



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Efecto de la adición de biomasa procedente de *Aloe arborescens* a un agente encapsulante base ALG-PEG como preservador de un extracto”

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

*LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA*

**PRESENTA:**

MARÍA DEL ROSARIO FLORES GONZÁLEZ

**ASESORA:**

DRA. LORENA ROMERO SALAZAR

**COASESOR:**

DR. JUAN CARLOS ARTEAGA ARCOS



TOLUCA, MÉXICO

MARZO, 2021

## RESUMEN

La humanidad y los materiales continúan evolucionando a un ritmo similar, ya que, con el transcurso del tiempo, el desarrollo de estos se ha modificado con respecto a las necesidades y demandas de la humanidad. Anteriormente, la creación de materiales y herramientas estaba limitada por la disponibilidad de materia prima en el entorno; y ahora es posible definir las características del material deseado, previo a su producción. No obstante, la producción de materiales sigue dependiendo de los recursos naturales.

Por tal motivo, es necesario considerar el desarrollo e investigación en materiales y tecnologías que no acrecienten el impacto sobre el medio ambiente y la naturaleza, pues de ello depende nuestro futuro y supervivencia.

Actualmente se realiza investigación para desarrollar materiales capaces de disminuir la inestabilidad física o química de compuestos de interés, pues dichos materiales son altamente demandados en la industria, debido a la necesidad de otorgar estabilidad y protección a las moléculas o compuestos de interés.

Una de las alternativas más atractivas para dar solución al problema de inestabilidad es la *encapsulación*, la cual consiste en el recubrimiento de compuestos o moléculas, mediante un agente encapsulante que, en la mayoría de los casos es de naturaleza polimérica.

Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo consistió en evaluar la adición de *Aloe arborescens* a un agente encapsulante base ALG y PEG como preservador de extracto de *Clitoria ternatea*, mediante los datos obtenidos en: la eficiencia de encapsulación (%EE), el rendimiento en masa (%Rm), la cinética de liberación (%CL) y el punto de flujo ( $G' = G''$ ) de cada una de las formulaciones del agente encapsulante.

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis estadístico y se concluyó que, la adición de biomasa de *Aloe arborescens* tiene un afecto estadísticamente significativo sobre la eficiencia de encapsulación y el punto de flujo, aunque, no se reflejó algún efecto estadísticamente significativo en el rendimiento de masa y la cinética de liberación.

# CONTENIDO GENERAL

<b>1) CAPÍTULO 1. GENERALIDADES.....</b>	<b>12</b>
1.1 INTRODUCCIÓN.....	12
<b>2) CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>16</b>
2.1 ENCAPSULACIÓN.....	16
2.2 AGENTE ENCAPSULANTE .....	17
<i>Alginato</i> .....	19
<i>Polietilenglicol</i> .....	21
<i>Biomasa procedente de Aloe arborescens</i> .....	22
2.4 EXTRACTO .....	25
2.5 PROPIEDADES REOLÓGICAS – PUNTO DE FLUJO $G' = G''$ .....	27
<b>3) CAPÍTULO 3. DESARROLLO Y DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS.....</b>	<b>30</b>
<i>Obtención de biomasa de Aloe arborescens</i> .....	30
<i>Obtención de extracto de Clitoria ternatea</i> : .....	31
<i>Formulación y preparación del agente encapsulante base</i> : .....	32
<i>Adición de Aloe arborescens al agente encapsulante base</i> .....	33
3.1 EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN.....	34
3.2 CINÉTICA DE LIBERACIÓN .....	36
3.3 PUNTO DE FLUJO $G' = G''$ .....	37
3.4 VALIDACIÓN ESTADÍSTICA .....	37
<b>4) CAPÍTULO 4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
4.1 EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN.....	40
<i>Eficiencia de encapsulación</i> .....	40
<i>Rendimiento de masa</i> .....	43
4.2 CINÉTICA DE LIBERACIÓN .....	45
4.3 PUNTO DE FLUJO $G' = G''$ .....	50
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>53</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>54</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>55</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Materiales utilizados en la encapsulación [6, 23].	18
Tabla 3.1. Concentraciones iniciales de las formulaciones base del agente encapsulante. Se sombreadon las formulaciones que serán reportadas.	32
Tabla 3.2. Concentración de las formulaciones del agente encapsulante base.	33
Tabla 3.3. Concentración de las formulaciones del agente encapsulante adicionado con biomasa de <i>Aloe arborescens</i> .	33
Tabla 4.1. Punto de flujo ( $G'=G''$ ) de cada formulación a 20, 37, y 40°C.	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Número de publicaciones anuales relacionadas con la encapsulación [20]. .....	13
Figura 2.1. Ilustración esquemática del proceso de encapsulación [23, 19]. .....	16
Figura 2.2. Estructura del alginato: (a) y (b) monosacáridos, ácido $\beta$ -D manurónico y ácido $\alpha$ -L gulurónico, respectivamente, y (c) y (d) bloques repetidos en cadena [34]......	19
Figura 2.3. Estructura de unidades repetidas de alginato de sodio y la formación del hidrogel mediante la integración de cationes de $\text{Ca}^{2+}$ entre cadenas de alginato alineadas según el modelo “caja de huevo” [35]......	20
Figura 2.4. Modelo “caja de huevo” [36]. .....	20
Figura 2.5. Estructura del Polietilenglicol [40]. .....	21
Figura 2.6. <i>Aloe arborescens</i> antes de ser procesada para la obtención de biomasa. ....	23
Figura 2.7. Corte transversal de una hoja de <i>Aloe arborescens</i> mostrando: epidermis (A) y tejido parenquimático (B). Imagen obtenida durante el procesado de hojas y obtención de biomasa. ....	24
Figura 2.8. Clasificación de compuestos fenólicos [55]. .....	25
Figura 2.9. Extracto de <i>Clitoria ternatea</i> a cuatro condiciones de pH [61]. .....	26
Figura 2.10. Gráfica de barrido de amplitud en donde se trazan los módulos $G'$ y $G''$ contra la deformación ( $\gamma$ ) [68]......	28
Figura 3.1. Preparación de la solución para la obtener el extracto de <i>Clitoria ternatea</i> .....	32
Figura 3.2. Proceso de elaboración de perlas para evaluar eficiencia de encapsulación. ....	35
Figura 3.3. Preparación de perlas para medición de absorbancia en el espectrofotómetro. ....	36
Figura 4.1. Eficiencia de encapsulación de las 12 formulaciones evaluadas. ....	40
Figura 4.2. Gráfica de Medias (Método LSD 95%) para Eficiencia de encapsulación. ....	41
Figura 4.3. Rendimiento en masa de las 12 formulaciones del agente encapsulante. ....	43
Figura 4.4. Gráfico de medianas del Rendimiento de masa. ....	44
Figura 4.5. Cinética de liberación a 20 °C.....	46
Figura 4.6. Cinética de liberación a 37 °C.....	47
Figura 4.7. Cinética de liberación a 40 °C.....	48
Figura 4.8. Gráfica de Medias (Método LSD 95%) para Log Cinética de liberación. ....	48
Figura 4.9. Cinética de liberación de perlas sin biomasa adicionada (izquierda) y cinética de liberación de perlas adicionadas con 0.6% de biomasa de <i>Aloe arborescens</i> (derecha)......	50
Figura 4.10. Gráfica de Medias (Método LSD 95%) para Log crossover entre $G'$ y $G''$ . ....	52

## ÍNDICE DE APÉNDICES

<b>Apéndice 1</b> – Análisis estadístico %EE .....	63
<b>Apéndice 2</b> – Análisis estadístico %Rm.....	66
<b>Apéndice 3</b> – Análisis estadístico %CL.....	71
<b>Apéndice 4</b> – Tabla de perlas deshidratadas.....	76
<b>Apéndice 5</b> – Análisis estadístico $G' = G''$ .....	77

## GLOSARIO

**Absorbancia:** logaritmo de la relación entre la energía lumínica incidente y transmitida a través de una muestra [1].

**Agente encapsulante:** material utilizado como recubrimiento de una sustancia o compuesto de interés.

**Biomasa:** materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía [2]. Para los objetivos de este proyecto, de ahora en adelante se denominará *biomasa* al producto de *Aloe arborescens* obtenido posterior al proceso de liofilización (mismo que se describirá más adelante).

**Capacidad de carga:** es la cantidad de compuesto de interés cargado por unidad de peso de la nanopartícula, lo que indica el porcentaje de masa de la nanopartícula que se debe al compuesto de interés encapsulado [3].

**Cizalla:** se le nombra así al movimiento de una capa relativo al de capas adyacentes paralelas [4].

**Deformación:** la medida de la deformación respecto a la dimensión de referencia (longitud, área o volumen) [4].

**Deformación de cizalla:** comúnmente denominado *cizallamiento*, se refiere a la deformación relativa durante el proceso de cizalla [4].

**Eficiencia de encapsulación:** se refiere al porcentaje de compuesto de interés que fue exitosamente encapsulado en el agente encapsulante [3].

**Encapsulación:** tecnología que permite confinar sustancias (fármacos, compuestos bioactivos, pigmentos, nutracéuticos e incluso células y enzimas) en el interior de otra que constituye el recubrimiento [5, 6].

**Esfuerzo cortante:** la fuerza por unidad de superficie requerida para mantener una velocidad constante de movimiento de un fluido [7].

**Extracto vegetal:** se define como un preparado concentrado con consistencia líquida, sólida o viscosa, que se obtiene empleando un agente de extracción [8].

**Fluido:** se define como una sustancia que se deforma continuamente bajo la aplicación de esfuerzos cortantes [9].

**Liberación controlada:** tecnología que surgió como una alternativa de los sistemas de liberación tradicionales. Lo más importante es crear un medio en el cual se obtenga una respuesta óptima, con efectos secundarios mínimos y una eficacia prolongada en el organismo [10].

**Módulo:** se refiere a la razón de un componente del esfuerzo a un componente de la deformación [4].

**Módulo dinámico:** representación matemática de un módulo considerado como la suma de una parte real ( $G'$ ) y otra imaginaria ( $G''$ ) [4].

**Módulo de almacenamiento ( $G'$ ):** indica la cantidad de energía que se almacena en el material en cada ciclo de deformación [9].

**Módulo de pérdida ( $G''$ ):** indica la cantidad de energía disipada durante cada ciclo de deformación [9].

**Polímeros:** del griego *πολυμερής* *polymerés* y significa 'compuesto de varias partes' [2], son macromoléculas formadas por cientos o miles de unidades básicas funcionales denominadas monómeros [11], y estos pueden ser de origen natural o sintético.

**Propiedades reológicas:** características del flujo de un material [7], estas pueden medirse a través de la deformación de una muestra, haciendo uso de un reómetro o un viscosímetro; algunas propiedades reológicas pueden verse afectadas por condiciones externas aplicadas, como: la tensión, deformación, periodo de tiempo y temperatura [12].

**Reología:** es el estudio del flujo y la deformación de la materia que describe la relación entre fuerza, deformación y tiempo [13].

**Velocidad de corte:** es el índice al que cambia la velocidad a la que una capa de fluido pasa sobre una capa adyacente [7].



*“... la tecnología nace de la siguiente necesidad:  
¿cómo hago para dominar la naturaleza, ante la  
cual soy débil y tengo muchas deficiencias...?”  
-Prof. Jorge Sabato*

# Capítulo 1. Generalidades

## 1.1 INTRODUCCIÓN

A lo largo del tiempo, la humanidad ha ido evolucionando y eso ha dado paso al desarrollo de la civilización. El tránsito de las sociedades nómadas a las sociedades agrícolas sedentarias y de estas a las urbanas industriales propició la modificación de necesidades, dando paso a la demanda de más herramientas y materiales [14]; no obstante, satisfacer esta demanda ha provocado una constante transformación sobre la naturaleza, pues es la única proveedora de materiales que el hombre utiliza para la construcción de herramientas que le permiten viajar, comunicarse, sobrevivir, alimentarse, desplazarse y protegerse [15].

La construcción de herramientas estuvo limitada durante mucho tiempo por la disponibilidad del material en el entorno, pero hoy en día, primero se especifican las características del material necesario para una aplicación dada y después es fabricado [14].

Los materiales siguen siendo partícipes de la historia y evolución de la humanidad, pues, de acuerdo al uso que este les ha dado, algunos períodos han sido nombrados en relación al material que predominó en ellos; mejor definidos por los especialistas como edades: 1) edad de piedra, 2) edad de cobre, 3) edad de bronce y 4) edad de hierro [14]. Actualmente, algunos autores sugieren que desde hace pocas décadas habríamos entrado en la edad del silicio o los polímeros [16, 17].

Un material puede ser todo aquello que no es espiritual y constituye todas las cosas y los seres [2, 14] no obstante, la definición de material se modifica dependiendo del enfoque otorgado, dando paso a la exclusión o no de ciertos materiales. Lo cierto es que, los materiales hacen posible que el estilo de vida sea más cómodo conforme transcurre el tiempo y se modifican sus necesidades y demandas, no obstante, a pesar del avance en el desarrollo, invención y creación de materiales, su producción sigue dependiendo en gran medida de los recursos naturales, perpetuando así la continua explotación de la naturaleza.

Por tal motivo, es necesario considerar el desarrollo e investigación en materiales y tecnologías que no acrecienten el impacto sobre el medio ambiente y la naturaleza, lo que

más adelante nos llevará a un mundo más eficiente y sostenible [15], pues de ello depende nuestro futuro y supervivencia [18].

Hoy en día, una de las necesidades con más demanda en la industria es la obtención de materiales capaces de disminuir la inestabilidad física o química de compuestos de interés. En ocasiones, la incompatibilidad entre el compuesto y el material con el que este entra en contacto provocan la degradación (o pérdida) de la función del activo; de ahí que sea necesario considerar la formulación de un material que otorgue estabilidad y protección de la(s) molécula(s) de interés que se pretenden transportar.

Una de las alternativas más atractivas para dar solución al problema de inestabilidad es la *encapsulación*, la cual consiste en el recubrimiento de compuestos o moléculas, por un material que en la mayoría de los casos es de naturaleza polimérica [11]. Además, la encapsulación con *polímeros* ya sea naturales o sintéticos, permite cierta manipulación durante la formulación del material (agente encapsulante) para que este adquiera características de interés a un menor costo, en comparación con otros materiales [19].

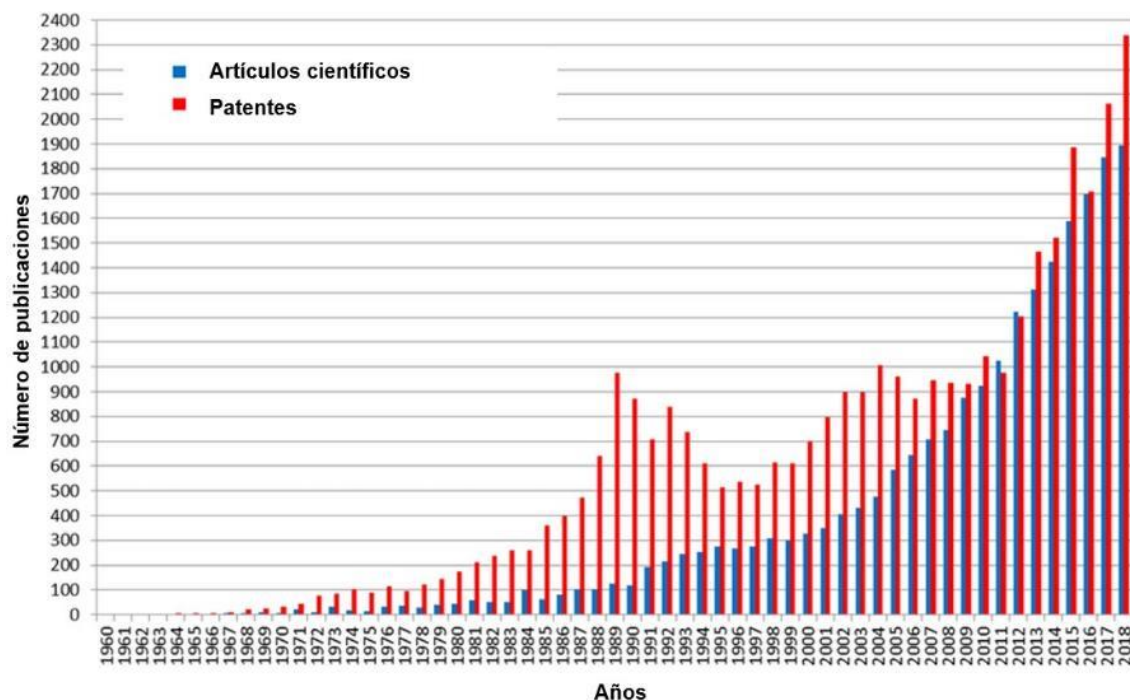


Figura 1.1. Número de publicaciones anuales relacionadas con la encapsulación [20].

Hasta ahora, la encapsulación sigue teniendo un crecimiento significativo desde los años 60's, pues ha aumentado el número de patentes y artículos científicos derivados de la

investigación básica y aplicada (como puede verse en la Figura 1.1) relacionada con la encapsulación [5, 21]. Convirtiéndose en una de las técnicas más utilizadas en áreas involucradas con aplicaciones biomédicas, farmacéuticas, agrícolas, alimenticias, cosméticas y textiles; fungiendo como agentes encapsulantes y transportadores de diversas moléculas [5].

El desarrollo de las tecnologías de encapsulación tiene como objetivo formular un agente encapsulante que favorezca la sinergia entre el compuesto y el agente encapsulante que le rodea, incrementar la eficiencia de encapsulación, protegerlo de las condiciones ambientales, y prolongar el tiempo de vida en anaquel hasta cumplir su función.

Los materiales utilizados en el proceso de encapsulación se eligen con base en los objetivos y uso final del compuesto encapsulado. Por ello, durante el desarrollo de este proyecto, se emplearon dos polímeros (1. alginato de sodio (ALG) y 2. polietilenglicol (PEG)) para la elaboración de cuatro formulaciones base de un agente encapsulante, al que posteriormente se le adicionaron tres distintas concentraciones de biomasa procedente de *Aloe arborescens*, con el propósito de evaluar el cambio que esta adición provocó sobre las características iniciales de las formulaciones base.

Se eligió ALG y PEG, ya que, la estructura del primero permitiría la fácil formación de un material poroso, no obstante, esta porosidad provoca la rápida liberación del compuesto encapsulado y disminuye su tiempo de vida. Es entonces cuando se aprovecha el carácter hidrofílico del PEG para propiciar la formación de un material que aumente el tiempo de retención del agua.

Por su parte, la biomasa procedente de *Aloe arborescens* se usó como un compuesto adicional que afectaría las características iniciales del agente encapsulante, posteriormente expuesto a tres condiciones de temperatura: 20°, 37° y 40° C; siendo ambiental, fisiológica y pirexia, respectivamente.

Con relación a las características, el desarrollo de este proyecto se propone evaluar si los valores de: cinética de liberación, capacidad de carga, eficiencia de encapsulación y la propiedad reológica *punto de flujo* de las formulaciones del agente encapsulante base ALG – PEG adicionadas con *Aloe arborescens* serán más estables en comparación con las formulaciones base que no fueron adicionadas con este último.

Por tal motivo, se establecieron los siguientes objetivos para este proyecto:

## General

- Evaluar la adición de *Aloe arborescens* a un agente encapsulante base ALG y PEG como preservador de extracto de *Clitoria ternatea*.

## Particulares

- Evaluar mediante espectrofotometría la eficiencia de encapsulación, rendimiento de masa y cinética de liberación de cuatro formulaciones base: 1) 0.5% ALG – 1.5% PEG; 2) 0.5% ALG – 10% PEG; 3) 1% ALG – 1.5% PEG; 4) 1% ALG – 10% PEG
- Obtener el punto de flujo ( $G' = G''$ ) de las cuatro formulaciones base del agente encapsulante.
- Evaluar mediante espectrofotometría la eficiencia de encapsulación, rendimiento de masa, y cinética de liberación de las formulaciones base adicionadas con 0.2, 0.4 y 0.6 % de biomasa procedente de *Aloe arborescens*, para identificar el carácter de preservador de este último.
- Obtener el punto de flujo ( $G' = G''$ ) de las formulaciones adicionadas con 0.2, 0.4 y 0.6 % de biomasa procedente de *Aloe arborescens*, para identificar el carácter de estabilizador este último.

# Capítulo 2. Marco teórico

## 2.1 ENCAPSULACIÓN

La encapsulación es definida como *la tecnología que permite confinar sustancias (fármacos, compuestos bioactivos, pigmentos, nutraceuticos e incluso células y enzimas) en el interior de otra que constituye el recubrimiento* [5, 6]; dando lugar a la protección y transporte del compuesto hasta su liberación (que puede ser desencadenada por cizallamiento, solubilización, calor, pH o acción enzimática) [22].

La encapsulación se puede realizar mediante varios procesos, que en general constan de cuatro etapas (descritas en la figura 2.1) y al final la obtención del compuesto encapsulado puede presentarse en forma de película, esfera o una partícula irregular, entre otras [23].

