene un breve contacto con la mezcla alcalina (APF:GX), lo cual pudo afectar a la vitamina. Para explicar esto, Farah y col., (2020), evaluaron el contenido de VC en distintas condiciones e investigaron el efecto

de los diferentes valores de pH (3.4, 4.6, 7.5 y 8.1) sobre el contenido de VC en medios acuosos. El pH con valores de 3.4 y 4.6 no tuvo un efecto significativo sobre el contenido de la VC. En comparación, los valores de pH más altos, 7.5 y 8.1, redujeron significativamente el contenido de VC en comparación con el control (pH 5.6). Estos autores también evaluaron el contenido de VC después de 24, 72, 168 y 240 horas a 4°C, ellos mencionan que un día de almacenamiento a 4°C no tuvo un efecto significativo sobre el contenido de VC, sin embargo, el almacenamiento a la misma temperatura durante 72, 168 y 240 horas redujo significativamente el contenido de VC en comparación con el control. La pérdida porcentual de vitamina C se encontró muy cerca a las 72, 168 y 240 horas. Sus resultados indican que el tiempo de almacenamiento es un factor que disminuye la cantidad de VC. No obstante, como se mencionó anteriormente, los resultados de la capacidad antioxidante obtenidos en este trabajo parecen indicar que un tiempo de almacenamiento de hasta 84 horas a temperatura ambiente no afecta a la VC (a menos que se contamine la muestra), aunque se debe tener en cuenta que tiempos de almacenamiento largos sí pueden afectar a la VC.

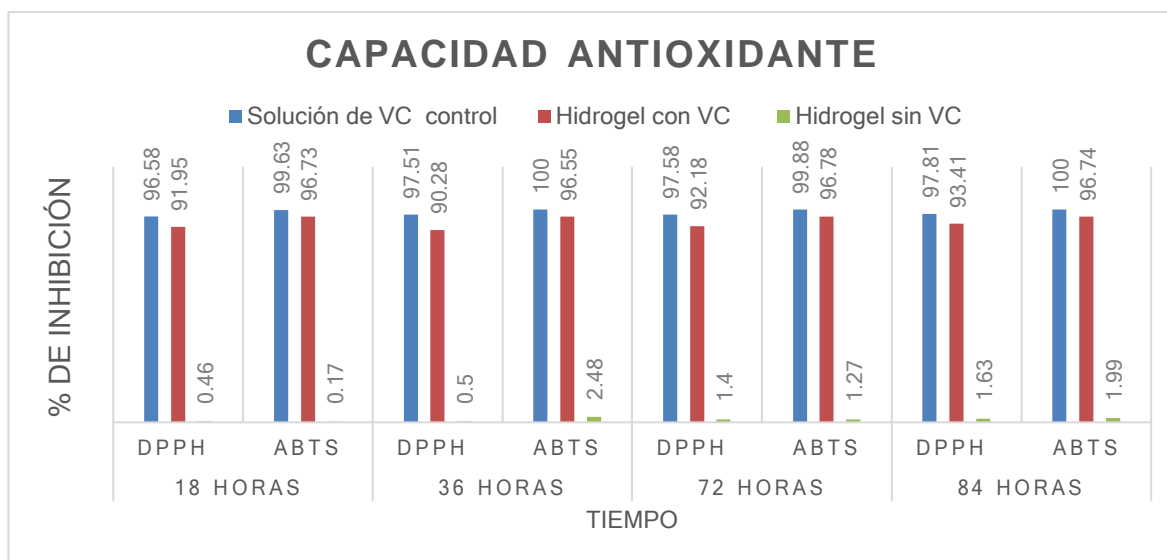


Figura 11. Capacidad antioxidante de una solución de vitamina C y de hidrogeles APF:GX con y sin VC.