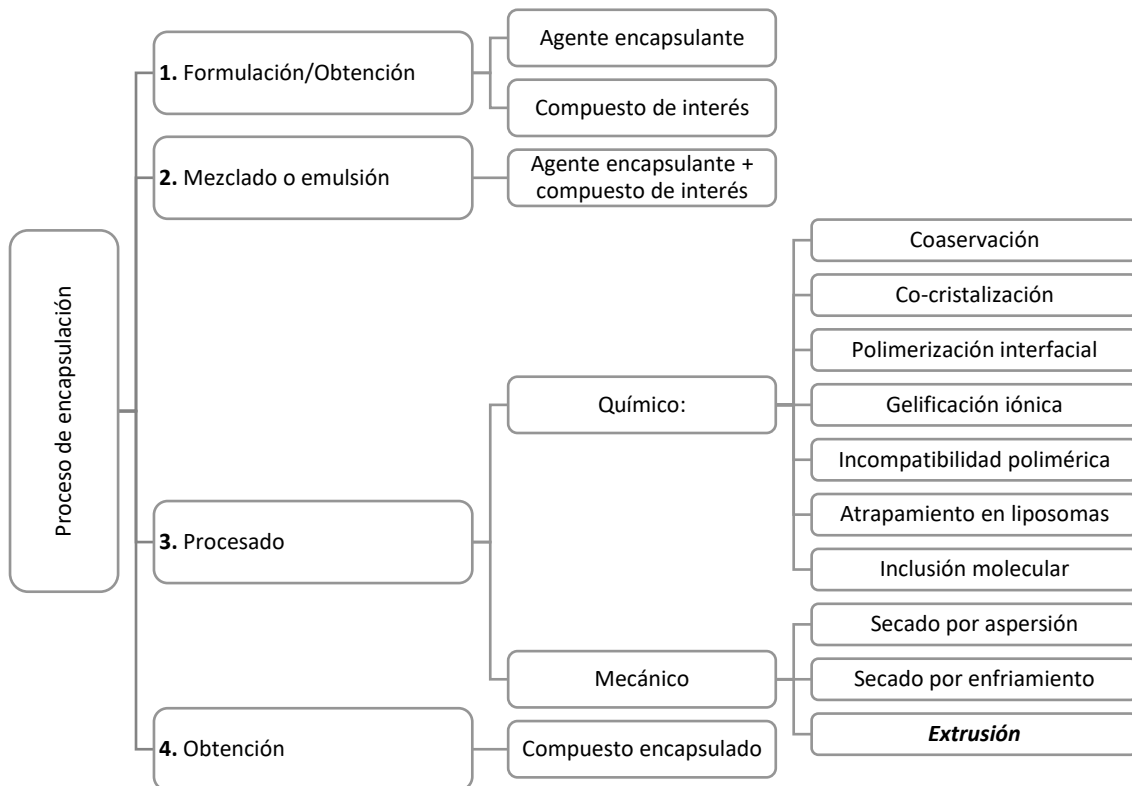


Figura 2.1. Ilustración esquemática del proceso de encapsulación [23, 19].

Como se observa en la figura 2.1, la encapsulación se puede llevar a cabo mediante varios procesos, no obstante, para los fines de este proyecto, se hará uso del proceso mecánico de **extrusión**, siendo el segundo más usado, después del secado por aspersion, debido - principalmente- al costo accesible [5]. Este proceso involucra el paso de una solución que contiene el agente encapsulante y el compuesto activo [24], a través de un capilar o dispositivo extrusor de tamaño y velocidad de goteo controlados [25], aunque también hay reportes donde se realiza por gravedad [26].

Además del costo, se enlistan a continuación otras ventajas y usos de esta técnica en el contexto industrial [27, 28]:

- Proteger el compuesto activo de la degradación producida por el ambiente (luz, temperatura, humedad y pH, entre otras).
- Controlar la liberación del ingrediente activo a través del tiempo o en condiciones particulares (temperatura, pH, luz, humedad).
- Modificar las características físicas del material original y facilitar su manipulación
- Enmascarar sabor y olor de alimentos o medicamentos
- Estabilización de principios activos inestables
- Transformar líquidos en sólidos
- Separar componentes para que estos no reaccionen

## **2.2 AGENTE ENCAPSULANTE**

Uno de los pasos clave durante el proceso de encapsulación es la elección del agente encapsulante, pues se tienen que considerar algunos criterios previos a la elección del material [6], por ejemplo [11]: a) compuesto/molécula a encapsular, b) costo, c) tamaño de partícula requerido, d) mecanismo de liberación deseado, y e) aplicaciones proyectadas para la molécula/compuesto, ya que de esta dependerán las pruebas y evaluaciones a las que se someterá el agente encapsulante.

Por ejemplo: en aplicaciones biomédicas, la temperatura es una variable imprescindible a considerar, pues el agente encapsulante puede estar sometido a tres valores de temperatura: ambiental (20 °C), fisiológica (37 °C) y pirexia (40°), lo que modifica las condiciones de liberación del compuesto de interés, además, algunos agentes

encapsulantes pueden experimentar cambios de volumen en respuesta a pequeños cambios de temperatura [29].

El agente encapsulante comúnmente se denomina “simple” o “compuesto” dependiendo de la cantidad de materiales usados para su formulación, si este se conforma de un solo material sería un sistema de encapsulación simple, mientras que, si se agrega más de uno, se denominará sistema de encapsulación compuesto [5]. Entre los materiales más usados, se encuentran: proteínas, carbohidratos, lípidos, gomas, celulosas y materiales inorgánicos (tabla 2.1).

*Tabla 2.1. Materiales utilizados en la encapsulación [6, 23].*

<b>MATERIAL PARA ENCAPSULAR</b>	<b>COBERTURA ESPECÍFICA</b>
Gomas	Acacia, agar, alginato de sodio, carragenina
Proteínas	Gluten, caseína, albúmina
Carbohidratos	Almidón, maltodextrinas, quitosano, dextranos, sacarosa, jarabes de maíz
Lípidos	Ceras, parafinas, diglicéridos, monoglicéridos, aceites, grasas, ácido esteárico, tristearina,
Celulosas	Etilcelulosa, metilcelulosa, acetilcelulosa, nitrocelulosa, caboximetil-celulosa
Materiales inorgánicos	Sulfato de calcio, silicatos

Una vez elegido el material y posterior a su formulación, este tiene que cubrir las siguientes características favorables para casi cualquier aplicación [10, 30, 6]:

- a) Evitar la interacción con el compuesto a encapsular
- b) Facilitar el manejo del compuesto encapsulado
- c) Baja toxicidad
- d) Biocompatibilidad
- e) Biodegradabilidad
- f) Estabilidad química
- g) Emulsionar con el compuesto a encapsular, evitando la interacción con el mismo
- h) Propiedades reológicas adecuadas para los fines de cada proyecto
- i) Control de la liberación de las moléculas encapsuladas en condiciones específicas
- j) Capacidad de proteger al máximo el material encapsulado de la acción de factores externos (pH, temperatura, oxígeno, humedad, luz, entre otros)



Durante el desarrollo de este proyecto se eligieron tres materiales, dos de ellos (ALG y PEG) para la formulación de un agente encapsulante base y el tercero (biomasa de *Aloe arborescens*) para su adición -en distintas concentraciones- a las formulaciones base.

Tanto el ALG como el PEG se eligieron debido a sus propiedades no tóxicas e inertes a la mayoría de las moléculas biológicas; además de ser materiales aprobados por la FDA para diversos usos clínicos y alimenticios [31]; mientras que la biomasa de *Aloe arborescens* se seleccionó con el propósito de evaluar el cambio que esta adición provocaría sobre las características iniciales de las formulaciones base.

### Alginato

Los alginatos son polisacáridos presentes en las paredes celulares de las algas marinas, cuya función es otorgar rigidez, elasticidad, flexibilidad y capacidad de enlazar agua [32]. Son cadenas poliméricas compuestas de dos monómeros (ver figura 2.2), el ácido  $\alpha$ -L gulurónico (G) y el ácido  $\beta$ -D manurónico (M), distribuidos en distintos bloques y arreglos secuenciales [33].

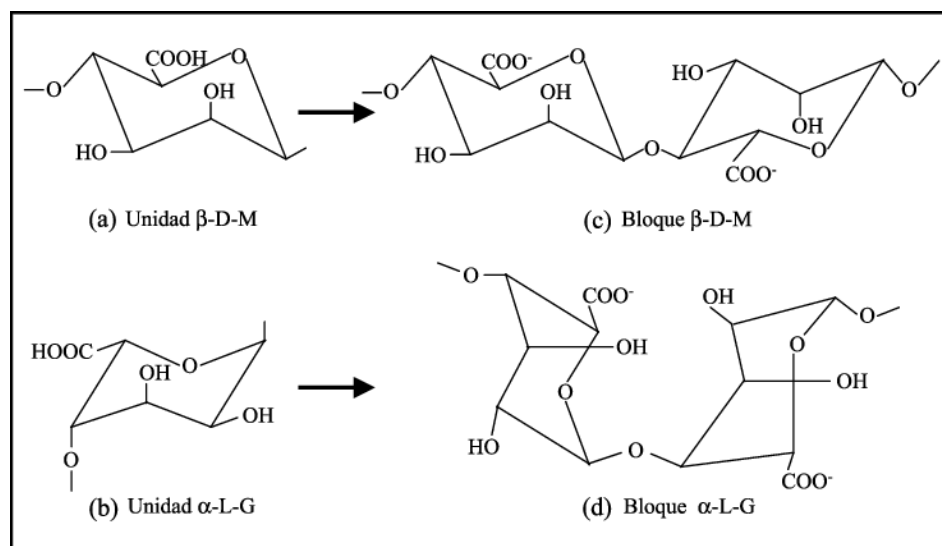


Figura 2.2. Estructura del alginato: (a) y (b) monosacáridos, ácido  $\beta$ -D manurónico y ácido  $\alpha$ -L gulurónico, respectivamente, y (c) y (d) bloques repetidos en cadena [34].

Su estructura le confiere propiedades de interés comercial y científico, de entre todas destacan las siguientes cuatro: 1) habilidad como espesantes al ser disueltos en agua, lo que genera un incremento en la viscosidad de la solución en la que se disuelven, 2) capacidad de retención de agua, 3) propiedad de formar películas, y 4) habilidad de formar

un gel a partir de reacciones químicas de intercambio iónico que da lugar a la formación de enlaces entre las cadenas adyacentes del polímero del alginato [32].

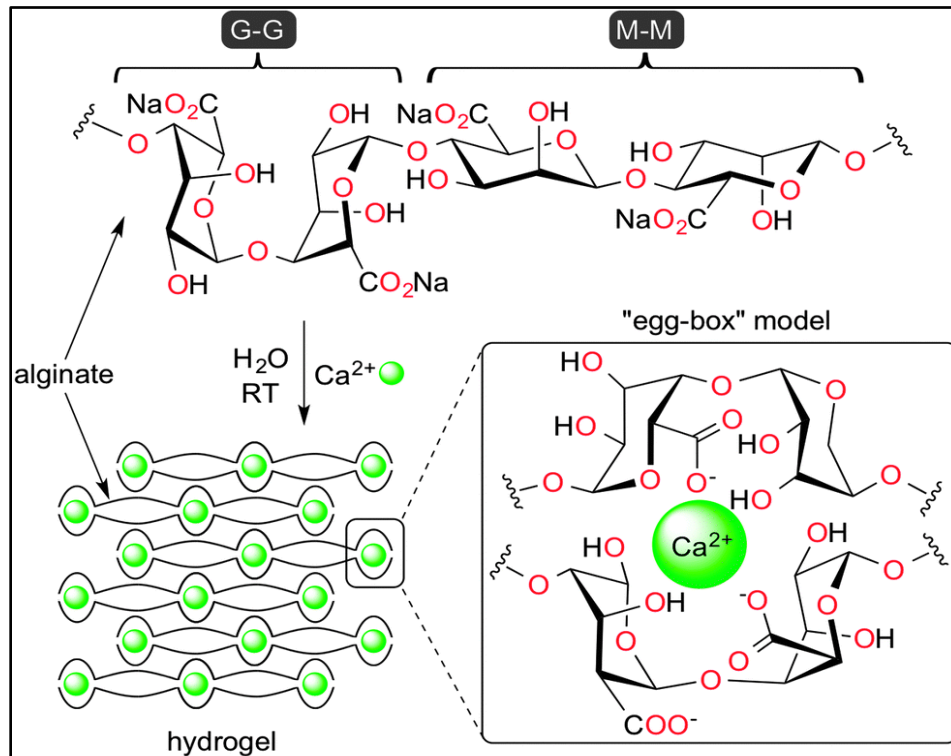


Figura 2.3. Estructura de unidades repetidas de alginato de sodio y la formación del hidrogel mediante la integración de cationes de  $\text{Ca}^{2+}$  entre cadenas de alginato alineadas según el modelo "caja de huevo" [35].

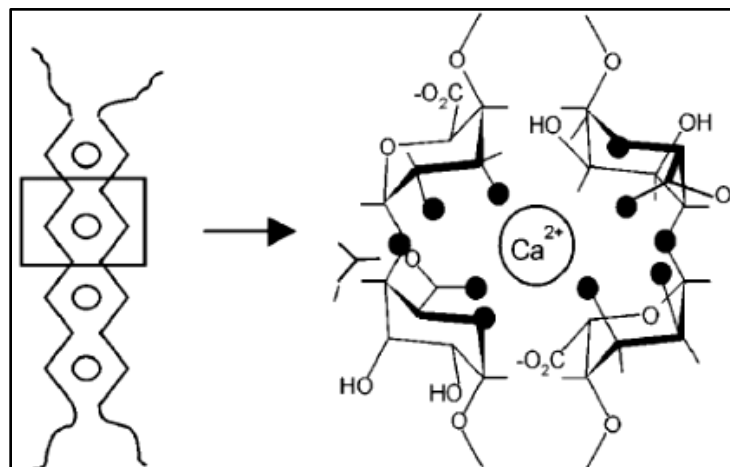


Figura 2.4. Modelo "caja de huevo" [36].

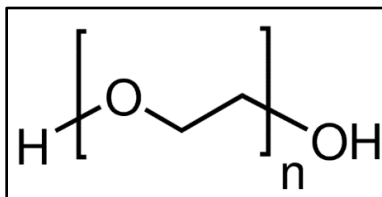
A esta última también se le denomina capacidad de gelificación y es posible en presencia de cationes multivalentes como el ion calcio [37]. La gelificación tiene lugar cuando se

forman *sitios de coordinación* en donde dos cadenas de G-bloques se enlazan físicamente a través del ion calcio contenido entre ambos G-bloques (ver figura 2.3); dicho enlazamiento provoca cambios conformacionales en el alginato y la visualización de la estructura es denominada “caja de huevo” [32, 37] (ver figura 2.4).

La estructura final obtenida del gel dependerá de la hidratación del alginato, la concentración del ion calcio y la proporción del ácido G. Si la estructura polimérica contiene mayor cantidad de G-bloques se obtendrá un gel fuerte y frágil, mientras que si se presenta una mayor proporción de M-bloques el gel será suave y elástico [32].

### **Polietilenglicol**

El PEG en su forma más común es un poliéter polimérico con grupos oxidrilos en sus extremos (figura 2.5) a partir de los cuales puede introducir otros grupos funcionales [38, 39].



*Figura 2.5. Estructura del Polietilenglicol [40].*

El PEG es soluble en agua y en otros solventes orgánicos, dicha habilidad permite que pueda ser aprovechado fácilmente y que la conjugación química con biomoléculas pueda hacerse en condiciones óptimas que no afecten su estabilidad [41].

Entre otras de las propiedades que han atraído el interés de áreas biomédicas y biotecnológicas se encuentran: 1) disminuir la captación celular; 2) excluir a las proteínas y células de las superficies; 3) reducir su inmunogenicidad y antigenicidad; 4) prevenir la degradación de las proteínas por enzimas y células de mamíferos y; 5) formar complejos estables con diferentes metales [42, 39].

Usos y aplicaciones en la industria [43]:

- Lubricantes
- Adhesivos
- Agente antiestático y humectante
- Intermedios químicos

- Tintas y portador de tinte
- Agente desmoldeante
- Plastificante

Entre algunos de los PEG que existen en el mercado, el Polietilenglicol 200 se caracteriza por ser un regulador de viscosidad y solubilizante de productos concentrados. Se puede aplicar como vehículo para medicamentos, formulación de cosméticos, desemulsificante, fluidos hidráulicos, recubrimientos y plastificantes. El PEG se usa como un excipiente en muchos productos farmacéuticos, con sus variantes de menor peso molecular se utilizan como disolventes en líquidos orales tales como jarabes y en cápsulas de diversos medicamentos que se toman vía oral, mientras que las variantes sólidas se utilizan como ungüentos, aglutinantes en películas de recubrimientos, lubricantes y blíster (empacamiento de tabletas) [44].

Cabe mencionar que el nombre del polietilenglicol suele estar acompañado de un número asociado a su peso molecular y dependiendo de este último serán sus características y el estado (sólido o líquido) en que se puede encontrar [45], tal como los siguientes:

- Polietilenglicol 200 y 300
- Polietilenglicol 400
- Polietilenglicol 600
- Polietilenglicol 4000

De entre los anteriores mencionados, para este proyecto se hizo uso del Polietilenglicol 200; este se caracteriza por ser un regulador de viscosidad y solubilizante de productos concentrados [44].

### **Biomasa procedente de *Aloe arborescens***

Pertenece a la familia Aloaceae, el *Aloe arborescens* es una planta con tonalidades verde oscuro - verde azulado, con tallo erguido y bien desarrollado (figura 2.6). Tiene hojas en roseta, erectamente extendidas a extendidas deflexas, lanceoladas-acuminadas, con una longitud promedio de 50 – 60 cm; presentan márgenes con dientes curvados hacia delante que suelen medir 3 – 5 mm. El ancho de la base de las hojas mide en promedio 5 – 7 cm [46].



Figura 2.6. *Aloe arborescens* antes de ser procesada para la obtención de biomasa.

La familia Aloaceae tiene amplia distribución, especialmente en regiones tropicales y subtropicales, con enorme importancia económica y medicinal [46], pues estas han sido empleadas para curar varias enfermedades [47]. De hecho, fue después de la Segunda Guerra Mundial cuando se giró la atención hacia el *Aloe arborescens*, ya que, a base de este se preparó un gel que trató exitosamente las quemaduras de víctimas de la bomba nuclear en Japón [48] y hoy en día se conoce que el extracto de *Aloe arborescens* presenta actividad anticancerígena, antidiabética, inmunomoduladora, antiinflamatoria, antioxidante, antimicrobiana y antifúngica [48, 47].

La importancia económica ha aumentado gracias al creciente interés de la industria por productos que presentan características atractivas como baja toxicidad, biodegradabilidad, disponibilidad y bajo costo en comparación a los sintéticos, como son gomas y mucílagos. Estos últimos son fibras solubles cuya estructura química general corresponde a



polisacáridos heterogéneos con un alto contenido en galactosa, manosa, glucosa y derivados de osas (principalmente ácidos urónicos) [49].

Los mucílagos tienen una gran capacidad de absorción y retención de agua, por ello, se pueden encontrar en cantidades ricas en el tejido parenquimático de *Aloe* (figura 2.7), ya que, las células de este tejido están especializadas en esta función [50, 49].



Figura 2.7. Corte transversal de una hoja de *Aloe arborescens* mostrando: epidermis (A) y tejido parenquimático (B). Imagen obtenida durante el procesado de hojas y obtención de biomasa.

Entre algunas de las aplicaciones que se les ha dado a los mucílagos se encuentran: 1) el mejoramiento de la textura de productos tipo gel, mediante la evaluación del comportamiento reológico [51], y 2) la formación de recubrimientos para retrasar el índice de maduración, pérdida de peso y cambio de color de frutas durante el almacenamiento; siendo incluso más efectivo el *Aloe arborescens* en comparación con el *Aloe barbadensis* [52], por ello, en el desarrollo de este proyecto, se empleó biomasa procedente de *Aloe arborescens* con el propósito de mejorar la estabilidad del agente encapsulante base.

Las concentraciones empleadas de biomasa fueron elegidas con base en las utilizadas en trabajos anteriores de Kiran y colaboradores [51, 53] quienes han abordado el comportamiento reológico y viscoelástico de hidrogeles conteniendo biomasa procedente del género *Aloe*.

## 2.4 EXTRACTO

Se define como extracto a una sustancia compleja concentrada, con multitud de compuestos químicos, que puede ser obtenido por medio de procesos físicos, químicos y/o microbiológicos a partir de una fuente natural [54]. Entre los compuestos químicos que pueden ser encontrados en el extracto son los compuestos fenólicos.

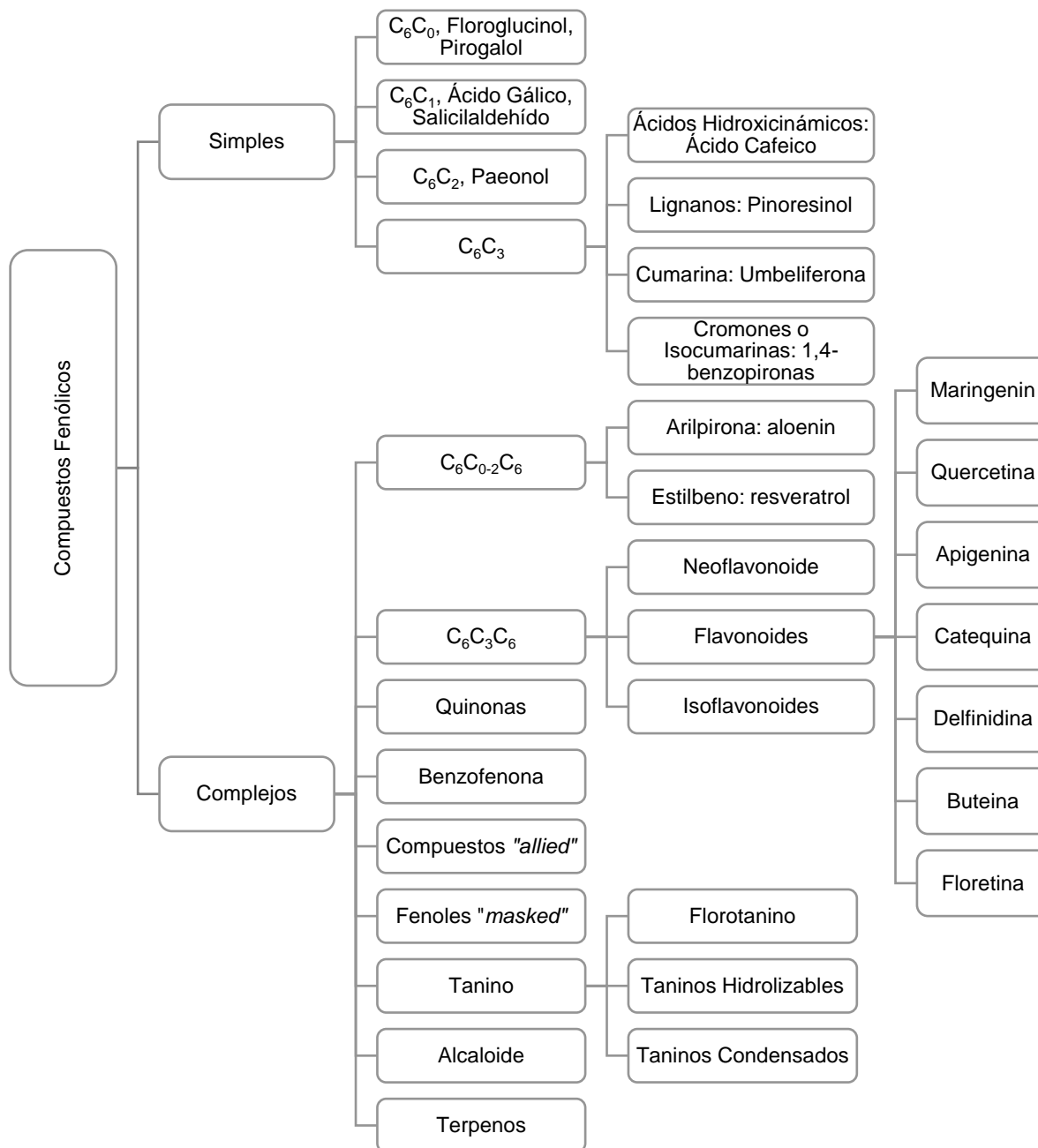


Figura 2.8. Clasificación de compuestos fenólicos [55].

El término “compuestos fenólicos” engloba a *todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol* (nombre popular del hidroxibenceno) unidas a estructuras aromáticas o alifáticas [56]. Pueden clasificarse en simples y complejos y estos a su vez pueden dividirse en subgrupos de acuerdo con el número de carbonos que conforman su estructura general (ver figura 2.8).

Los compuestos fenólicos pertenecen a los principales metabolitos secundarios de las plantas y algunos de ellos contribuyen a su pigmentación; como las antocianinas (del grupo de los flavonoides) que son responsables del color rojo, naranja, azul, púrpura o violeta [56].

Las antocianinas son pigmentos hidrosolubles acumulados en las vacuolas de la célula y se encargan de diferentes funciones en las plantas como son: la atracción de polinizadores, protección contra la radiación UV y contra la contaminación viral y microbiana [57]. Poseen propiedades antioxidantes y estas juegan un papel potencial clave en la prevención de enfermedades degenerativas, como cáncer, enfermedades cardiovasculares, inflamatorias y neurodegenerativas [55, 56, 58].

Se encuentran presentes en diferentes órganos de las plantas como frutas, flores, tallos, hojas y raíces. Algunas de las fuentes principales de antocianinas son las frutas rojas, no obstante, también se ha reportado un alto contenido de antocianinas en plantas como *Clitoria ternatea* [59, 58].

*Clitoria ternatea* es una planta originaria de Asia a la cual se le atribuyen diversos efectos entre los que se encuentran: el efecto antioxidante, analgésico, antiinflamatorio, anticancerígeno, antipirético y antidiabético, entre otros [60].



Figura 2.9. Extracto de *Clitoria ternatea* a cuatro condiciones de pH [61].



El extracto de *Clitoria ternatea* tiene la capacidad de cambiar de color de acuerdo al pH en el que se encuentre [62]. Con pH ácido se presentan tonalidades rosas-rojas, si es básico se tornan verdes-amarillas, mientras que un pH cercano a la neutralidad se intensifican los tonos azules [58, 61], así como se muestra en la figura anterior (figura. 2.9).

Dicha capacidad ya ha sido evaluada para su potencial aplicación como indicador de pH [63], por ese motivo se emplearon flores deshidratadas de *Clitoria ternatea* en este proyecto para la obtención del extracto, ya que este nos otorgaría información acerca del cambio estructural inducido por la concentración de iones hidrógeno, lo que podría sugerir una interacción entre el extracto vegetal y el agente encapsulante base o el agente encapsulante adicionado con biomasa de *Aloe arborescens*.

## **2.5 PROPIEDADES REOLÓGICAS – PUNTO DE FLUJO $G' = G''$**

Las propiedades reológicas se definen como aquellas características presentes en el flujo de un material; estas pueden medirse a través de la deformación de una muestra, haciendo uso de un reómetro o un viscosímetro [7] y, en función de las características que se deseen obtener se aplicará cierto análisis, pues algunas propiedades reológicas son afectadas por condiciones externas aplicadas, como: la tensión, deformación, periodo de tiempo y temperatura [12].

Una de las propiedades de mayor interés es la viscoelasticidad, que hace referencia a la coexistencia de propiedades viscosas y elásticas en un material [9]. Cuando la deformación del material ocurre en el mismo instante de la aplicación del esfuerzo y el material vuelve a su forma original cuando este cesa, se está presentando el comportamiento elástico; mientras que el comportamiento viscoso es dependiente del tiempo y no es reversible [64].

Por lo que, un material viscoelástico se caracteriza por la presencia de una estructura tridimensional incompleta que se destruye por aplicación de un esfuerzo y solo se recupera parcialmente cuando el esfuerzo cesa [9].

El análisis oscilatorio conocido como *barrido de amplitud o amplitud del esfuerzo cortante*, es uno de los análisis más empleados en el estudio de la viscoelasticidad. Dicho análisis consiste someter el material a un esfuerzo o deformación a una frecuencia dada y se mide

la amplitud de la respuesta del esfuerzo cortante y del ángulo de fase ( $\delta$ ) entre el esfuerzo cortante ( $\tau$ ) y la deformación ( $\gamma$ ) [65, 66, 67].

El valor del ángulo de fase  $\delta$  varía entre  $0^\circ$  (para un sólido elástico,  $G'' = 0$ ) y  $90^\circ$  (para un líquido viscoso,  $G' = 0$ ). Por lo que, para un material viscoelástico, el ángulo de fase tendrá un valor intermedio entre  $0^\circ$  y  $90^\circ$ : si el valor del ángulo de  $\delta$  está comprendido entre  $0^\circ$  y  $45^\circ$  el material presenta un comportamiento más elástico que viscoso, y cuando  $\delta$  está comprendido entre  $45^\circ$  y  $90^\circ$  el material es más viscoso que elástico [66, 9].

En el barrido de amplitud se obtienen dos funciones viscoelásticas conocidas como módulos dinámicos:  $G'$  (módulo de almacenamiento – representa el carácter elástico) y  $G''$  (módulo de pérdida – representa el carácter viscoso) [9] que se grafican contra la deformación ( $\gamma$ ), así como se muestra en la figura 2.10.

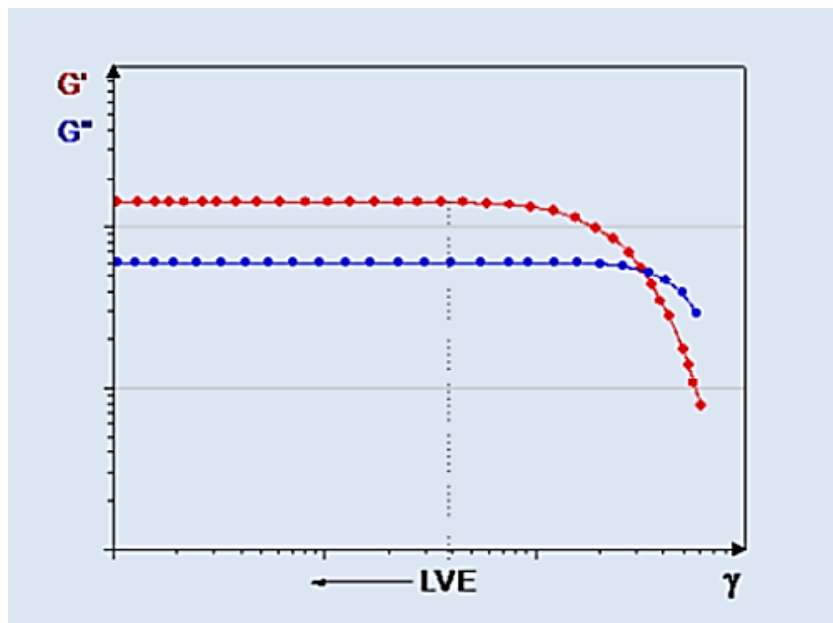


Figura 2.10. Gráfica de barrido de amplitud en donde se trazan los módulos  $G'$  y  $G''$  contra la deformación ( $\gamma$ ) [68].

En la figura anterior puede observarse una región anterior a la intersección entre  $G'$  y  $G''$  que se denomina región *viscoelástica lineal* (LVE, por sus siglas en inglés) e indica el rango en el que se puede realizar la prueba sin destruir la estructura de la muestra ya que  $G'$  y  $G''$  son constantes [65].

La región de transición al flujo es aquella donde se encuentra el “crossover” entre  $G'$  y  $G''$  (punto de flujo  $G'=G''$ ) y se considera como el límite entre el estado de gel (similar a un

sólido) y el estado fluido (similar a un líquido), relacionándose directamente con la estructura interna del material. Dado que las unidades de los módulos dinámicos son los pascales (Pa), el punto de flujo es un parámetro que describe la fuerza necesaria para hacer fluir el material [65, 69, 70].

# Capítulo 3. Desarrollo y descripción de las técnicas empleadas

El desarrollo experimental de este trabajo se llevó a cabo en las instalaciones de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma del Estado de México, empleando los materiales y equipos de los siguientes laboratorios: 1) Laboratorio de Nanotermodinámica y Sistemas Complejos; 2) Laboratorio de Micromecánica; 3) Laboratorio de Reología, Nanofluidos y Microfluidez; 4) Laboratorios de Docencia y; 5) Laboratorio de Procesos Biotecnológicos

Previo al desarrollo de las técnicas empleadas se partió de un mismo proceso, para la preparación de las formulaciones, primero se obtuvo la biomasa de *Aloe arborescens* y el extracto de *Clitoria ternatea*, así como se describe a continuación:

## **Obtención de biomasa de *Aloe arborescens*:**

El procesado de las hojas de aloe es uno de los pasos clave para asegurar la preservación de las características y/o compuestos deseados de la planta. Existen diferentes técnicas y procesos a los que se somete, no obstante, la mayoría de estos involucra dos pasos: 1) lavar hojas recién cortadas y 2) separar la matriz de gel de la corteza [71].

Al momento de la cosecha, se seleccionaron plantas con al menos tres años de edad. La planta fue procesada de inmediato, procurando disminuir el tiempo de exposición con el aire, retrasando así el proceso de oxidación [71]. Se utilizaron únicamente las hojas del *Aloe arborescens*, cuyas características promedio se describen a continuación: longitud: 35.61 cm; masa: 47.01 g; ancho base: 3.72; ancho mitad de la hoja: 2.51 cm; ancho parte más delgada de la hoja: 0.51cm.

El proceso fue basado y modificado a partir de la metodología propuesta por Moreno-Vallespir [72], quedando de la siguiente manera:

1. Cosecha de hojas de aloe

2. Posterior a la cosecha, se realizaron dos lavados a las hojas de *Aloe arborescens*, el primero con agua corriente y el segundo con agua destilada.
3. Las hojas se cortaron en trozos para facilitar la separación de la corteza y el tejido parenquimático de cada hoja de *Aloe arborescens*.
4. Se trituró el tejido parenquimático hasta obtener una apariencia homogénea.
5. La filtración fue por duplicado para retirar la mayor cantidad de residuos sólidos. El primer filtro con tamaño de poro 15-19  $\mu\text{m}$  y el segundo de 8  $\mu\text{m}$  (Reever angel 202; Whatman 2V, respectivamente).
6. Una vez filtrado, se transfirieron 150 ml del líquido a un matraz bola y pasó a un baño refrigerante de hielo seco y acetona.
7. Se ultracongeló a una temperatura de  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante *al menos* 24 horas, y posteriormente, se liofilizó.
8. Terminado el proceso se resguardó la biomasa obtenida en un frasco ámbar.

Durante el procesado de hojas en este proyecto se reporta lo siguiente: por cada  $1,000 \pm 5$  g de hojas de *Aloe arborescens* se consiguió un aproximado de  $494 \pm 5$  g de tejido parenquimático (gel) y de esta, una vez triturada y filtrada se alcanzaron los  $459 \pm 5$  g.

Posterior a la liofilización se obtuvieron  $1.17 \text{ g} \pm 0.05$  de biomasa de *Aloe aroborescens* por cada 100 ml del gel triturado y filtrado.

#### **Obtención de extracto de *Clitoria ternatea*:**

La metodología utilizada para la obtención de extracto de *Clitoria ternatea*, se desarrolló tomando como base la metodología propuesta por Kamkaen y Wilson [73]: se añadieron 0.2 g de flores deshidratadas de *Clitoria ternatea* a un matraz de 125 ml cubierto con aluminio y posteriormente vertiendo 99.8 g de agua destilada; se colocó en una parrilla con agitación constante a  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 40 min. Una vez terminados los 40 min, se dejó reposar hasta que estuviera a temperatura ambiente, se filtró con filtro Whatman 2V (tamaño de poro 8  $\mu\text{m}$ ) y refrigeró hasta su uso.



Figura 3.1. Preparación de la solución para la obtener el extracto de *Clitoria ternatea*

### Formulación y preparación del agente encapsulante base:

Se construyó una propuesta a partir de los métodos desarrollados por López-Córdoba [5] y, Mahou y colaboradores [74], derivando en la siguiente: en un matraz de 150 ml se añadieron los compuestos base (en las concentraciones (p/p) indicadas en las siguientes tablas) y se adicionó el extracto de *Clitoria ternatea* como disolvente para cada formulación.

Inicialmente, se desarrollaron 6 formulaciones base, etiquetadas desde “F1” a “F6”, así como se muestra en la tabla 3.1. Dichas formulaciones se sometieron a las técnicas y métodos comprometidos en los objetivos, no obstante, cuando se adicionó biomasa de *Aloe arborescens* a las formulaciones F4, F5 y F6, se observó un incremento en la viscosidad de las formulaciones que no permitía la formación de perlas. Por tal motivo se desarrollaron formulaciones con 0.5% de ALG y se etiquetaron como F7, F8 y F9.

Una vez obtenida la biomasa de *Aloe arborescens* se resolvió emplear solo cuatro de las nueve formulaciones base para ser adicionadas con estas y poder someter las formulaciones a todas las técnicas empleadas en el proyecto.

Tabla 3.1. Concentraciones iniciales de las formulaciones base del agente encapsulante. Se sombreadaron las formulaciones que serán reportadas.

ALG 1%			ALG 2%			ALG 0.5%		
PEG 1.5%	PEG 5%	PEG 10%	PEG 1.5%	PEG 5%	PEG 10%	PEG 1.5%	PEG 5%	PEG 10%
<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>	<b>F4</b>	<b>F5</b>	<b>F6</b>	<b>F7</b>	<b>F8</b>	<b>F9</b>

Las formulaciones de las cuales se reportan resultados son **F1**, **F3**, **F7** y **F9** (tabla 3.2). La nomenclatura de las formulaciones se conservó tal y como se fueron desarrollando, para facilitar la obtención e identificación de los datos.

Tabla 3.2. Concentración de las formulaciones del agente encapsulante base.

ALG 0.5%		ALG 1%	
PEG 1.5%	PEG 10%	PEG 1.5%	PEG 10%
F7	F9	F1	F3

Se prosiguió llevando el matraz a una parrilla con agitación constante a 60 °C hasta conseguir una mezcla homogénea. El tiempo de disolución fue de una a dos horas, dependiendo de la formulación.

#### Adición de *Aloe arborescens* al agente encapsulante base:

Se replicó el mismo proceso que el de las formulaciones base, no obstante, al momento de añadir los compuestos base, se añadió también la biomasa de *Aloe arborescens* en las siguientes concentraciones (%P/P): 0.2%, 0.4% y 0.6% (ver tabla 3.3). Una vez añadidos los compuestos, el proceso continuó sin modificaciones: se llevó el matraz tapado a la parrilla, y se mantuvo a 60 °C con agitación constante hasta la disolución completa de los compuestos, consiguiendo una mezcla homogénea.

El tiempo de disolución osciló entre una a tres horas (dependiendo de la concentración de compuestos) desde que se colocó el matraz en la parrilla.

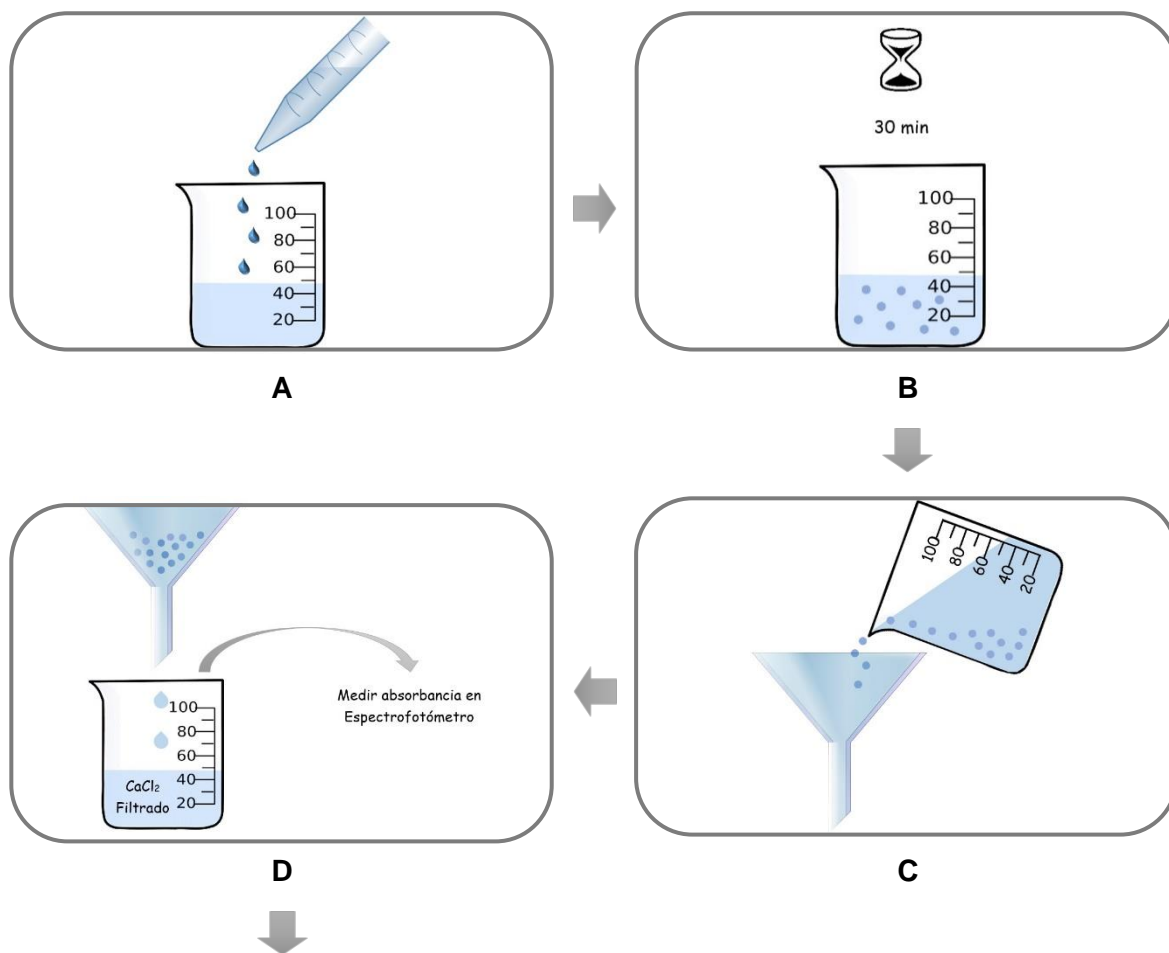
Tabla 3.3. Concentración de las formulaciones del agente encapsulante adicionado con biomasa de *Aloe arborescens*

	Aloe 0%	Aloe 0.2 %	Aloe 0.4%	Aloe 0.6%	
ALG 0.5%	F7	F7.1	F7.2	F7.3	PEG 1.5%
	F9	F9.1	F9.2	F9.3	PEG 10%
ALG 1%	F1	F1.1	F1.2	F1.3	PEG 1.5%
	F3	F3.1	F3.2	F3.3	PEG 10%

### 3.1 EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN

Durante el desarrollo de esta y la siguiente evaluación (Cinética de liberación) fue necesaria la formación de perlas de agente encapsulante, así como se describe a continuación:

1. Se preparó una solución de  $\text{CaCl}_2$  0.5% (p/v) y se vertieron 50 ml de esta en un vaso de precipitado de 100 ml.
2. Se adicionaron (gota a gota) 25 g de la formulación a evaluar en la solución de  $\text{CaCl}_2$  durante 30 minutos (A y B).
3. Una vez terminado el tiempo de reticulación, se filtraron las perlas para separarlas de la solución de  $\text{CaCl}_2$  y esta última se llevó al espectro para medir su absorbancia a 620 nm (C y D).
4. Al finalizar el filtrado se hicieron tres lavados con 50 ml de agua destilada y de igual forma, esta última se llevó al espectro para medir la absorbancia a 620 nm (E y F).