Cuadro 5. Capacidad antioxidante de hidrogeles APF: GX con y sin VC.

| Muestra                | % de inhibición <sup>1</sup> |                             |                             |                             |                             |                             |                             |                             |
|------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                        | 18 horas                     |                             | 36 horas                    |                             | 72 horas                    |                             | 84 horas                    |                             |
|                        | DPPH                         | ABTS                        | DPPH                        | ABTS                        | DPPH                        | ABTS                        | DPPH                        | ABTS                        |
| Solución control de VC | 96.93 ± 0.95 <sup>a</sup>    | 99.63 ± 0.52 <sup>a</sup>   | 97.51 ± 0.51 <sup>a</sup>   | 100 ± 0.00 <sup>a</sup>     | 97.58 ± 1.02 <sup>a</sup>   | 99.88 ± 0.21 <sup>a</sup>   | 97.81 ± 0.93 <sup>a</sup>   | 100 ± 0.00 <sup>a</sup>     |
| Hidrogel con VC        | 91.95 ± 1.18 <sup>a**</sup>  | 96.73 ± 0.50 <sup>a**</sup> | 90.28 ± 2.72 <sup>a**</sup> | 96.55 ± 0.89 <sup>a**</sup> | 92.18 ± 0.80 <sup>a**</sup> | 96.78 ± 0.29 <sup>a**</sup> | 93.41 ± 1.34 <sup>a**</sup> | 96.74 ± 0.60 <sup>a**</sup> |
| Hidrogel sin VC        | 0.46 ± 0.69 <sup>a</sup>     | 0.23 ± 0.34 <sup>a</sup>    | 0.50 ± 0.40 <sup>a</sup>    | 2.48 ± 2.30 <sup>a</sup>    | 1.40 ± 2.01 <sup>a</sup>    | 1.27 ± 1.40 <sup>a</sup>    | 1.63 ± 2.31 <sup>a</sup>    | 1.99 ± 2.82 <sup>a</sup>    |

<sup>1</sup>% inhibición: representa el porcentaje de inhibición del radical.

Los resultados son el promedio ± D.E. de tres determinaciones.

Los datos de cada experimento a cada tiempo fueron analizados estadísticamente por el método Tukey.

Las letras diferentes representan diferencias significativas

Los datos de las muestras fueron comparados contra los controles utilizando el método de Dunnet.

Los asteriscos (\*) representan la diferencia significativa de las muestras de hidrogel con VC comparados con el control (Solución control de VC) para cada experimento y para cada tiempo.

Los asteriscos en rojo (\*) representan la diferencia significativa de las muestras de hidrogel con VC comparados con el control (Hidrogel sin VC) para cada experimento y para cada tiempo.

Valor p significativo < 0.05

Por otro lado, Baek y col., (2021) obtuvieron comportamientos similares a los observados aquí. Este grupo de trabajo encapsuló VC en nanocápsulas (hechas de quitosano modificado con cloruro de glicidiltrimetilamonio y añadiendo trifosfato de sodio (VC-GCh-TPP)) y determinaron su capacidad antioxidante por DPPH (lectura a 30 min). Las nanocápsulas con VC tuvieron una capacidad antioxidante menor en comparación que la VC libre. Sin embargo, una mayor capacidad antioxidante de la VC libre correspondió a una menor capacidad de encapsulación de las nanocápsulas y viceversa, lo que sugiere para este trabajo que la disminución en la capacidad antioxidante observada en los geles APF:GX cargados con VC puede deberse en parte a la encapsulación que está sufriendo la vitamina dentro de la red del gel.

Por último, al analizar estadísticamente los resultados mostrados en el Cuadro 5, se confirma que existen diferencias significativas entre la capacidad antioxidante del hidrogel cargado con VC contra la capacidad antioxidante del hidrogel sin VC y con la solución de VC, estos dos últimos fueron tomados como controles para comparaciones por separado con el gel cargado con VC. Para ambos ensayos (DPPH y ABTS) a los distintos tiempos, los hidrogeles con VC tienen una capacidad antioxidante mayor que los hidrogeles sin VC pero tienen una capacidad antioxidante menor que la solución de VC pura.

Además, el análisis estadístico, confirmó que el tiempo estudiado en este trabajo no es un factor que afecte la capacidad antioxidante de los hidrogeles con VC, ya que para cada ensayo (DPPH y ABTS) y a los diferentes tiempos no hubo diferencias significativas en el porcentaje de inhibición.

## 6. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio muestran cómo es el comportamiento de hidrogeles mixtos (APF:GX) al agregarles un antioxidante hidrofílico (VC). Los espectros FTIR demuestran que existen interacciones no covalentes (electroestáticas y enlaces de hidrogeno) en los hidrogeles mixtos y al añadir VC a la mezcla de APF y GX existen interacciones entre los grupos hidrofílicos, formando puentes de hidrógeno, esto beneficia la retención de la VC en el hidrogel, pero es posible que se vean afectadas y disminuidas las interacciones electroestáticas entre APF y GX por la adición de VC. El MEB muestra estructuras ovoides sobre la matriz del hidrogel, pudiéndose tratar de la VC interaccionando con APF y GX, sin embargo, es posible que la VC haya afectado ligeramente a la estructura de APF y la interacción entre APF y GX, como se muestra en los resultados FTIR. También la adición de VC, ocasionó una disminución en la retención del agua, una disminución en la fuerza y además aumentó la dependencia del módulo de almacenamiento hacia frecuencia, esto indica que el hidrogel con VC fue un gel menos fuerte, pero a pesar de esto, conservó sus características de gel al tener un módulo de almacenamiento mayor al módulo de pérdida. Por último en el ensayo de capacidad antioxidante se puede concluir que un cambio de pH (alcalino) y la interacción de polímeros con la VC, posiblemente fueron los responsables de disminuir el porcentaje de inhibición de los radicales DPPH y ABTS, esto se debe a que la VC es una molécula altamente sensible y con baja estabilidad a diversas condiciones ambientales (por ejemplo, temperatura, pH, oxígeno, luz y humedad). A pesar de haber obtenido geles más débiles por la adición de la VC, los hidrogeles conservaron su carácter de gel y su capacidad de retención de agua y capacidad antioxidante tuvieron valores de aproximadamente 90%, estos resultados son resultados prometedores para poder seguir realizando más experimentaciones con este tipo de hidrogeles.

Finalmente, al existir poca investigación respecto a la encapsulación de la vitamina C en hidrogeles mixtos, sería necesario realizar más estudios, como la simulación de condiciones gastrointestinales, para determinar la cantidad de VC bioaccesible tras su consumo. Por otra parte, sería de utilidad evaluar la encapsulación de otros compuestos antioxidantes menos sensibles a pH alcalino como el usado en la preparación de los geles mixtos, esperando que la actividad antioxidante no disminuya.

## 7. REFERENCIAS

**Abbas S**, Chang D, Hayat K, Zhang X. Ascorbic acid: Microencapsulation techniques and trends – A review. *Food Rev Int* **2013**; 28:343-374.

**Acar H & Kurt A**. Purified saled glucomannan synergistically interacted with xanthan gum: Rheological and textural studies on a novel pH-/thermo-sensitive hydrogel. *Food Hydrocoll* **2019**; 101: 105463.

**Aguilera-Garca C.M**, Barberá-Mateos J.M, Esperanza-Diaz L, Duarte de Prato A., Gálvez-Peralta J, Gil-Hernández A, et al. Alimentos funcionales aproximación a una nueva alimentación. Madrid: Dirección General de Salud Pública y Alimentación, **2007**:172-173.

**Ahmed-Wani T**, Gani-Shah A, Mohd-Wani S, Ahmed-Wani I, Ahmad-Masoodi F, Nissar, N et al. Suitability of different food grade materials for the encapsulation of some functional foods well reported for their advantages and susceptibility. *Crit Rev Food* **2015**; 56: 2431-2454.

**Ahmed I**, Haque A, Bhattacharyya S, Patra P, Plaisier J.R, Perissinotto F, Bal J.K. Vitamin C/Stearic acid hybrid monolayer adsorption at air-water and air-solid interfaces. *ACS Omega* **2018**; 3: 15789-15798.

**Amaral C.N.R**, Oliveira P.F. Pedroni L.G, Mansur C.R. E. Viscoelastic behavior of hydrogel-based xanthan gum/aluminum lactate with potential applicability for conformance control. *J Appl Polym Sci* **2021**; 138: 50640.

**Baek J**, Ramasamy M, Willis N.C, Kim D.S, Anderson W.A, Tam, K.C. Encapsulation and controlled release of vitamin C in modified cellulose nanocrystal/chitosan nanocapsules. *Current Research in Food Science* **2021**; 4: 215-223.