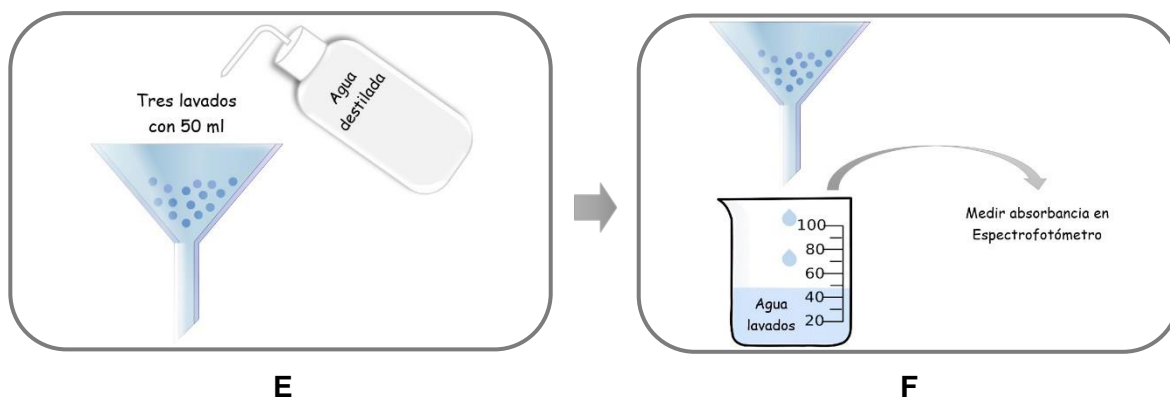


Figura 3.2. Proceso de elaboración de perlas para evaluar eficiencia de encapsulación.

La determinación de la eficiencia de encapsulación (%EE) se llevó a cabo midiendo los valores de absorbancia de: a) extracto acuoso libre, b) agua utilizada para lavado de perlas, c)  $\text{CaCl}_2$  después del tiempo de reticulación; y empleando la siguiente ecuación [5]:

$$\% EE = \left( \frac{Abs_L + Abs_{CaCl_2}}{Abs_{EA}} \right) \times 100$$

Donde:

$Abs_{EA}$  = absorbancia del extracto acuoso libre.

$Abs_L$  = absorbancia obtenida en el agua utilizada para lavar las perlas.

$Abs_{CaCl_2}$  = absorbancia obtenida en la solución de  $\text{CaCl}_2$  después del tiempo de reticulación de las perlas.

### **Rendimiento de masa**

El rendimiento de masa (%Rm) se refiere a la masa que el agente encapsulante conservó una vez reticulado.

La reticulación se llevó a cabo aprovechando la capacidad gelificante del ALG en presencia del ion calcio [35], sin embargo, se sabe que estos no son los únicos factores que determinan el rendimiento de masa [75, 76] y, mediante el análisis de los datos obtenidos con la siguiente ecuación se conoce si la adición de biomasa afecta significativamente la masa final del agente encapsulante una vez transcurrido el tiempo de reticulación.

Y se aplicó la siguiente ecuación:

$$\% Rm = \left( \frac{m_{final}}{m_{inicial}} \right) \times 100$$

Donde:

$m_{inicial}$  = masa inicial del agente encapsulante antes de la reticulación

$m_{final}$  = masa obtenida una vez transcurridos los 30 min de reticulación.

### 3.2 CINÉTICA DE LIBERACIÓN

La siguiente metodología se basó en la metodología aplicada por Escobar-Rojas [25]:

Se pesaron 10 g de perlas frescas (recién formadas) y fueron colocadas en un matraz de 50 ml conteniendo 20 ml de agua destilada; enseguida se tomaron 4 ml de muestra a distintos intervalos de tiempo (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 minutos) y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 620 nm. La evaluación se realizó a tres condiciones de temperatura: 20°, 37° y 40° C, para cada formulación de agente encapsulante.

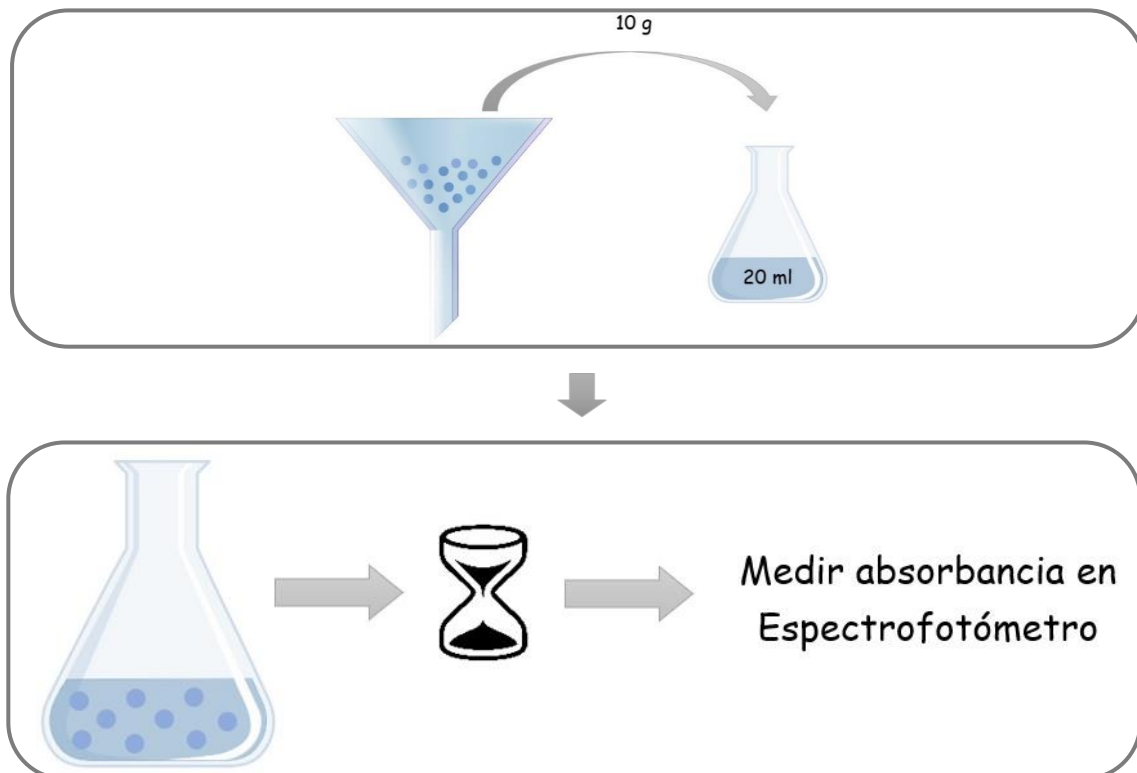


Figura 3.3. Preparación de perlas para medición de absorbancia en el espectrofotómetro.

### 3.3 PUNTO DE FLUJO $G' = G''$

La obtención del punto de flujo se llevó a cabo con el reómetro Haake Mars III (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts) acoplado al software de análisis Haake RheoWin; utilizando una placa superior de diámetro = 35.00 mm, y una placa inferior para módulos de temperatura de diámetro = 35.00 mm.

La evaluación de las muestras se realizó con muestras del agente encapsulante en forma de películas circulares, manteniendo una frecuencia constante de 6.28 rad/s (1 Hz), variando la deformación desde 0.01 hasta 100. Cada muestra se evaluó por triplicado y a tres condiciones de temperatura: 20, 37 y 40 °C.

Mediante el software de análisis Haake RheoWin se obtuvieron las condiciones del *crossover* y de estas se extrajeron solo los datos del punto de flujo ( $G' = G''$ ), y sus promedios son presentados en una tabla en el *capítulo 4, sección 4.3 Punto de Flujo  $G' = G''$* .

### 3.4 VALIDACIÓN ESTADÍSTICA

Se hizo uso del software Excel, para el manejo datos provenientes de las evaluaciones realizadas y su posterior representación en gráficas.

También se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA Multifactorial [77, 78]) mediante el software Statgraphics con un  $\alpha=0.05$ ; considerando las siguientes hipótesis que se aceptaron o rechazaron en función del *valor-p* obtenido.

El valor-p es una probabilidad que mide la evidencia en contra de la hipótesis nula. Las probabilidades más bajas proporcionan una evidencia más fuerte en contra de la hipótesis nula [79].

Las hipótesis que se plantearon son las siguientes:

$$H_0: \mu_{0\%} = \mu_{0.2\%} = \mu_{0.4\%} = \mu_{0.6\%}$$

$H_1$ : *al menos una de las medias de los cuatro tratamientos es diferente*

Es decir, para la hipótesis nula ( $H_0$ ) no existen diferencias estadísticamente significativas en la variable de respuesta (%Rm; %Ee, %CL o punto de flujo) en función de la adición de biomasa de *Aloe arborescens*, mientras que la hipótesis alternativa ( $H_1$ ) considera que sí

existen diferencias estadísticamente significativas en la variable de respuesta en función de la adición de biomasa.

Una vez realizado el análisis ANOVA y habiendo obtenido el *valor-p*, se realizó la comprobación de los tres supuestos (Normalidad, Varianza constante e Independencia), para validar los resultados del análisis:

a) Normalidad: mediante la Gráfica de Probabilidad Normal y la prueba de Shapiro-Wilk (para muestras  $\leq 50$  datos) o la prueba de Kolmogorov-Smirnov (para muestras  $> 50$  datos) [80].

b) Varianza constante: mediante el Gráfico de residuos frente a predichos. Para validar la homogeneidad de varianzas, la gráfica no debió revelar ningún patrón obvio como: forma de embudo que se ensancha [81].

c) Independencia: mediante el Gráfico de residuos frente a número de fila, este no debió revelar ningún patrón marcado para validar la independencia de los datos [81].

Una vez realizada la comprobación de los supuestos, se obtuvo la Prueba de Múltiples Rangos con el Método LSD ( $\alpha=0.05$ ) y el Gráfico de Medias (Método LSD con  $\alpha=0.05$ ), para conocer cuáles tratamientos son diferentes entre sí y provocan la diferencia estadísticamente significativa.

Si los datos no cumplieron el supuesto de normalidad, se realizó una transformación logarítmica de la variable de respuesta y con ello se replicó el ANOVA y la comprobación de supuestos [78].

En aquellas pruebas donde la transformación logarítmica no logró ajustar los datos a una distribución normal, se ejecutó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis que, a diferencia del ANOVA en el que se comparan medias, esta contrasta si las diferentes muestras pertenecen a una misma distribución/población mediante la comparación de medianas [82].

En la prueba de Kruskal-Wallis se consideraron las siguientes hipótesis:

*H<sub>0</sub>: todas las muestras provienen de la misma población (distribución)*

*H<sub>1</sub>: al menos una de las muestras proviene de una población con una distribución distinta*

Cabe resaltar que la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis no se llevó a cabo en los datos obtenidos del punto de flujo, pues no cumplen el supuesto de varianza constante [83].

En ese caso se tomó el valor-p obtenido en el ANOVA Multifactorial con la transformación logarítmica de la variable de respuesta (pese a que no cumplió con el supuesto de normalidad), pues dicho análisis continúa siendo robusto a la falta de normalidad [83].

# Capítulo 4. Presentación y discusión de resultados

## 4.1 EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN

### Eficiencia de encapsulación

Se calculó el porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE) para cada una de las formulaciones por triplicado, obteniendo los valores que se muestran en la figura 4.1.

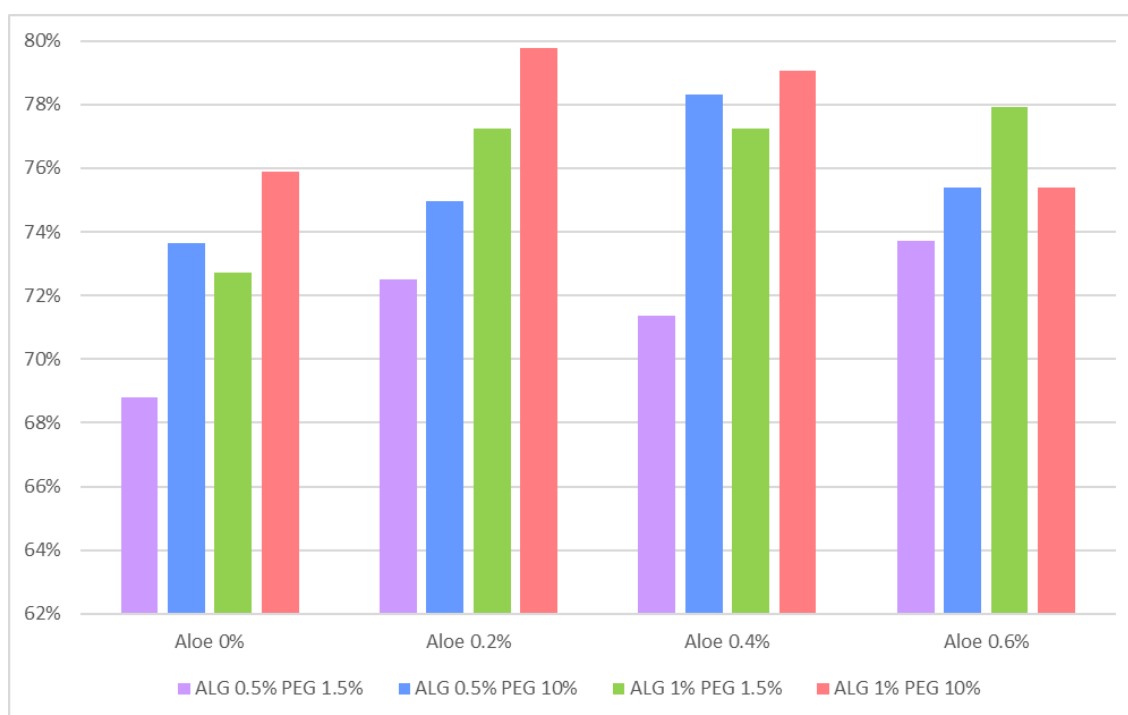


Figura 4.1. Eficiencia de encapsulación de las 12 formulaciones evaluadas.

Los datos mostrados en la tabla anterior son el promedio de tres repeticiones realizadas de cada una de las 12 formulaciones. Estas se agrupan en base a la concentración adicionada de biomasa de *Aloe arborescens* a las formulaciones base. La primera agrupación muestra la eficiencia de encapsulación de las formulaciones base (F7, F9, F1 y F3) y las siguientes son las agrupaciones de las formulaciones adicionadas con 0.2%, 0.4% y 0.6% de biomasa de *Aloe arborescens*.

La formulación base que muestra un incremento proporcional de la eficiencia de encapsulación con respecto a la adición de biomasa es la **F1**, pues va incrementando el %EE conforme incrementa el porcentaje de biomasa adicionada. Ocurre algo similar con la formulación **F9**, no obstante, cuando se adiciona el 0.6% de biomasa, el %EE disminuye.

Con las formulaciones **F7** y **F3** el %EE incrementa con la adición del 0.2% de biomasa, no obstante, disminuye cuando se adiciona el 0.4%, y la formulación **F3** sigue decayendo con la adición del 0.6% de biomasa, mientras que el %EE de la formulación **F7** incrementa con la misma adición (0.6%).

De manera general, la formulación con el %EE más bajo fue una de las formulaciones base: F7 (ALG 0.5% - PEG 1.5%) con un total del 68.8%, mientras que la formulación F3.1 (*Aloe arborescens* 0.2% - ALG 1% - PEG 10%) obtuvo el porcentaje más alto con 79.7%.

Para comprobar si existe un efecto significativo de la adición de biomasa a las formulaciones base, se realizó un análisis ANOVA Multifactorial (Apéndice 1), en donde se obtuvo un *valor-p* = 0.0001, y este valor determina que la adición de biomasa de *Aloe arborescens* tiene una variación que se demuestra por medio de una diferencia estadísticamente significativa sobre el porcentaje de la Eficiencia de Encapsulación.

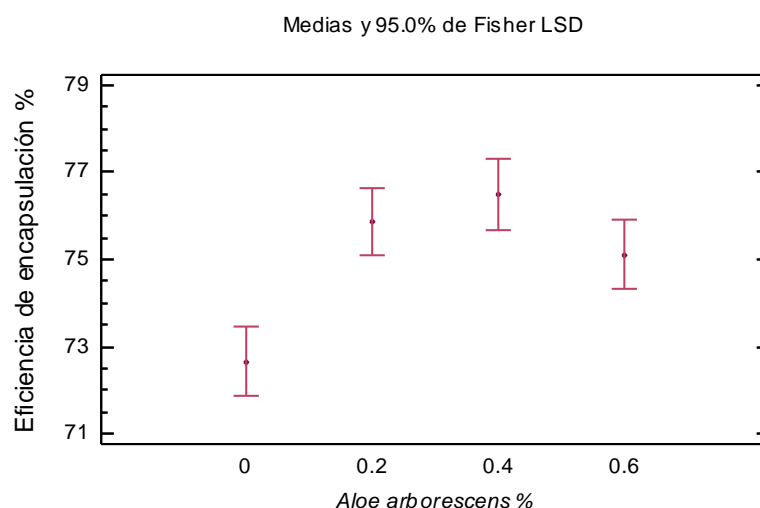


Figura 4.2. Gráfica de Medias (Método LSD 95%) para Eficiencia de encapsulación.

Después de la comprobación de supuestos del análisis se realizó la Prueba de Múltiples rangos para conocer cuáles concentraciones provocaron esa diferencia (figura 4.2) y los resultados señalan que la media del agente encapsulante sin biomasa adicionada es diferente a las medias de las formulaciones adicionadas con biomasa, no obstante, entre ellas (*formulaciones con 0.2%, 0.4% o 0.6% de biomasa*) no se aprecia alguna diferencia estadísticamente significativa.

Lo anterior apunta a que la adición de biomasa de *Aloe arborescens* influyó en el %EE mediante el incremento en la concentración de polímeros que formaban parte del agente encapsulante; y de acuerdo con lo reportado en la literatura, la *concentración de polímeros* es uno de los factores responsables de modificar el %EE [84]; ya que, el incremento en la concentración de polímeros disminuye la porosidad del agente encapsulante, provocando un aumento en la cantidad de compuesto activo encapsulado.

De manera similar, otros autores también han incrementado los porcentajes de eficiencia de encapsulación mediante la combinación y/o adición de polímeros en matrices o agentes encapsulantes que incrementen la eficiencia de encapsulación, tal es el caso de:

López-Córdoba obtuvo una eficiencia de encapsulación del 55% en cápsulas de alginato 2%, incrementando el porcentaje al 65% cuando creó el sistema de encapsulación compuesto de almidón 2% y alginato 2% para encapsular el extracto de *Ilex paraguariensis* (yerba mate) [5]; mientras que Escobar-Rojas presenta un porcentaje de encapsulación de 76.9% y 79.3% de dos extractos de brácteas de *Bougainvillea sp.* (bugambilia) encapsulados en perlas de alginato 1% y almidón de maíz 1% [25].

El incremento en el %EE debido a la adición de biomasa de *Aloe arborescens* representa una ventaja acerca de las cualidades deseadas en un agente encapsulante, ya que, con menos materia prima para el agente encapsulante sería posible encapsular más cantidad del compuesto activo de interés; sin embargo, el aumentar demasiado la concentración de biomasa o polímeros, podría provocar que la textura del agente encapsulante sea muy densa y no permita la adecuada encapsulación del compuesto de interés.

Con base en los resultados obtenidos, se podría lograr un incremento en el porcentaje de Eficiencia de encapsulación partir de la adición del 0.2% de biomasa de *Aloe arborescens* y no sería necesario incrementar el porcentaje de biomasa, lo que representaría una disminución de costos y recursos energéticos, pues la liofilización es un proceso



dependiente de estos, logrando así la disminución en el impacto ambiental al disminuir la cantidad de biomasa requerida.

### Rendimiento de masa

De acuerdo con los valores obtenidos en cada una de las formulaciones del rendimiento de masa (%Rm) se obtuvo lo siguiente: la formulación con el rendimiento más bajo fue la formulación F9.3 (ALG 0.5% - PEG 10% - 0.6%) con un valor total del 46.2% y la formulación con el rendimiento más alto fue la F3 (ALG 1% - PEG 10%) con un 97.6% de rendimiento.