**Bourbon** A, Pereira N, Pastrana L, Vicente A, Cerqueira, M. Protein-based nanostructures for food applications. *Gels* **2019**; 5: 9.

**Cheng** H, Zhang Xu, Sicheng L. Preparation of xanthan gum-based composite hydrogels with aligned porous structure. *Bioresources* **2020**;15: 5627–5640.

**Cortez-Trejo** M. C, Mendoza S, Loarca-Piña G, Figueroa-Cárdenas J. D. Physicochemical characterization of protein isolates of amaranth and common bean and a study of their compatibility with xanthan gum. *Int J Biol Macromol* **2021**; 166:861-868.

**Coelho** S.C, Estevinho B.N, Rocha F. Recent advances in water-soluble vitamins delivery systems prepared by mechanical processes (Electrospinning and spray-drying techniques) for food and nutraceuticals applications—A review. *Foods* **2022**; 11: 1271.

**Comunian** T.A, Thomazini M, Gouvêa-Alves A.J, Eustáquio de Matos Junior F, de Carvalho-Balheiro J.C, Favaro-Trindade, C.S. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. *Int. Food Res J* **2013**; 52: 373-379.

**da Cruz** M.C.R, Perussello C.A, Masson M.L. Microencapsulated ascorbic acid: Development, characterization, and release profile in simulated gastrointestinal fluids. *J Food Process Eng* **2018**; 41: e12922.

**Djenar** N.S & Mulyono E.W. The effect of growth medium composition on *X. campestris* metabolism in producing xanthan gum. *MATEC Web Conf* **2016**; 156: 01012.

**Du M, Lu W, Zhang Y, Mata A, Fang Y.** Natural polymer-sourced interpenetrating network hydrogels: Fabrication, properties, mechanism and food applications. *Trends Food Sci Technol* **2021**; 116: 342-356

**Esposito L, Barbosa A, Moniz T, Costa S, Costa P, Christian C et al.** Design and characterization of sodium alginate and poly(vinyl) alcohol hydrogels for enhanced skin delivery of quercetin. *Pharmaceutics* **2020**;12: 1149

**Espinosa-Andrews H, García-Márquez E.** Tecnologías de nano/microencapsulación de compuestos bioactivos. Guadalajara: CIATEJ, **2017**: 137-143.

**Farah H.S, Alhmoud J.F, Al-Othman A, Alqaisi, K.M, Atoom A.M, Shadid K , Shakya A,, AlQaisi, T.** Effect of pH, temperature and metal salts in different storage conditions on the stability of vitamin C content of yellow bell pepper extracted in aqueous media. *Sys Rev Pharm* **2020**;11 :661-667

**Florowska A, Hilal A, Florowski T, Wroniak M.** Addition of selected plant-derived proteins as modifiers of inulin hydrogels properties. *Foods* **2020**; 9: 845.

**He Z, Cao H, Huai Cheng, Haixuan Z.** Effects of vigorous blending on yield and quality of protein isolates extracted from cottonseed and soy flours. *Mod Appl Sci* **2013**; 7: 1913-1844

**Hidalgo M.E, Ingrassia R, Nielsen N.S, Porfiri M.C, Tapia-Maruri D, Risso P.H.** Tara gum-bovine sodium caseinate acid gels: Stabilisation of W/W emulsions. *Int J Dairy Technol* **2020**; 73:521-531

**Hoyos-Leyva** J.D, Chavez-Salazar A, Castellanos-Galeano F, Bello-Perez L.A, Alvarez-Ramirez J. Physical and chemical stability of L-ascorbic acid microencapsulated into taro starch spherical aggregates by spray drying, Food Hydrocoll. **2018**; 83 143-152

**Hu** X, Wang Y, Zhang L, Xu M. Formation of self-assembled polyelectrolyte complex hydrogel derived from saiecan and chitosan for sustained release of Vitamin C. Carbohydr. Polym **2020**; 234: 115920.