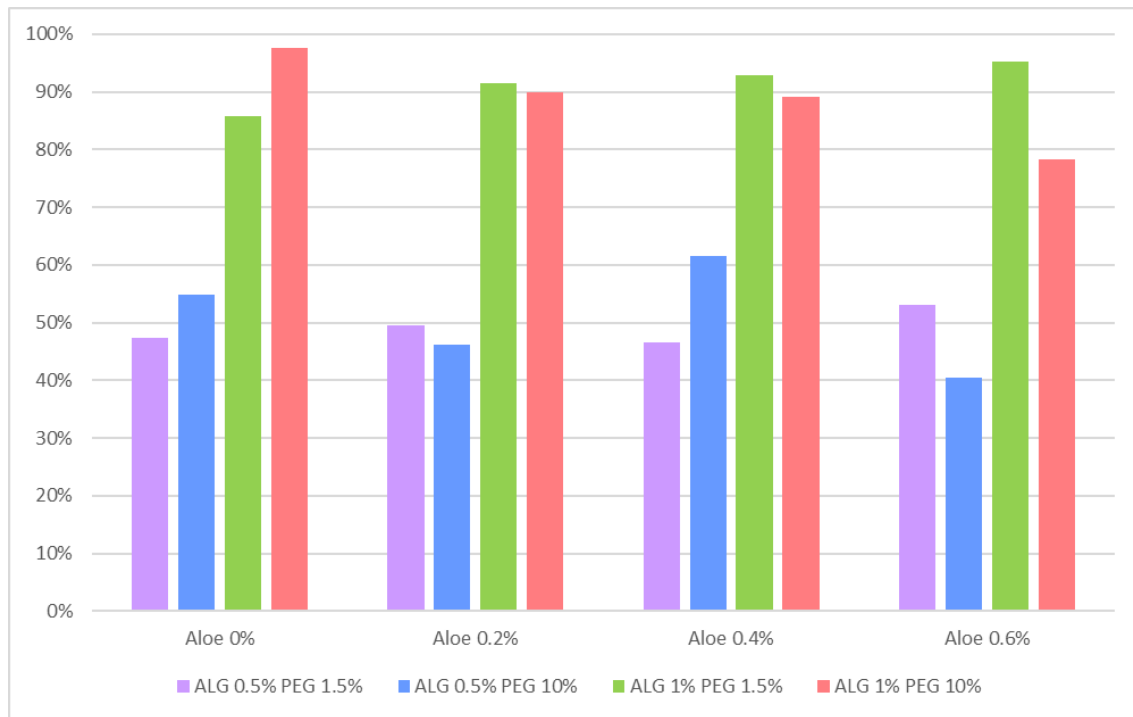


Figura 4.3. Rendimiento en masa de las 12 formulaciones del agente encapsulante.

La figura 4.3 muestra los datos agrupados de la siguiente forma: cada una de las cuatro agrupaciones corresponde a la concentración de biomasa adicionada (0%, 0.2%, 0.4% y 0.6%). Cada agrupación contiene cuatro columnas y estas corresponden a las cuatro formulaciones base del agente encapsulante: F7, F9, F1 y F3, respectivamente.)

A primera vista y considerando los porcentajes de rendimiento obtenidos, podría suponerse que existen diferencias en el rendimiento de las formulaciones, no obstante, las diferencias no se presentan de manera proporcional a la adición de biomasa.

El rendimiento presentado en las formulaciones F7 y F9 es menor, sean o no adicionadas con biomasa de *Aloe arborescens*, pues se obtienen valores menores al 65% mientras que las formulaciones F1 y F3 presentan rendimientos de entre 75 – 97%.

Las formulaciones F7 y F9 comparten la misma cantidad de ALG (0.5%), y de manera similar ocurre con las formulaciones F1 y F3 que comparten el 1% de ALG. Entonces podría suponerse que el %Rm no se ve afectado por la cantidad de biomasa adicionada sino del porcentaje de alginato que se encuentre en las formulaciones, ya sea un 0.5 o 1%.

Para comprobar que la adición de biomasa no afecta el porcentaje de rendimiento, se realizó el análisis estadístico (Apéndice 2) en donde se obtuvo un *valor-p* = 0.944713, el cual, implicaría que la adición de biomasa no provoca diferencias estadísticamente significativas en las medianas del Rendimiento de masa (figura 4.4). Esto quiere decir que la adición de biomasa de *Aloe arborescens* no provoca aumento o disminución de masa en las perlas.

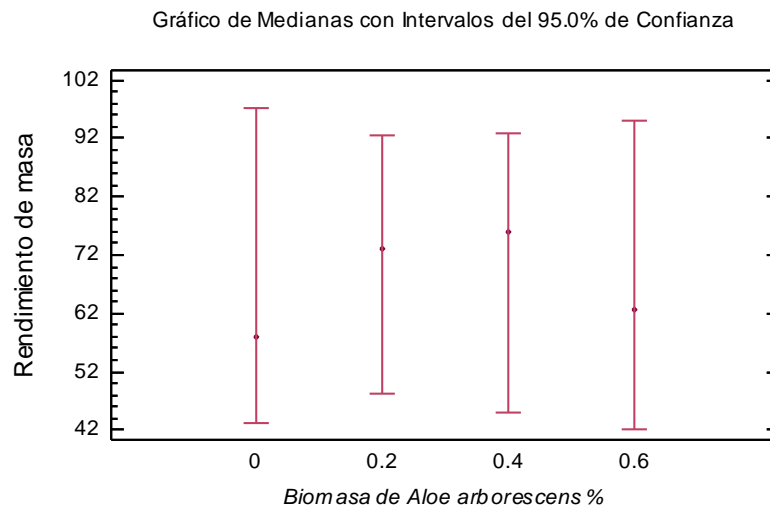


Figura 4.4. Gráfico de medianas del Rendimiento de masa.

De acuerdo con la literatura, los factores que sí tienen un impacto significativo sobre el rendimiento en masa de las perlas son: el ALG y el  $\text{CaCl}_2$ , ya que están directamente involucrados con la gelificación [37].

Si la biomasa hubiese provocado cambios estadísticamente significativos en el rendimiento en masa, probablemente estaría interactuando con los dos compuestos anteriores, puesto que la gelificación se lleva a cabo cuando el ion calcio provoca enlazamiento en los sitios de coordinación de los G-bloques y se forma la estructura “caja de huevo” [37, 32]. Si se hubiera visualizado un aumento en el %Rm indicaría que la adición de biomasa favorece la interacción entre el ion calcio y el ALG; mientras que, si el %Rm hubiera disminuido, estaría indicando que dicha adición perjudica la interacción del ion calcio y los sitios de coordinación.

Ahora bien, retomando la información obtenida del %EE más la del %Rm: los resultados apuntan a la posible obtención de un agente encapsulante que, adicionado con biomasa de *Aloe arborescens* podría incrementar su eficiencia de encapsulación sin que dicha adición comprometa la interacción entre el ALG y los iones de calcio necesarios para la reticulación del agente encapsulante.

## 4.2 CINÉTICA DE LIBERACIÓN

A continuación, se presentan tres figuras: cada una presentando los datos del porcentaje de liberación obtenido a cierta temperatura (20, 37 y 40 °C). El seguimiento en la cinética de liberación se realizó hasta los 100 min, no obstante, los datos reportados en cada gráfica corresponden a los primeros 60 min.

El porcentaje liberado en esos 60 min se muestra por intervalos de tiempo (0, 20, 40 y 60 min) mediante tramas. Los colores señalan las formulaciones a las que corresponden las columnas: F7, F9, F1 y F3; y las cuatro agrupaciones de columnas indican la cantidad de biomasa adicionada a dichas formulaciones.

La figura 4.5 corresponde a la cinética de liberación realizada a 20 °C y en esta se presenta un porcentaje de liberación no mayor al 18%. También se puede observar que las formulaciones sin biomasa y las adicionadas con 0.2 y 0.6% de biomasa, presentan un comportamiento descendente en el siguiente orden: F7 > F9 > F1 > F3.

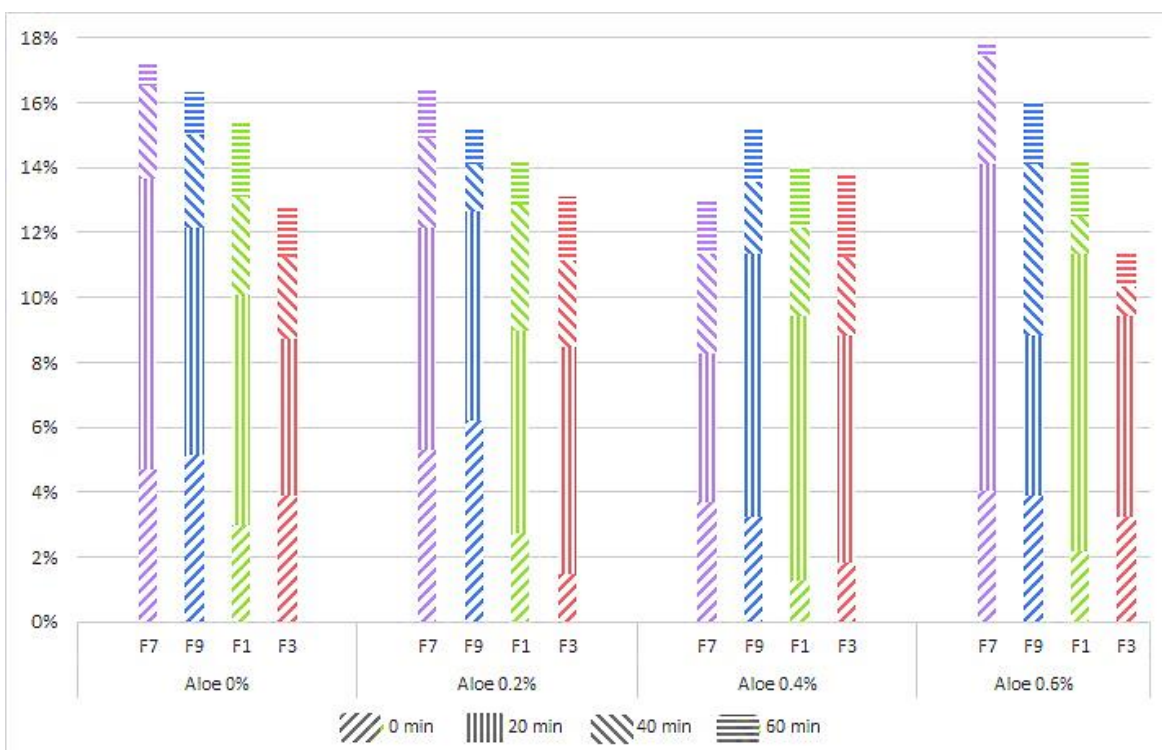


Figura 4.5. Cinética de liberación a 20 °C.

La única agrupación de formulaciones que no presenta ese comportamiento es la agrupación con el 0.4% de biomasa de *Aloe arborescens*. Esta presenta una ligera diferencia, ya que la formulación **F7** (F7.2) presenta un porcentaje de liberación menor que las demás formulaciones; exhibiendo el siguiente comportamiento: **F7 < F9 > F1 > F3**.

En todas las formulaciones a 20 °C, se liberó más del 10% del extracto durante los primeros 20 min, esto equivale a más del 50% del extracto reportado en la cinética de liberación. Las únicas formulaciones que presentaron un porcentaje de liberación < 10% fueron las **F3** (ALG 1% - PEG 10%) con 0, 0.2, 0.4 y 0.6% de biomasa adicionada.

La siguiente figura (figura 4.6) presenta la cinética de liberación a 37 °C y en esta el porcentaje más alto de extracto liberado fue de 19%.

Durante esta liberación, las formulaciones con 0.2 y 0.6% de biomasa adicionada exhibieron un comportamiento descendente similar al de la cinética a 20 °C: **F7 > F9 > F1 > F3**; mientras que el comportamiento para las formulaciones sin biomasa es: **F7 > F9 < F1 > F3**, y el de las formulaciones con 0.4% de biomasa adicionada es de: **F7 < F9 < F1 > F3**.

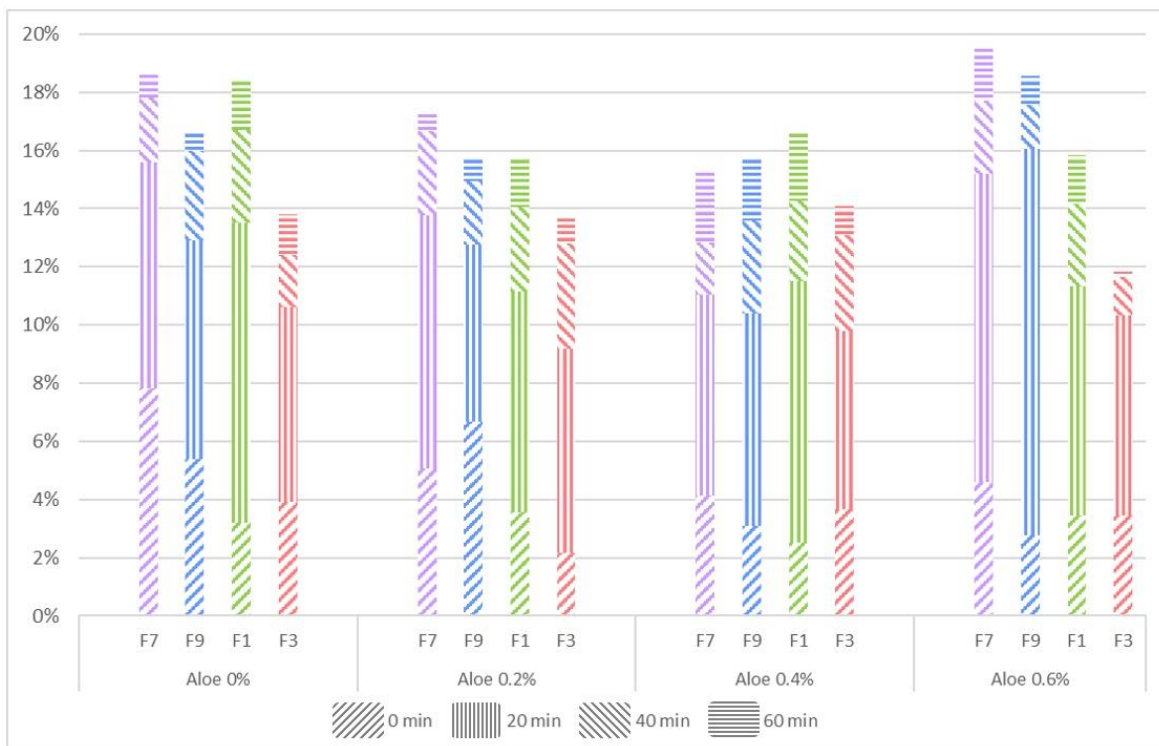


Figura 4.6. Cinética de liberación a 37 °C.

De igual manera, la cinética de liberación a 37 °C también presenta un porcentaje de liberación superior al 10% durante los primeros 20 minutos (en caso todas las formulaciones a excepción de las **F3** con 0.2 y 0.4% de biomasa adicionada (formulaciones F3.1 y F3.2, respectivamente)).

La última gráfica de cinética de liberación (figura 4.7) corresponde a la que se llevó a cabo a 40 °C. En esta, el comportamiento es prácticamente el mismo que el exhibido a 37 °C. Las formulaciones con 0.2 y 0.6% de biomasa presentaron un comportamiento descendente: **F7** > **F9** > **F1** > **F3**.

La agrupación de formulaciones con el 0.4% de biomasa adicionada exhibió un comportamiento ascendente hasta la formulación F1 (F1.2), porque después disminuyó el porcentaje de encapsulación en la formulación F3 (F3.2). Se describe de la siguiente manera: **F7** > **F9** < **F1** > **F3**. Y, al igual que en las formulaciones sin biomasa, la agrupación de formulaciones presentó un comportamiento oscilante: **F7** > **F9** < **F1** > **F3**.

Realizando una comparación con los datos, el porcentaje de liberación solo tuvo una variación del 1%, siendo que la temperatura tuvo diferencias de entre 17 y 20 °C.

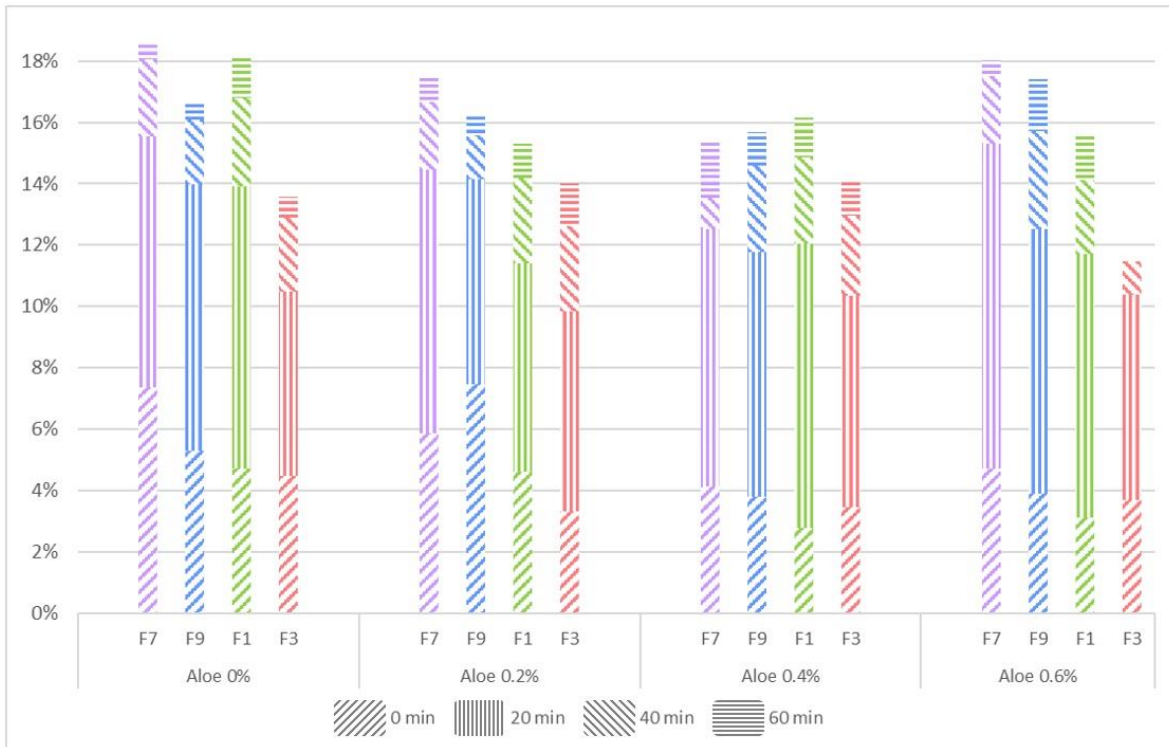


Figura 4.7. Cinética de liberación a 40 °C.

Se realizó el análisis estadístico (Apéndice 3) y se obtuvo que el valor-p del factor principal (*Aloe arborescens*) fue de 0.8099.

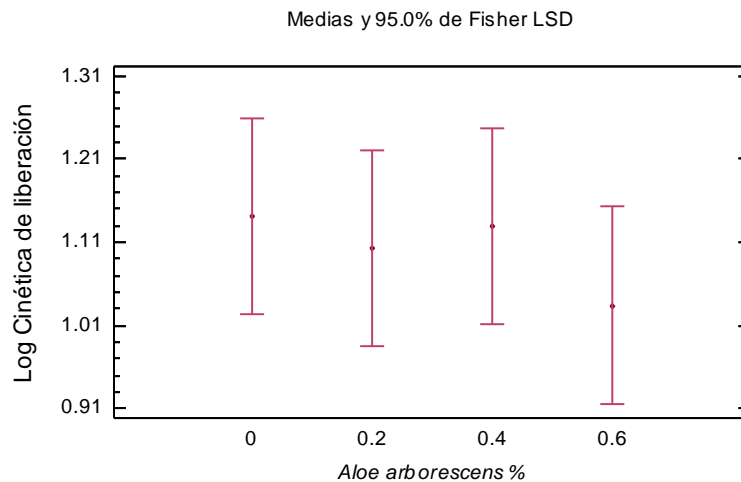


Figura 4.8. Gráfica de Medias (Método LSD 95%) para Log Cinética de liberación.

Dicho valor determina que la adición de biomasa no provoca una diferencia estadísticamente significativa sobre el porcentaje de extracto liberado. Esta determinación del análisis puede visualizarse mejor en la Gráfica de Medias (figura 4.8), en la cual se muestra que la concentración de biomasa adicionada a las formulaciones no provoca una diferencia estadísticamente significativa en las medias de la cinética de liberación.

Ahora bien, de acuerdo con la literatura, dos de las variables indispensables en la cinética de liberación son la temperatura y el tiempo [29, 30], por ello también se obtuvieron los valores-p de estas; resultando en lo siguiente:

El valor-p del tiempo fue  $0.0000$ , el cual indica que el tiempo sí afecta la cinética de liberación y esto se puede apreciar visualmente en las figuras anteriores (fig. 4.5, 4.6 y 4.7), mediante las tramas que representan los intervalos de tiempo.

Para la temperatura se obtuvo un valor-p =  $0.9291$ . Este señala que la temperatura no afecta la cinética de liberación y de alguna manera se intuía, ya que los porcentajes máximos obtenidos en la cinética de liberación solo presentaron una variación del 1%, mientras que la temperatura presentó variaciones de 17 - 20 °C con respecto a la temperatura más baja (20 °C).

Si la temperatura no influyó en la cinética de liberación puede ser atribuible a dos causas, la primera es que las formulaciones del agente encapsulante son capaces de mantener un porcentaje de liberación “constante” pese a las condiciones de temperatura, siempre y cuando el rango de temperatura oscile entre 20 – 40 °C, lo cual abriría una ventana de oportunidad, pues se habría formulado un agente encapsulante que favorece el control de la liberación del extracto o compuesto de interés.

La segunda causa del por qué la temperatura no presentó un efecto estadísticamente significativo sobre la cinética de liberación podría ser un error experimental, ya que la biomasa provocó un cambio de coloración en las formulaciones (figura 4.9 y Apéndice 4).

Como se describió anteriormente, el extracto de *Clitoria ternatea* es sensible a las variaciones de pH [62]; por lo que el cambio en la coloración implicaría que la biomasa está interactuando con el compuesto.

En condiciones de pH cercano a la neutralidad el extracto de *Clitoria ternatea* tiene tonos azules [58, 61] y estos son consistentes en las formulaciones base (sin biomasa

adicionada); a medida que se incrementa el porcentaje de biomasa de *Aloe arborescens*, se destacan más los tonos verdes, los cuales se presentan cuando el pH es cercano a 10 [62].



Figura 4.9. Cinética de liberación de perlas sin biomasa adicionada (izquierda) y cinética de liberación de perlas adicionadas con 0.6% de biomasa de *Aloe arborescens* (derecha).

El cambio de coloración sugiere que el agente encapsulante adicionado con biomasa de *Aloe arborescens* no está preservando el extracto, sino que está interactuando con él y esto puede ser el motivo de un error experimental durante la obtención de los datos, ya que estos se obtuvieron por medio del registro de absorbancia y algunos autores registran que la longitud de onda del pico de absorción cambia cuando se modifica el pH del extracto de *Clitoria ternatea* [61].

### 4.3 PUNTO DE FLUJO $G' = G''$

Durante la prueba oscilatoria de barrido de amplitud se obtuvieron las condiciones del *crossover* entre  $G'$  y  $G''$  de cada triplicado de las formulaciones y entre algunas de las propiedades reológicas arrojadas por el software se destacan las siguientes: punto de flujo, esfuerzo cortante y deformación.

Para los objetivos del proyecto y dada su importancia práctica, solo se reporta los datos obtenidos en punto de flujo ( $G'=G''$ ). Por último, es importante resaltar que las unidades de los datos mostrados son los pascales (Pa).



Tabla 4.1. Punto de flujo ( $G'=G''$ ) de cada formulación a 20, 37, y 40°C.

Formulación	%Aloe	%ALG	%PEG	20 °C	37 °C	40 °C
F7	0	0.5	1.5	37.28	22.78	20.59
F9			10	151.82	37.93	4.45
F1		1	1.5	300.33	213.67	211.03
F3			10	186.31	331.93	335.20
F7.1	0.2	0.5	1.5	38.80	20.33	24.90
F9.1			10	29.53	6.64	26.61
F1.1		1	1.5	240.17	205.58	216.73
F3.1			10	266.43	238.43	254.43
F7.2	0.4	0.5	1.5	38.52	16.36	16.53
F9.2			10	78.53	30.86	26.38
F1.2		1	1.5	264.14	155.79	256.90
F3.2			10	357.97	173.84	129.28
F7.3	0.6	0.5	1.5	14.11	7.98	15.41
F9.3			10	17.34	10.19	4.58
F1.3		1	1.5	139.15	228.33	162.95
F3.3			10	297.67	221.50	170.10

En la tabla 4.1 se aprecian valores que van desde los 4.45 Pa (formulación F9 a 40°C), hasta los 357.97 Pa (formulación F3.2 a 20°C), la primera de ellas no está adicionada con biomasa y la segunda sí; por lo que se realizó el análisis estadístico (Apéndice 5) para comprobar si la adición de biomasa influye en la presión obtenida del punto de flujo.

Para el factor principal (biomasa de *Aloe arborescens*) el valor-p obtenido en el análisis fue de 0.0050, el cual confirma que la adición de biomasa provoca un efecto estadísticamente sobre el punto de flujo.

Una vez que se realizó la Prueba de Múltiples Rangos se determinó que, la diferencia estadísticamente significativa es provocada por la concentración del 0.6% de biomasa de *Aloe arborescens*. no obstante, y contrario a lo que se esperaba, la diferencia está marcada porque dicha concentración disminuye los valores del punto de flujo.

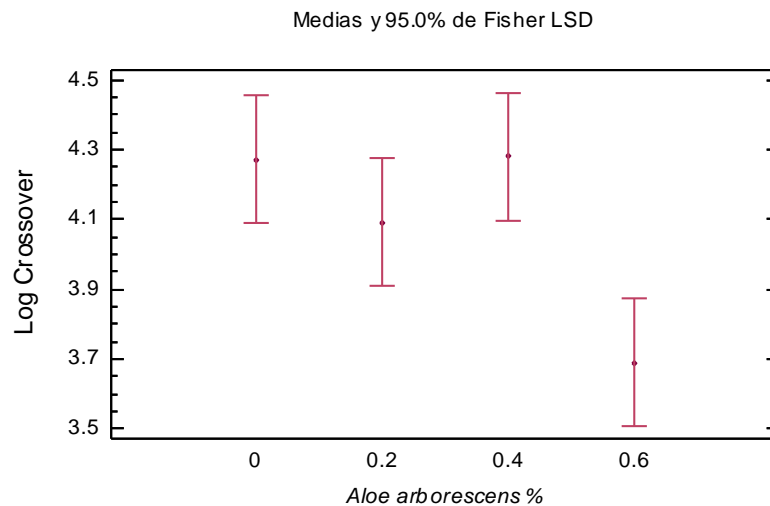


Figura 4.10. Gráfica de Medias (Método LSD 95%) para Log crossover entre  $G'$  y  $G''$ .

La figura de arriba muestra de manera gráfica lo obtenido en la Prueba de Múltiples Rangos; el punto de flujo de las formulaciones con: 0, 0.2 y 0.4% de biomasa de *Aloe arborescens* se mantuvo sin presentar variación estadísticamente significativa, mientras que el punto de flujo de las formulaciones adicionadas con el 0.6% de biomasa disminuye.

Lo anterior implicaría que, la presión necesaria para hacer fluir y destruir la estructura tipo gel de las formulaciones de agente encapsulante con 0, 0.2 y 0.4% de biomasa de *Aloe arborescens* es la misma; mientras que, para las formulaciones adicionadas con el 0.6% de biomasa sería necesario disminuir la presión aplicada para destruir la estructura del agente encapsulante.

# Conclusiones

Se evaluó la adición de biomasa de *Aloe arborescens* mediante los cambios que la adición de biomasa de *Aloe arborescens* ocasionó sobre la eficiencia de encapsulación (%EE), el rendimiento en masa (%Rm), la cinética de liberación (%CL) y el punto de flujo ( $G'=G''$ ) de cada una de las 16 formulaciones de agente encapsulante.

La adición de biomasa de *Aloe arborescens* provocó un efecto estadísticamente significativo sobre la eficiencia de encapsulación (%EE) que se manifestó por medio del incremento en la eficiencia de encapsulación a partir de la concentración del 0.2% de biomasa.

El punto de flujo también se vio afectado por la adición de biomasa, no obstante, el efecto se presentó hasta que la adición de biomasa fue del 0.6%. Las formulaciones con las concentraciones del 0.2 y 0.4% de biomasa no presentaron diferencias a las de las formulaciones sin biomasa.

En el rendimiento de masa permaneció constante en todas las formulaciones sin importar la adición de biomasa de *Aloe arborescens* por lo que no reflejó algún efecto estadísticamente significativo.

En análisis estadístico de la cinética de liberación también señaló que la adición de biomasa no provocó diferencias estadísticamente significativas entre las formulaciones sin biomasa y las adicionadas con 0.2, 0.4 y 0.6% de biomasa de *Aloe arborescens*. Aunque, dicha resolución del análisis pudo ser afectada por la interacción entre la biomasa y el extracto de *Clitoria ternatea*.

Por último, las formulaciones adicionadas con biomasa de *Aloe arborescens* incrementan la eficiencia de encapsulación a partir del 0.2% de biomasa, mantienen el mismo rendimiento de masa en todas las concentraciones y su punto de flujo permanece estable hasta el 0.4% de biomasa, aunque no fue posible garantizar su carácter preservador debido al cambio de color ocasionado por la adición de biomasa.

# Perspectivas

Para verificar la disminución de la estructura en el tamaño de poro del agente encapsulante, podría realizarse una observación con el Microscopio de Fuerza Atómica.

Como una alternativa al liofilizado, sería posible que las formulaciones se prepararan de manera inmediata posterior a la cosecha y procesado.

Se podría evaluar si el 0.1% de biomasa de *Aloe arborescens* logra incrementar la eficiencia de encapsulación.

Sería conveniente que en futuros proyectos se llevara un registro del pH de las formulaciones y se realizara el seguimiento de cinética de liberación considerándolo, ya que de este modo se podría modificar la longitud de onda con la que se trabajaría.

También se podría realizar la encapsulación de otro extracto o compuesto de interés para verificar si la biomasa de *Aloe arborescens* interactúa con él o si solo se presentó con el extracto de *Clitoria ternatea*.

# REFERENCIAS

- [1] International Union of Pure and Applied Chemistry, «Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"),» Blackwell Scientific Publications, Oxford, 2008.
- [2] Real Academia Española, «Diccionario de la lengua española,» Real Academia Española , Madrid, 2019.
- [3] Sigma-Aldrich, «Drug Delivery FAQs,» Merck KGaA, Darmstadt, 2020.
- [4] Revista Iberoamericana de Polímeros, «Glosario de Terminología Reológica,» abril 2002. [En línea]. Available: <http://www.ehu.es/reviberpol/pdf/abr/reologia.pdf>. [Último acceso: 12 octubre 2020].
- [5] A. F. López Córdoba, Desarrollo de sistemas de encapsulación compuestos para la protección de extractos antioxidantes de yerba mate, Buenos Aires : Universidad Nacional de la Plata, 2012.
- [6] V. M. Sandoval Peraza, T. Cu Cañetas , G. Peraza Mercado y P. O. M. Acereto Escoffié, «Introducción en los procesos de encapsulación de las moléculas nutraceuticas,» de *Propiedades funcionales de hoy*, Barcelona, OmniaScience, 2016, pp. 181-218.
- [7] Schlumberger, «Schlumberger Oilfield Glossary en Español,» Schlumberger Limited, Houston , 2020.
- [8] GEA Group Aktiengesellschaft, «GEA Group Aktiengesellschaft,» 2020. [En línea]. Available: [https://www.gea.com/es/binaries/centrifuges-in-extraction-processes-gea\\_tcm25-23532.pdf](https://www.gea.com/es/binaries/centrifuges-in-extraction-processes-gea_tcm25-23532.pdf). [Último acceso: 15 10 2020].
- [9] F. M. León-Martínez, Secado por aspersión de mucílago de nopal (*Opuntia ficus indica*) y su efecto en las propiedades reológicas de los polvos recostituidos, Santa Cruz Xoxocotlán : Instituto Politécnico Nacional , 2010.
- [10] J. L. Escobar, D. M. García , D. Zaldivar y I. Katime, «Hidrogeles. Principales características en el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos,» *Revista Iberoamericana Polímeros*, vol. 3, nº 3, pp. 1-25, 2002.

- [11] A. Neira Carrillo, D. Yáñez Muñoz, P. Aguirre Zazzali, Y. Amar Marini, S. Vidal Vilches y R. Egala Palma, «Encapsulación de Biomoléculas Usando Polímeros Naturales: " Un Nuevo Enfoque en la Entrega de Fármacos en Medicina",» *Avances en Ciencias Veterinarias*, vol. 28, nº 2, pp. 31-41, 2013.
- [12] IESMAT - Instrumentación Específica de Materiales, «Reología,» IESMAT - Instrumentación Específica de Materiales, Madrid, 2020.
- [13] Malvern Instruments Worldwide, «Technology Networks,» 2016. [En línea]. Available: <https://cdn.technologynetworks.com/TN/Resources/PDF/WP160620BasicIntroRheology.pdf>. [Último acceso: 07 octubre 2020].
- [14] G. Aguilar Sahagún, *El hombre y los materiales*, México: Fondo de Cultura Económica, 1997.
- [15] Universidad de Burgos, «Materiales | Una historia sobre la evolución humana y los avances tecnológicos (Introducción),» Universidad de Burgos , Burgos, 2020.
- [16] M. Bizarro, «Instituto de Investigaciones en Materiales,» 2013. [En línea]. Available: <http://www.iim.unam.mx/mbizarro/1-Historia%20de%20los%20materiales%202013-2.pdf>. [Último acceso: 03 enero 2020].
- [17] J. Galvele, *Materiales y materias primas. Los materiales y la humanidad*, Buenos Aires: Ministerio de Educación, Ciencia y Tecnología - Instituto Nacional de Educación Tecnológica, 2011.
- [18] Naciones Unidas, «Objetivos de Desarrollo Sostenible | Naciones Unidas,» Naciones Unidas, 25 septiembre 2015. [En línea]. Available: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>. [Último acceso: 18 octubre 2020].
- [19] R. A. Parra-Huertas, «Revisión: Microencapsulación de Alimentos,» *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, vol. 63, nº 2, pp. 5669-5684, 2010.
- [20] B. Šumiga, B. Šumiga, D. Ravnjak y B. Boh-Podgornik, «Antimicrobial Paper Coatings Containing Microencapsulated *Cymbopogon citratus* Oil,» *Coatings*, vol. 9, nº 8, pp. 1-20, 2019.
- [21] B. Boh y B. Sumiga, «Microencapsulation technology and its applications in building construction materials,» *Materials and Geoenvironment*, vol. 55, nº 3, pp. 329-344, 2008.

- [22] B. F. Gibbs, S. Kermasha, I. Alli y C. N. Mulligan, «Encapsulation in the food industry: a review,» *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, vol. 50, nº 3, pp. 213-224, 1999.
- [23] A. Madene, M. Jacquot, J. Scher y S. Desobry, «Flavour encapsulation and controlled release - a review,» *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 41, pp. 1-21, 2006.
- [24] J. Yáñez Fernández, J. A. Salazar Montoya, L. Chaires Martínez, J. Jiménez Hernández y E. G. Ramos Ramírez, «Aplicaciones Biotecnológicas de la Microencapsulación,» *Mundo Alimentario*, vol. 2, pp. 24-30, 2005.
- [25] A. J. Escobar Rojas, Evaluación de la protección y liberación del extracto de bugambilia (*Bougainvillea sp.*) encapsulado en perlas de alginato y almidón de maíz, Toluca: Universidad Autónoma del Estado de México, 2016.
- [26] E.-S. Chan, B.-B. Lee, P. Ravindra y D. Poncellet, «Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method,» *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 338, nº 1, pp. 63-72, 2009.
- [27] G. Astray, J. C. Mejuto, R. Rial-Otero, C. González-Barreiro y J. Simal-Gandara , «A review on the use of cyclodextrins in foods,» *Food Hydrocolloids* , vol. 23, nº 7, pp. 1631-1640, 2009.
- [28] C. I. Onwulata, «Microencapsulation and Functional Bioactive Foods,» *Journal of Food Processing and Preservation* , vol. 37, nº 5, pp. 510-532, 2012.
- [29] A. Ramírez, J. L. Benítez, L. Rojas de Astudillo y B. Rojas de Gáscue, «Materiales polimeros de tipo hidrogeles: revisión sobre su caracterización mediante ftir,dsc, meb y met,» *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales* , vol. 36, nº 2, pp. 108-130, 2016.
- [30] K. Shekhar, N. M. Madhu, B. Pradeep y D. A. Banji, «A review on microencapsulation,» *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, vol. 5, nº 2, pp. 58-62, 2010.
- [31] Food and Drug Administration, «Classification of Wound Dressings Combined with Drugs,» 20-21 Septiembre 2016. [En línea]. Available: <https://www.fda.gov/media/100005/download>. [Último acceso: 07 noviembre 2018].
- [32] G. C. Avendaño Romero , A. López Malo y E. Palou , «Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos,» *Temas Selectos de Ingeniería en Alimentos*, vol. 7, nº 1, pp. 87-96, 2013.

- [33] R. Yabur, Y. Bashan y G. Hernández-Carmona, «Alginate from the macroalgae *Sargassum sinicola* as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion,» *Journal of Applied Phycology*, vol. 19, nº 1, pp. 43-53, 2006.
- [34] I. Santacruz, M. Jiménez y M. Moreno, «Nuevas aplicaciones de lo alginatos en el conformado cerámico,» *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y vidrio*, vol. 44, nº 1, pp. 45-52, 2011.
- [35] D. Kühbeck, J. Mayr, M. Häring, M. Hofmann, F. Quignard y D. Díaz-Díaz, «Evaluation of the nitroaldol reaction in the presence of metal ion-crosslinked alginates,» *New Journal of Chemistry*, vol. 39, pp. 2306-2315, 2015.
- [36] D. Mendez, J. Quintero-Cerón, H. Váquiro y J. F. Solanilla-Duque, «Alginato de sodio en el desarrollo de películas comestibles,» *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, vol. 5, nº 2, pp. 89-113, 2014.
- [37] B. Lupo-Pasin, C. González-Azón y A. Maestro-Garriga, «Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones,» *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, vol. 3, nº 1, pp. 130-151, 2012.
- [38] D. A. Basednjak, *Materiales compuestos: Procesos de fabricación de embarcaciones*, Barcelona: Universitat Politècnica de Catalunya, 2005.
- [39] J. Contreras, D. Medina y F. López-Carrasquero, «Síntesis y polimerización de bismacromonómeros de polietilenglicol,» *Avances en Química*, vol. 9, nº 3, pp. 107-114, 2014.
- [40] Sigma-Aldrich, «Merck,» Merck KGaA, 2020. [En línea]. Available: [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/p3015?lang=es&region=MX&gclid=CjwKCAiA4o79BRBvEiwAjteoYHi3wJNLOGeGjEBslaLiZn1T8jn0IYhwFxi-GntmiEHINpRVdeuwhoCDG0QAvD\\_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/p3015?lang=es&region=MX&gclid=CjwKCAiA4o79BRBvEiwAjteoYHi3wJNLOGeGjEBslaLiZn1T8jn0IYhwFxi-GntmiEHINpRVdeuwhoCDG0QAvD_BwE). [Último acceso: 26 octubre 2020].
- [41] X. González Velázquez, *Diseño, síntesis y caracterización fisicoquímica de un hidrogel nanofuncionalizado basado en polietilenglicol*, Toluca: Universidad Autónoma del Estado de México, 2016.
- [42] G. A. Ruiz-Estrada, *Desarrollo de un sistema de liberación de fármacos basado en nanopartículas magnéticas recubiertas con polietilenglicol para el tratamiento de diferentes enfermedades*, Madrid: Universidad Autónoma de Madrid, 2014.



- [43] CARBOWAX, «CARBOWAX,» DOW, 2020. [En línea]. Available: <https://www.dow.com/es-es/pdp.carbowax-polyethylene-glycol-200.85515z.html>. [Último acceso: 01 septiembre 2020].
- [44] Maquimex, «Maquimex,» Maquimex | Especialistas en soluciones químicas, 2020. [En línea]. Available: <https://maquimex.com/blog/peg-un-producto-imprescindible-en-la-industria-farmaceutica>. [Último acceso: 01 septiembre 2020].
- [45] Ministerio de Cultura y Deporte , «Tesauros del Patrimonio Cultural de España,» Gobierno de España, 2020. [En línea]. Available: <http://tesauros.mecd.es/tesauros/materias/1188379.html>. [Último acceso: 23 10 2020].
- [46] S. M. Carpano, M. T. Castro y E. D. Spegazzini, «Caracterización morfoanatómica comparativa entre *Aloe vera* (L.) Burm. F., *Aloe arborescens* Mill., *Aloe saponaria* Haw. y *Aloe ciliaris* Haw (Aloeaceae),» *Revista Brasileña de Farmacología*, vol. 19, nº 1B, pp. 269-275, 2009.
- [47] J. A. Nazeam, H. A. Gag, H. M. El-Hefnawy y A. N. Singab, «Chromatographic separation and detection methods of *Aloe arborescens* Miller constituents: A systematic review,» *Journal of Chromatography B*, vol. 1058, pp. 57-67, 2017.
- [48] A. N. Singab, H. M. El-Hefnawy, A. Esmat, H. A. Gad y J. A. Nazeam, «A Systemic Review on *Aloe arborescens* Pharmacological Profile: Biological Activities and Pilot Clinical Trials,» *Phytotherapy Research*, vol. 29, pp. 1858-1867, 2015.
- [49] M. A. S. Alcántara, Interés Farmacéutico de los mucílagos, Sevilla: Universidad de Sevilla, 2018.
- [50] M. Megías, P. Molist y M. Pombal, «Atlas de histología vegetal y animal,» 2019. [En línea]. Available: [https://mmegias.webs.uvigo.es/1-vegetal/guiada\\_v\\_parenquima.php](https://mmegias.webs.uvigo.es/1-vegetal/guiada_v_parenquima.php). [Último acceso: 2020].
- [51] P. Kiran y S. P. Rao , «Development and characterization of reconstituted hydrogel from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) powder,» *Journal of food measurement & characterization*, vol. 10, nº 3, pp. 411-424, 2016.
- [52] F. Guillén, H. M. Díaz-Mula, P. J. Zapata, D. Valero, M. Serrano, S. Castillo y D. Martínez-Romero, «*Aloe arborescens* and *Aloe vera* gels as coating in delaying postharvest ripening in peach and plum fruit,» *Postharvest Biology and Technology*, vol. 83, pp. 54-57, 2013.