**Hurler** J, Engesland A, Poorahmary-Kermany B, Škalko-Basnet N. Improved texture analysis for hydrogel characterization: Gel cohesiveness, adhesiveness, and hardness. J Appl Polym Sci **2012**; 125: 180-188

**Ismael** A, Guevara-Oquendo V.H, Refat B, Yu. Interactive association between processing induced molecular structure changes and nutrient delivery on a molecular basis, revealed by cutting-edge vibrational biomolecular spectroscopy. Anim Sci Biotechnol 2019; 10: 85-. doi:10.1186/s40104-019-0384-z

**Ibarra** G, Masó I, Schelover P, Ramos N. Evaluación de la Reología y la Sinéresis de Geles de Goma Espina Corona y  $\kappa$ - Carragenina. RTyC **2014**; 12: 31-38

**Ji** R, Cui H, Duhoranimana E, Hayat K , Yu J , Hussain S, Tahir M , Zhang X , Chi-Tang H .Co-encapsulation of L-ascorbic acid and quercetin by gelatin/sodium carboxymethyl cellulose coacervates using different interlayer oils. Int Food Res J **2021**; 145: 110411

**Kruif**, C.G, Anema S.G., Zhu C, Havea P, Coker C. Water holding capacity and swelling of casein hydrogels. Food Hydrocoll **2015**; 44: 372-379

**Kumar** A, Rao K, Sung–Soo, H. Application of xanthan gum as polysaccharide in tissue engineering: A review. *Carbohydr. Polym* **2018**; 180: 128–144.

**Lai** F, Lin B, Mo F, Xu C, Lin M. Novel composite microparticles of alginate coated with chitosan for controlled release and protection of ascorbic acid. *Adv Polym Technol* **2017**; 26: 2157

**Le** XT, Turgeon SL. Rheological and structural study of electrostatic cross-linked xanthan gum hydrogels induced by  $\beta$ -lactoglobulin. *Soft Matter* **2013**; 9:3063-73.

**Le** X.T., Rioux L.E., Turgeon S.L. Formation and functional properties of protein-polysaccharide electrostatic hydrogels in comparison to protein or polysaccharide hydrogels. *Adv. Colloid Interf. Sci* **2017**; 236: 127–135.

**Liu** K, Chen Y, Zha X, Li Q, Pan L, Luo J. Research progress on polysaccharide/protein hydrogels: Preparation method, functional property and application as delivery systems for bioactive ingredients. *Food Res Int* **2021**; 147: 110542.

**Liu** G, Zhou H, Wu H, Chen R, Guo S. Preparation of alginate hydrogels through solution extrusion and the release behavior of different drugs. *J Biomater Sci* **2016**; 26: 1808-1823.

**Loarca-Piña** G, Neri M, de Dios Figueroa J, Castaño-Tostado E, Ramos-Gómez M, Reynoso, R, Mendoza S. Chemical characterization, antioxidant and antimutagenic evaluations of pigmented corn. *J Food Sci Technol* **2019**; 56: 3177-3184.

**Minekus** M, Alming M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food Funct* **2014**; 5: 1113-1124.

**Mu** Y, Sun J, Obadi M, Chen Z, Xu B. Effects of saccharides on the rheological and gelling properties and water mobility of egg white protein. *Food Hydrocoll* **2020**; 108: 106038.

**Maqbool** M, Aslam M, Akbar W, Zubair I. Biological importance of vitamins for human health: A review. *J Agric Basic Sci* **2017**; 2: 50-58.

**Minekus** M, Alming M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food Funct* **2014**; 5: 1113-1124.

**Moghadam**, M, Salami M, Mohammadian M, Emam-Djomeh, Z. Development and characterization of pH-sensitive and antioxidant edible films based on mung bean protein enriched with *Echium amoenum* anthocyanins. *J Food Meas Charact* **2021**;15: 2984-2994.

**Moniri** H, Farahmandfar R, Motamedzadegan A. Investigation of hot air and foam-mat dried cress seed gum by FT-IR, zeta potential, steady shear viscosity, dynamic oscillatory behavior, and other physical properties. *Food Sci Nutr* **2020**; 8: 2143- 2155.

**Mu** Y, Sun J, Obadi M, Chen Z, Xu B. Effects of saccharides on the rheological and gelling properties and water mobility of egg white protein. *Food Hydrocoll* **2020**; 108: 106038.

**Nesterenko** A, Alric I, Silvestre F, Durrieu V. Comparative study of encapsulation of vitamins with native and modified soy protein. *Food Hydrocoll* **2014**; 38: 172-179.

**Nikolaos** N, Sigalas M.P. A DFT Study on the radical scavenging activity of maritimetin and related auronos. *J. Phys Chem A* **2008**; 112: 12196-12202.

**Niknam** R, Mousavi M, Kiani H. Effect of ultrasonication on rheological aspects and storage stability of O/W emulsions containing *Gleditsia caspica* galactomannan – *Trigonella foenum – graceum* galactomannan mixtures, *Appl Food Res* **2022**; 2: 100109.

**Oseguera-Toledo** M. E, De Mejia E. G, Dia V. P, Amaya-Llano S. L. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hydrolysates inhibit inflammation in LPS-induced macrophages through suppression of NF- $\kappa$ B pathways. *Food Chem* **2021**; 127: 1175-1185.

**Pateiro** M, Gómez B, Munekata P.E.S, Barba F.J, Putnik P. Kovacevic D.B, Lorenzo, J.M. Nanoencapsulation of promising bioactive compounds to improve their absorption, stability, functionality, and the appearance of the final food products. *Molecules* **2021** ; 26 :1547.

**Panahi** R, Baghban-Salehi M. Protein-Based Hydrogels. En : Mondal M, Ed. Cellulose-based superabsorbent hydrogels. *Polymers and polymeric composites: A reference series*. Rajshahi: Springer, Cham **2019**:1561-1600.

**Palacio-Márquez** A, Ojeda-Barrios D, Jiménez-Castro J, Precuado-Rangel P, Hernandez-Rodriguez O, Sánchez, E. Biofortification potential in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): bioactive compounds, antioxidant capacity and

physicochemical properties of 155 varieties grown in México. *Not Bot Horti Agrobo* **2021**; 49:12123.

**Peña-Cháidez** J, Rosas-Flores W, Salazar-Montoya J, Morales-Contreras B, Gallegos-Infante J, Morales-Castro J, Medrano-Roldán, H. Rheological and thermal characterization of pinto saltillo bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates/sodium alginate gels. *LWT* **2021**; 146: 111419.

**Pragnesh** D, Gor A. Natural polysaccharide-based hydrogels and nanomaterials: recent trends and their applications. En: Mustansar-Hussain, C., Ed. *Handbook of nanomaterials for industrial applications*. Newark, NJ: Elsevier sci **2018**: 36-66.

**Priya** MV, Kumar RA, Sivashanmugam A, Nair SV, Jayakumar R. Injectable amorphous chitin-agarose composite hydrogels for biomedical applications. *J Funct Biomater* **2015**; 6 :849-862

**Quintana-Blanco** W.A, Pinzón-Sandoval E.H, Torres D.F. Evaluación del crecimiento de frijol (*phaseolus vulgaris* L.), bajo estrés salino. *Rev U.D.C.A Act & Div Cient* **2016**; 19: 87-95.

**Ryu** G, Hwang J, Lee, C. Antioxidant activity of dopamine-modified hydrogels containing cross-linked hyaluronic acid. *J Vis Sci* **2018**; 20; 513-52.

**Santoshi-kumari** A, Venkatesham M, Ayodhya D, Veerabhadram G. Green synthesis, characterization, and catalytic activity of palladium nanoparticles by xanthan gum. *Appl Nanosci* **2015**; 5: 315-320.

**Sizeland** K.H, Hofman K.A, Hallett I.C, Martin D.E, Potgieter J, Kirby N.M, Hawley A, Mudie S.T, Ryan T.M, Haverkamp R.G.; Cumming M.H. Nanostructure of electrospun

collagen: Do electrospun collagen fibers form native structures?. *Materialia* **2018**; 3: 90-96.

**Sk**, M.M & Yue, C.Y. Synthesis of polyaniline nanotubes using the self-assembly behavior of vitamin C: a mechanistic study and application in electrochemical supercapacitors. *J Mater Chem A* **2014** ;2: 2830.