- [53] P. Kiran, N. R. S. Hulle y P. S. Rao, «Viscoelastic behaviour of reconstituted *Aloe vera* hydrogels as a function of concentration and temperature,» *International Journal of Food Properties*, vol. 20, nº 2, pp. 475-490, 2017.
- [54] J. Pardo Zapata, «Universitat de Barcelona,» Mayo 2002. [En línea]. Available: [http://www.ub.edu/centrepatents/pdf/doc\\_dilluns\\_CP/pardo\\_patentesextractosplantas.pdf](http://www.ub.edu/centrepatents/pdf/doc_dilluns_CP/pardo_patentesextractosplantas.pdf). [Último acceso: 13 Diciembre 2019].
- [55] E. Macías-Cortés, J. A. Gallegos-Infante, N. E. Rocha-Guzmán, M. R. Moreno-Jiménez, L. Medina-Torres y R. F. González-Laredo, «Microencapsulation of phenolic compounds: Technologies and novel polymers,» *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, vol. 19, nº 2, pp. 491-521, 2020.
- [56] E. Gimeno-Creus, «Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud,» *OFFARM*, vol. 23, nº 6, pp. 80-84, 2004.
- [57] G. A. Garzón, «Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión,» *Resultados adicionales*, vol. 13, nº 3, pp. 27-36, 2008.
- [58] A. S. López-Prado, Actividad antioxidante del extracto de flor de *Clitoria ternatea* contra la oxidación del colesterol, Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2015.
- [59] M. Aguilera-Ortiz, M. d. C. Reza-Vargas, R. G. Chew-Madinaveitia y J. A. Meza-Velázquez, «Propiedades funcionales de las antocianinas,» *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, vol. XIII, nº 2, pp. 16-22, 2011.
- [60] A. E. Al Snafi, «Pharmacological importance of *Clitoria ternatea* - A review,» *IOSR Journal Of Pharmacy*, vol. 6, nº 3, pp. 68-83, 2016.
- [61] A. Marpaung, N. Andarwulan, P. Hariyadi y D. Faridah, *Spectral Characteristics and Color Stability of Melastomataceae and Clitoria ternatea L. Extracts.*, Bangkok: Innovative ASEAN Food Research towards the World, 2015.
- [62] A. Amaolo, «The Butterfly Pea Flower as a pH Indicator,» *International Scholastic Journal of Science*, vol. 11, nº 1, pp. 1-3, 2017.
- [63] N. A. Ahmad, L. Y. Heng, F. Salam, M. H. Mat Zaid y S. A. Hanifah, «Colorimetric pH Sensor Based on *Clitoria sp* and *Brassica sp* for Monitoring of Food Spoilage Using Chromametry,» *Sensors*, vol. 19, pp. 1-19, 2019.

- [64] J. L. Palomo-Aparicio, Estudio Reológico de Dispersiones de Nanotubos de Carbono en Tosilato de 1-etil-3 metilimidazolio, Cartagena: Universidad Politécnica de Cartagena, 2015.
- [65] Anton Paar, «Anton Paar,» Anton Paar GmbH , 2020. [En línea]. Available: <https://wiki.anton-paar.com/mx-es/barridos-de-amplitud/>. [Último acceso: Julio 2020].
- [66] A. K. Lugo-Espinosa, Caracterización reológica de geles de liberación modificada y su cuantificación en suero, México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2014.
- [67] D. Acevedo, C. Granados y R. Torres, «Caracterización Reológica del Suero Costeño de Turbaco, Arjona, El Carmen de Bolívar y uno Comercial (Colombia),» *Información Tecnológica*, vol. 25, nº 3, pp. 3-10, 2014.
- [68] «Wee solve,» Wee solve GmbH, [En línea]. Available: <http://www.wee-solve.de/en/amplitude-sweep.html>. [Último acceso: 07 2020].
- [69] «Rheology of Coatings - Flow Point Determination,» Pain and Coatings Industry, 2020. [En línea]. Available: <https://www.pcimag.com/articles/103150-rheology-of-coatings>. [Último acceso: octubre 2020].
- [70] A. Simões, M. Miranda, C. Cardoso, F. Veiga y C. Vitorino, «Rheology by Design: A Regulatory Tutorial for Analytical Method Validation,» *Pharmaceutics*, vol. 12, nº 9, pp. 1-26, 2020.
- [71] C. T. Ramachandra y P. Srinivasa Rao, «Processing of *Aloe vera* Leaf Gel: A review,» *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, vol. 3, nº 2, pp. 502-510, 2008.
- [72] J. Moreno Vallespir, Extracción de compuestos antioxidantes del gel de *Aloe vera*. Optimización del proceso mediante la aplicación de la metodología de superficie de respuesta, Islas Baleares: Universitat de les Illes Balears, 2014.
- [73] N. Kamkaen y M. Wilkinson, «The Antioxidant Activity of *Clitoria ternatea* Flower Petal Extracts and Eye Gel,» *Phytotherapy Research*, vol. 23, pp. 1624-1625, 2009.
- [74] R. Mahou, R. P. Meier, L. H. Bühler y C. Wandrey, «Alginate-Poly(ethylene glycol) Hybrid Microspheres for Primary Cell Microencapsulation,» *Materials*, vol. 7, pp. 275-286, 2014.

- [75] A. Blandino, M. Macías y D. Cantero, «Formation of Calcium Alginate Gel Capsules: Influence of Sodium Alginate and CaCl<sub>2</sub> Concentration on Gelation Kinetics,» *Journal of Bioscience of Bioengineering*, vol. 88, nº 6, pp. 686-689, 1999.
- [76] C. S. Solís-Orellana, Comparación de dos materiales encapsulantes por el método de gelificación iónica normal e inversa, Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2016.
- [77] A. Cervantes-Sandoval, M. J. Marques-Dos Santos y G. P. Rivera, Análisis estadístico. Un enfoque práctico con Statgraphics, Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2006.
- [78] C. Batanero-Bernabeu y C. Díaz-Batanero, Análisis de datos con Statgraphics, Granada: Universidad de Granada, 2008.
- [79] Minitab, «Soporte de Minitab 19,» Minitab, 2020.
- [80] Universitat de Barcelona, «Universitat de Barcelona - Contrastes de normalidad,» Universitat de Barcelona, [En línea]. Available: [http://www.ub.edu/aplica\\_infor/spss/cap5-6.htm](http://www.ub.edu/aplica_infor/spss/cap5-6.htm). [Último acceso: 2020].
- [81] Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, «Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales - Universidad Nacional de la Plata,» [En línea]. Available: [https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/4847/mod\\_resource/content/0/TP\\_-\\_Experimentos\\_Simples-Supuestos.pdf](https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/4847/mod_resource/content/0/TP_-_Experimentos_Simples-Supuestos.pdf). [Último acceso: 2020].
- [82] Scientific European Federation of Osteopaths, «Scientific European Federation of Osteopaths - Pruebas no paramétricas,» Enero 2019. [En línea]. Available: <https://www.scientific-european-federation-osteopaths.org/wp-content/uploads/2019/01/ALGUNAS-PRUEBAS-NO-PARAMÉTRICAS.pdf>. [Último acceso: 2020].
- [83] J. Amat-Rodrigo, «Test Kruskal-Wallis - Ciencia de datos,» Ciencia de datos, Enero 2016. [En línea]. Available: [https://www.cienciadedatos.net/documentos/20\\_kruskal-wallis\\_test](https://www.cienciadedatos.net/documentos/20_kruskal-wallis_test). [Último acceso: 2020].
- [84] N. Jyothi, P. M. Prasanna, S. N. Sakarkar, K. S. Prabha, P. S. Ramaiah y G. Y. Srawan, «Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency,» *Journal of Microencapsulation*, vol. 27, nº 3, pp. 187-197, 2010.

## Apéndice 1 – Análisis estadístico %EE

### ANOVA Multifactorial

Se formularon las siguientes hipótesis nula ( $H_0$ ) y alternativa ( $H_1$ ):

$$H_0: \mu_{0\%} = \mu_{0.2\%} = \mu_{0.4\%} = \mu_{0.6\%}$$

$H_1$ : al menos una de las medias de los cuatro tratamientos es diferente

El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA Multifactorial en donde:

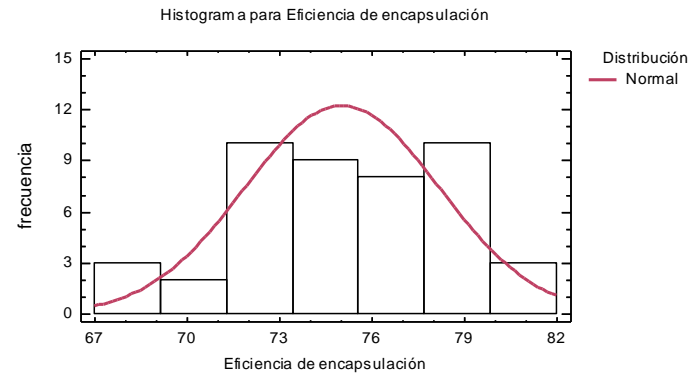
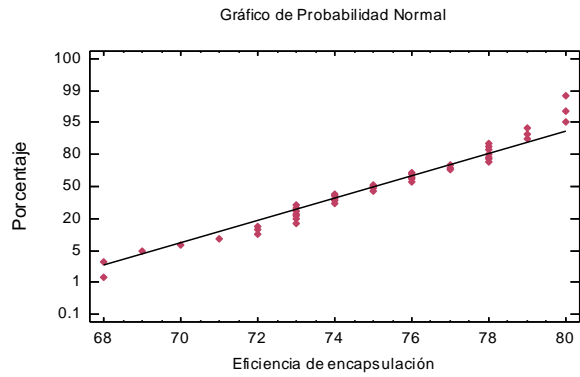
Factor principal:	Biomasa adicionada de <i>Aloe arborescens</i>
Covariables:	Alginato (ALG) y Polietilenglicol (PEG)

Una vez realizado el análisis, se obtuvo el siguiente resumen estadístico:

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
COVARIABLES					
ALG	137.613	1	137.613	40.33	0.0000
PEG	80.1335	1	80.1335	23.48	0.0000
EFFECTOS PRINCIPALES					
<b>A: Aloe</b>	92.7319	3	30.9106	9.06	<b>0.0001</b>
RESIDUOS	133.085	39	3.41242		
TOTAL (CORREGIDO)	437.911	44			

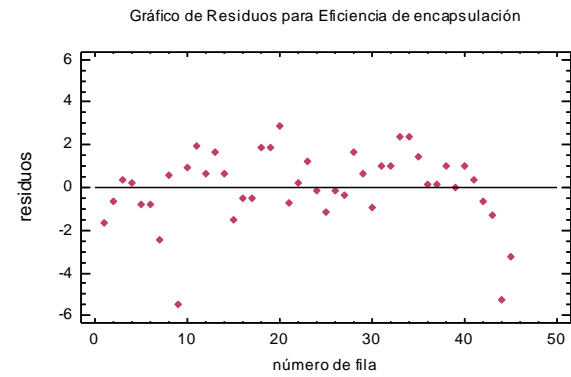
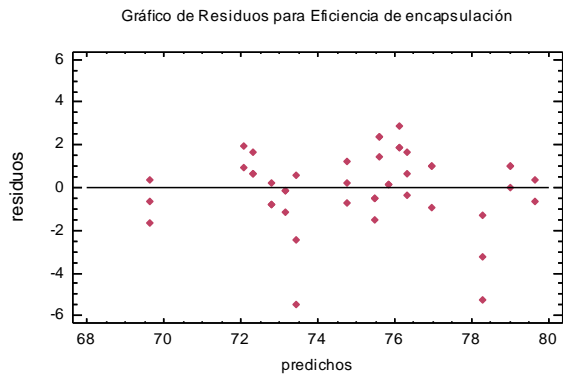
Para validar la interpretación del análisis, se realizó la comprobación de los tres supuestos:

**Normalidad:** Cumple: los datos en el gráfico de Probabilidad normal muestran una tendencia lineal, además, valor obtenido en la Prueba de Shapiro-Wilk arrojó un **valor-p = 0.073**, y sugiere que los datos provienen de una distribución normal, así como se observa en el histograma.



**Varianza constante:** Cumple: ya que no existe un patrón de agrupación marcado.

**Independencia:** Cumple, los datos no presentan un patrón de agrupación.



Ya que sí se comprobaron los tres supuestos, se procedió a realizar la Prueba de Múltiples Rangos con el Método LSD para determinar cuáles medias de las formulaciones son significativamente diferentes de otras para la eficiencia de encapsulación, y se obtuvo la siguiente tabla:

<i>Aloe</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
0	11	72.6675	0.557671	X
0.6	11	75.1037	0.558863	X
0.2	12	75.8478	0.533338	X
0.4	11	76.4857	0.557671	X

La parte superior de la tabla muestra dos grupos homogéneos según la alineación de las X's en las columnas, esto quiere decir que no hay diferencia estadísticamente significativa entre aquellas formulaciones que compartan una misma columna de X's.

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
0 - 0.2	*	-3.18022	1.56148
0 - 0.4	*	-3.81818	1.59324
0 - 0.6	*	-2.4362	1.60021
0.2 - 0.4		-0.637959	1.56148
0.2 - 0.6		0.744019	1.56148
0.4 - 0.6		1.38198	1.60021

La parte inferior de la tabla muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias y con un asterisco (\*) indica las que presentan una diferencia significativa.

Medias y 95.0% de Fisher LSD

También se obtuvo la Gráfica de medias (Método LSD  $\alpha=0.05$ ).

## Apéndice 2 – Análisis estadístico %Rm

### ANOVA Multifactorial

Se formularon las siguientes hipótesis nula ( $H_0$ ) y alternativa ( $H_1$ ):

$$H_0: \mu_{0\%} = \mu_{0.2\%} = \mu_{0.4\%} = \mu_{0.6\%}$$

$H_1$ : al menos una de las medias de los cuatro tratamientos es diferente

El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA Multifactorial en donde:

Factor principal:	Biomasa adicionada de <i>Aloe arborescens</i>
Covariables:	Alginato (ALG) y Polietilenglicol (PEG)

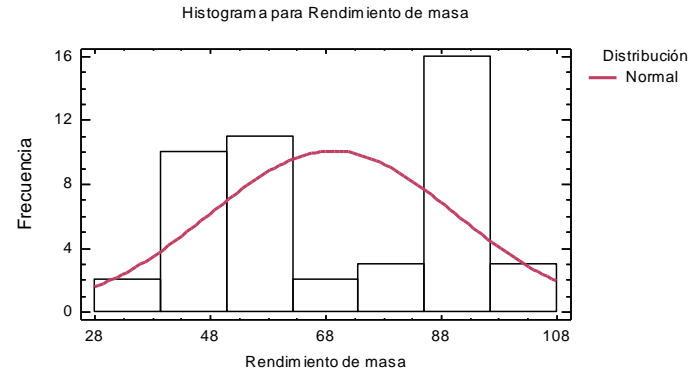
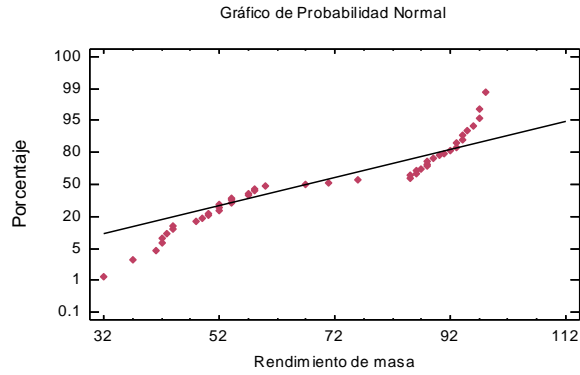
Una vez realizado el análisis, se obtuvo el siguiente resumen estadístico:

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
COVARIABLES					
ALG	18445.9	1	18445.9	339.67	0.0000
PEG	8.0622	1	8.0622	0.15	0.7020
EFECTOS PRINCIPALES					
<b>A: Aloe</b>	200.941	3	66.9804	1.23	<b>0.3099</b>
RESIDUOS	2226.49	41	54.3047		
TOTAL (CORREGIDO)	20897.4	46			

Para validar la interpretación del análisis, se realizó la comprobación de los tres supuestos:

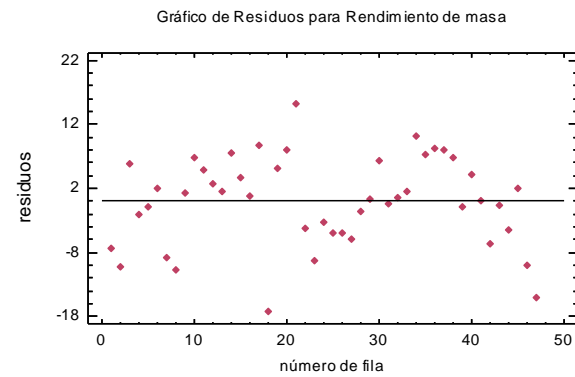
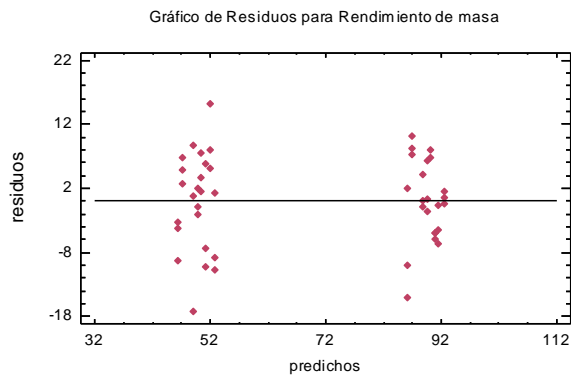


**Normalidad:** No cumple: los datos en el gráfico de Probabilidad normal no muestran una tendencia lineal y; el valor obtenido en la Prueba de Shapiro-Wilk arrojó un **valor-p = 0.000014**, por lo que se rechaza la idea de que los datos provengan de una distribución normal (histograma).



**Varianza constante:** Cumple: no existe un patrón de agrupación marcado.

**Independencia:** Cumple, los datos no presentan un patrón de agrupación.



Dado que no se pudo comprobar los tres supuestos, se realizó la transformación logarítmica de la variable de respuesta (%Rm), resultando en lo siguiente:

### **ANOVA Multifactorial – Transformación logarítmica**

Se formularon las siguientes hipótesis nula ( $H_0$ ) y alternativa ( $H_1$ ):

$$H_0: \mu_{0\%} = \mu_{0.2\%} = \mu_{0.4\%} = \mu_{0.6\%}$$

$H_1$ : al menos una de las medias de los cuatro tratamientos es diferente

Se procedió a realizar el ANOVA Multifactorial utilizando la transformación logarítmica de la variable de respuesta, en donde:

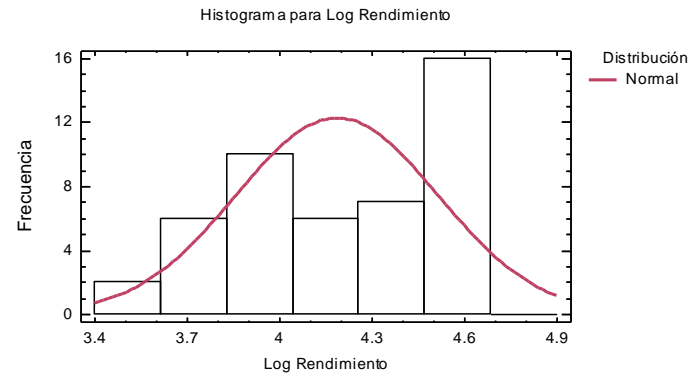
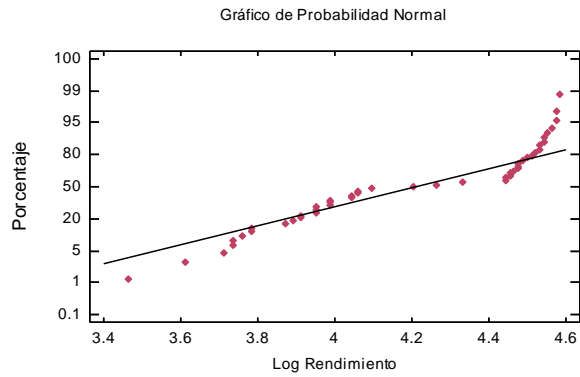
Factor principal:	Biomasa adicionada de <i>Aloe arborescens</i>
Covariables:	Alginato (ALG) y Polietilenglicol (PEG)

Una vez realizado el análisis, se obtuvo el siguiente resumen estadístico:

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-p</i>
<b>COVARIABLES</b>					
ALG	4.16599	1	4.16599	235.17	0.0000
PEG	0.00112346	1	0.00112346	0.06	0.8024
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
<b>A: Aloe</b>	0.0624484	3	0.0208161	1.18	<b>0.3310</b>
RESIDUOS	0.726304	41	0.0177147		
TOTAL (CORREGIDO)	4.95596	46			

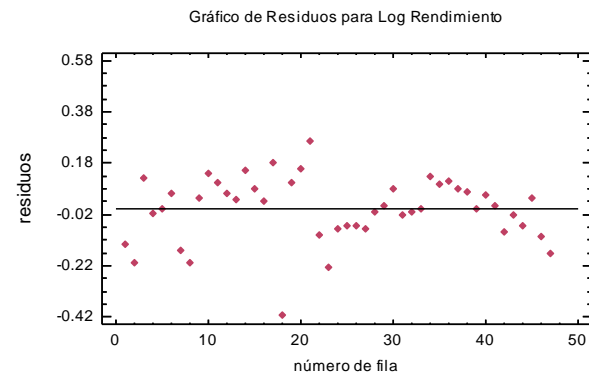
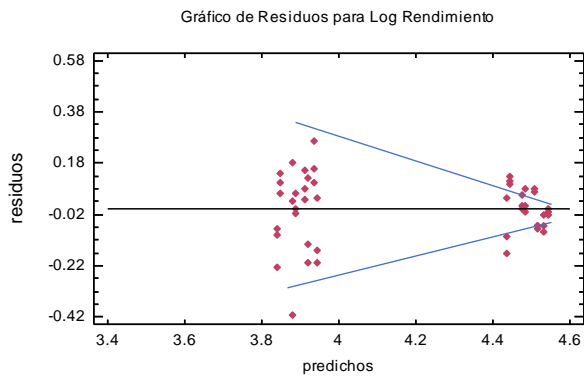
Para validar la interpretación del análisis, se realizó la comprobación de los tres supuestos:

**Normalidad:** No cumple: los datos en el gráfico de Probabilidad normal no muestran una tendencia lineal y; el valor obtenido en la Prueba de Shapiro-Wilk arrojó un **valor-p = 0.000051**, por lo que se rechaza la idea de que los datos provengan de una distribución normal (histograma).