**Song** J, Yu Y, Chen M, Ren Z, Chen L, Fu C, Ma Zf, Li Z. Advancement of protein- and polysaccharide-based biopolymers for anthocyanin encapsulation. *Front Nutr* **2022**; 9: 938829

**Sukriti**, Kaith B.S, Jindal, R Kumari M, Kaur M. Biodegradable-stimuli sensitive xanthan gum-based hydrogel: Evaluation of antibacterial activity and controlled agro-chemical release. *React Funct Polym* **2017**; 120: 1-13.

**Szyk-Warszynska** L, Raszka K, Warszynski P. Interactions of casein and polypeptides in multilayer films studied by FTIR and molecular dynamics polymers **2019**; 11: 920.

**Tang** S, Zhao L, Yuan J, Chen Y, Leng Y. En: Chen Y, Ed. *Hydrogels based on natural polymers*. Beijing: Elsevier **2019**: 1561-1600.

**Timilsena** Y.P, Haque A, Adhikari B. Encapsulation in the food industry: A brief historical overview to recent developments. *Food Sci Nutr* **2020**;11: 481-508.

**Thivya** P, Akalya S, Sinija V.R. A comprehensive review on cellulose-based hydrogel and its potential application in the food industry. *Appl Food Res* **2022**; 2: 100161.



**Thongchai** K, Chuysinuan P, Thanyacharoen T, Techasakul S , Ummartyotin S. Characterization, release, and antioxidant activity of caffeic acid-loaded collagen and chitosan hydrogel composites. *J mater res technol* **2020**; 9 :6512-6520.

**Valdiviezo-Morales** L, Ortega-Cerrilla M.E, Vaquera-Huerta H, Kawas-Garza J, Zetina-Córdoba P, Miranda-Jiménez L. Micro y nanoencapsulación: Una perspectiva biotecnológica en la producción animal. *Agro Productividad*. **2017**;10: 63-68.

**Vargas** X, Afanasjeva N, Álvarez M. The evolution of the viscoelastic behavior of the asphalt induced for thermo-oxidation in situ in a rheo-reactor. *Dyna* **2008**; 75: 191-198.

**Wardhani** D, Ulya H, Nugroh F, Abdullah W, Sasongko S, Hadiyanto A, Nugroho A. Vitamin C encapsulation by a gelation method using deacetylated glucomannan as a matrix. *J King Saud Univ Sci* **2020**; 32: 2924-2930.

**Wei** Z, Chen Y, Wijaya W, Cheng Y, Xiao J, Huang Q. Hydrogels assembled from ovotransferrin fibrils and xanthan gum as dihydromyricetin delivery vehicles. *Food Funct* **2020**; 11: 1478-1488 .

**Wroblewska** M, Slyz J, Winnicka K. Rheological and textural properties of hydrogels, containing sulfur as a model drug, made using different polymers types. *Polimery* **2019**; 64: 208.

**Yan** B, Davachi S.M, Ravanfar R, Dadmohammadi Y, Deisenroth T.W, Van Pho T et al. Improvement of vitamin C stability in vitamin gummies by encapsulation in casein gel. *Food Hydrocoll* **2021**; 113: 106414.

**Yang** Y, He Q, Sun H, Cao X, Walid E, Wu Z, et al. Pegylation may reduce allergenicity and improve gelling properties of protein isolate from black kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Biosci* **2018**; 25:83-9.

**Yang** Y & Xiang D. Effect of coconut protein and xanthan gum, soybean polysaccharide and gelatin interactions in oil-water interface. *Molecules* **2022**; 27: 2879.

**Yin** X, Chen K, Cheng H, Chen X, Feng S, Song Y, Liang L. Chemical stability of ascorbic acid integrated into commercial products: A review on bioactivity and delivery technology. *Antioxidants* **2022**; 11: 153.

**Zahra**, K.T & Mehdi, V. Designation and characterization of cold-set whey protein-gellan gum hydrogel for iron entrapment. *Food Hydrocoll* **2020**; 111: 106205.

**Zhang** Q, Gu L, Su J, Chang C, Yang Y, Li J. Development of soy protein isolate/k-carrageenan composite hydrogels as a delivery system for hydrophilic compounds: Monascus yellow. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**; 172: 281-288.