**Varianza constante:** No cumple, comienzan a aumentar la densidad de agrupación de lado derecho y a dispersarse de lado izquierdo

**Independencia:** Cumple, los datos no presentan un patrón de agrupación.



La transformación logarítmica no logró ajustar los datos a una distribución normal y afectó la distribución de varianzas en la prueba de homocedasticidad, por lo que no se cumplieron los tres supuestos y se procedió a realizar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

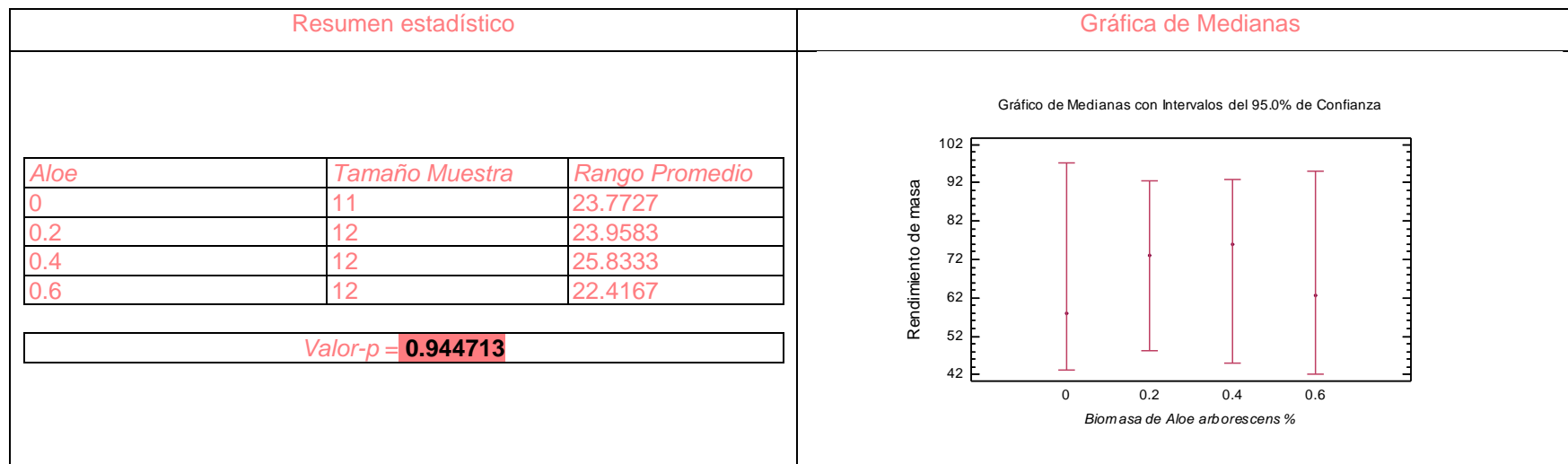
### Prueba no paramétrica – Prueba de Kruskal-Wallis

Se formularon las siguientes hipótesis nula ( $H_0$ ) y alternativa ( $H_1$ ):

$H_0$ : todas las muestras provienen de la misma población (distribución)

$H_1$ : al menos una de las muestras proviene de una población con una distribución distinta.

Una vez realizado el análisis, se obtuvo lo siguiente:



## Apéndice 3 – Análisis estadístico %CL

### ANOVA Multifactorial

Se formularon las siguientes hipótesis nula ( $H_0$ ) y alternativa ( $H_1$ ):

$$H_0: \mu_{0\%} = \mu_{0.2\%} = \mu_{0.4\%} = \mu_{0.6\%}$$

$H_1$ : al menos una de las medias de los cuatro tratamientos es diferente

El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA Multifactorial en donde:

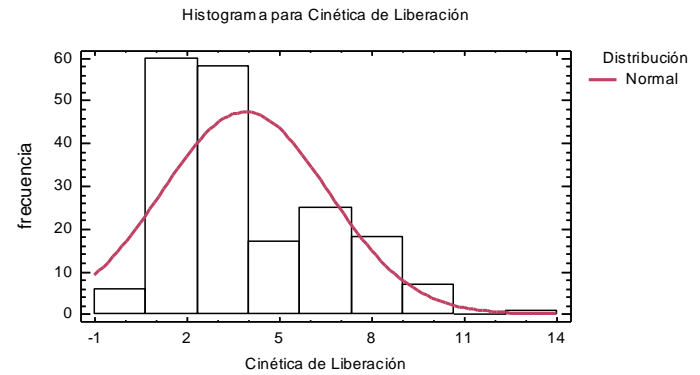
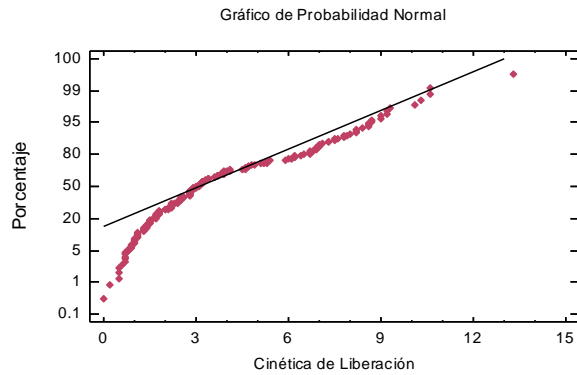
Factor principal:	Biomasa adicionada de <i>Aloe arborescens</i>
Covariables:	Alginato (ALG), Polietilenglicol (PEG), tiempo y temperatura

Una vez realizado el análisis, se obtuvo el siguiente resumen estadístico:

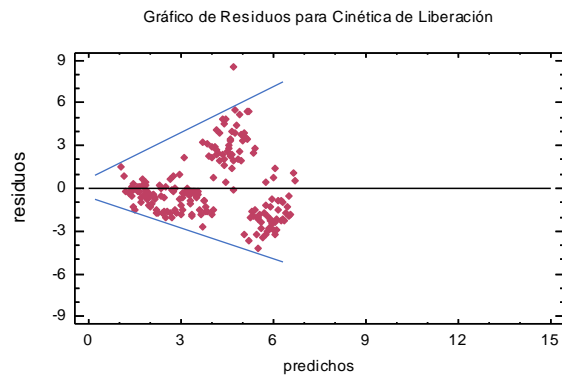
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
<b>COVARIABLES</b>					
ALG	14.9076	1	14.9076	2.95	0.0874
PEG	9.1438	1	9.1438	1.81	0.1800
Tiempo	431.883	1	431.883	85.55	0.0000
Temperatura	3.61565	1	3.61565	0.72	0.3985
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
<b>A: Aloe</b>	3.24307	3	1.08102	0.21	<b>0.8865</b>
RESIDUOS	928.875	184	5.04823		
TOTAL (CORREGIDO)	1391.67	191			

Para validar la interpretación del análisis, se realizó la comprobación de los tres supuestos:

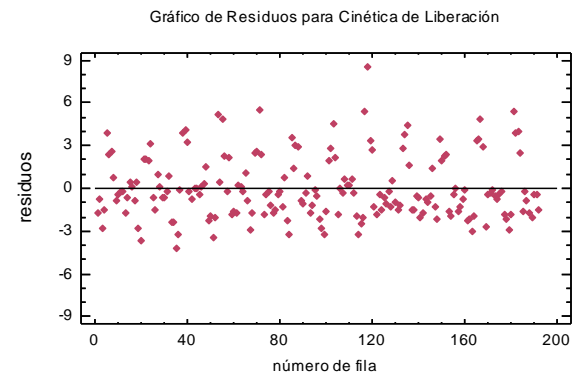
**Normalidad:** No cumple: los datos en el gráfico de Probabilidad normal no muestran una tendencia lineal y; el valor obtenido en la Prueba de Kolmogorov-Smirnov arrojó un **valor-p = 0.00016**, por ello, se rechaza la idea de que los datos provengan de una distribución normal (histograma).



**Varianza constante:** No cumple: se presenta un patrón de agrupación en forma de embudo (líneas azules)



**Independencia:** Cumple, los datos no presentan un patrón de agrupación.



Como no se comprobaron los tres supuestos, se realizó la transformación logarítmica de la variable de respuesta (%CL):

### **ANOVA Multifactorial – Transformación logarítmica**

Se formularon las siguientes hipótesis nula ( $H_0$ ) y alternativa ( $H_1$ ):

$$H_0: \mu_{0\%} = \mu_{0.2\%} = \mu_{0.4\%} = \mu_{0.6\%}$$

$H_1$ : al menos una de las medias de los cuatro tratamientos es diferente

Se procedió a realizar el ANOVA Multifactorial utilizando la transformación logarítmica de la variable de respuesta, en donde:

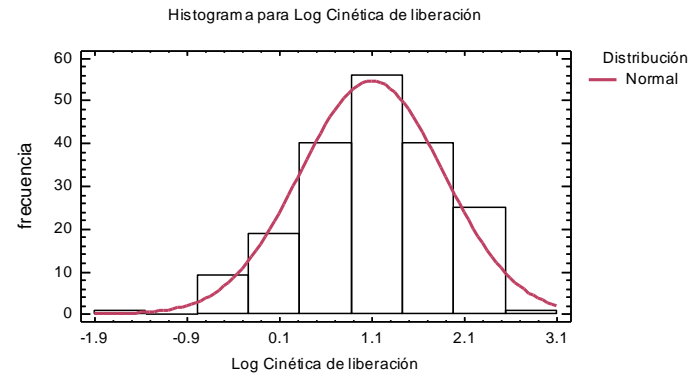
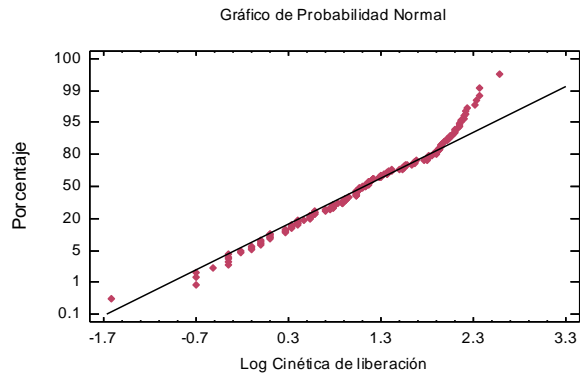
Factor principal:	Biomasa adicionada de <i>Aloe arborescens</i>
Covariables:	Alginato (ALG), Polietilenglicol (PEG), tiempo y temperatura

Una vez realizado el análisis, se obtuvo el siguiente resumen estadístico:

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-p</i>
<b>COVARIABLES</b>					
ALG	0.286988	1	0.286988	0.84	0.3600
PEG	0.59826	1	0.59826	1.76	0.1868
Tiempo	50.9398	1	50.9398	149.47	0.0000
Temperatura	0.00270432	1	0.00270432	0.01	0.9291
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
<b>A: Aloe</b>	0.328569	3	0.109523	0.32	<b>0.8099</b>
RESIDUOS	62.3667	183	0.340802		
TOTAL (CORREGIDO)	114.3	190			

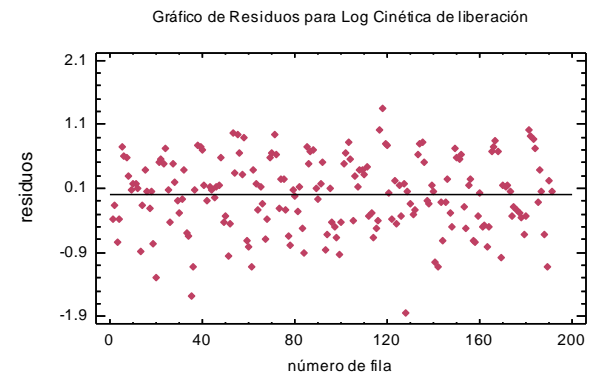
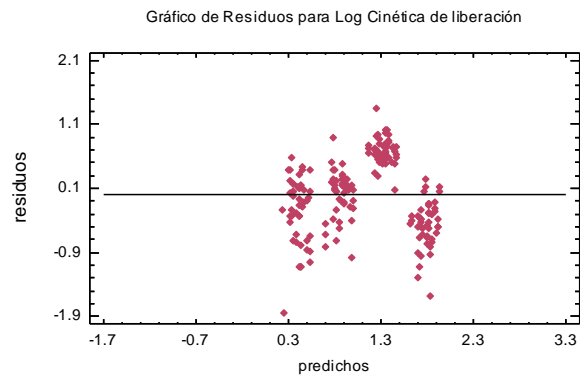
Para validar la interpretación del análisis, se realizó la comprobación de los tres supuestos:

**Normalidad:** cumple, datos en el gráfico de Probabilidad normal muestran una tendencia lineal y; el valor obtenido en la Prueba de Kolmogorov-Smirnov arrojó un **valor-p = 0.2299**, y sugiere que los datos provienen de una distribución normal, así como se observa en el histograma



**Varianza constante:** Cumple, en comparación del anterior, la dispersión se muestra más uniforme y no en forma de embudo.

**Independencia:** Cumple, los datos no presentan un patrón de agrupación.





La transformación logarítmica de los datos fue favorable ya que se comprobaron los tres supuestos, por tanto, se procedió a realizar la Prueba de Múltiples Rangos con el Método LSD para determinar cuáles medias de las formulaciones son significativamente diferentes de otras para la eficiencia de encapsulación, y se obtuvo la siguiente tabla:

<i>Aloe</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
0.6	47	1.03377	0.0851659	X
0.2	48	1.10301	0.0842631	X
0.4	48	1.12819	0.0842631	X
0	48	1.14203	0.0842631	X

La parte superior de la tabla muestra dos grupos homogéneos según la alineación de las X's en las columnas, esto quiere decir que no hay diferencia estadísticamente significativa entre aquellas formulaciones que compartan una misma columna de X's.

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
0 - 0.2		0.0390185	0.235113
0 - 0.4		0.0138327	0.235113
0 - 0.6		0.108256	0.236391
0.2 - 0.4		-0.0251858	0.235113
0.2 - 0.6		0.069238	0.236391
0.4 - 0.6		0.0944238	0.236391

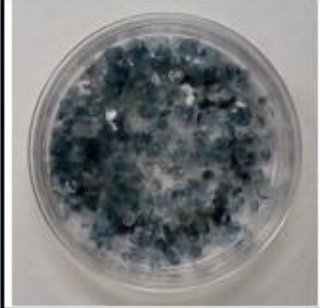
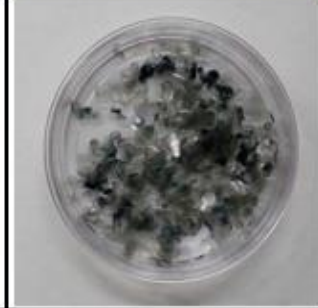
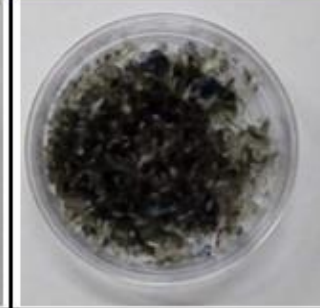
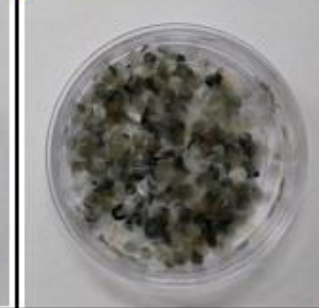
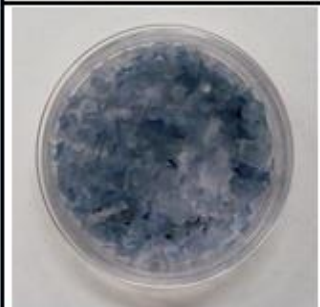

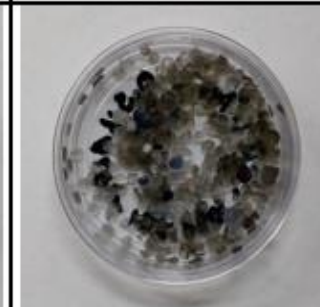
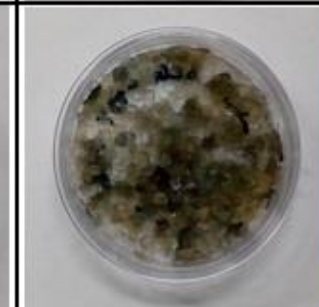


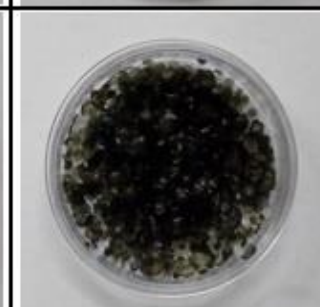



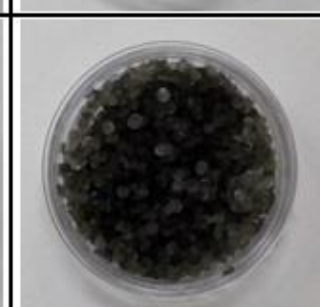

La parte inferior de la tabla muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias y con un asterisco (\*) indica las que presentan una diferencia significativa. Como no hay asteriscos, esto sugiere que no hay diferencias estadísticamente significativas entre cada par de medias.

Medias y 95.0% de Fisher LSD

También se obtuvo la Gráfica de medias (Método LSD  $\alpha=0.05$ ).

## Apéndice 4 – Tabla de perlas deshidratadas

	<i>Aloe 0%</i>	<i>Aloe 0.2%</i>	<i>Aloe 0.4 %</i>	<i>Aloe 0.6 %</i>	
ALG 0.5 %					PEG 1.5%
					PEG 10 %
ALG 1 %					PEG 1.5 %
					PEG 10 %

**NOTA:** Los datos obtenidos de las perlas deshidratadas no serán presentados ni discutidos en este trabajo.

## Apéndice 5 – Análisis estadístico G'=G''

### ANOVA Multifactorial

Se formularon las siguientes hipótesis nula ( $H_0$ ) y alternativa ( $H_1$ ):

$$H_0: \mu_{0\%} = \mu_{0.2\%} = \mu_{0.4\%} = \mu_{0.6\%}$$

$H_1$ : al menos una de las medias de los cuatro tratamientos es diferente

El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA Multifactorial en donde:

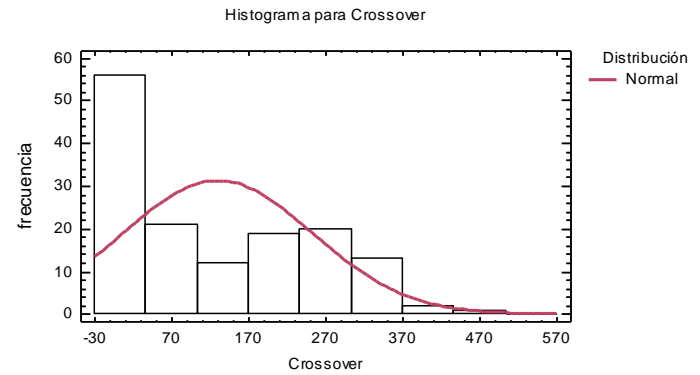
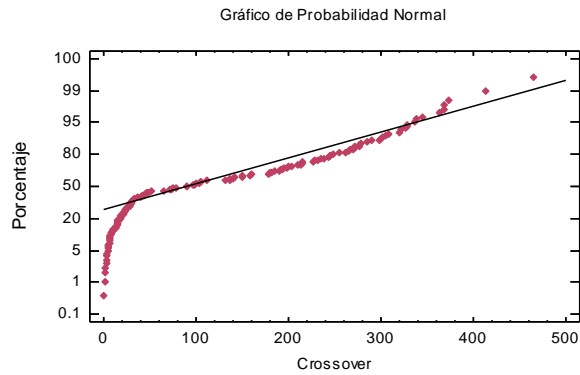
Factor principal:	Biomasa adicionada de <i>Aloe arborescens</i>
Covariables:	Alginato (ALG), Polietilenglicol (PEG) y temperatura

Una vez realizado el análisis, se obtuvo el siguiente resumen estadístico:

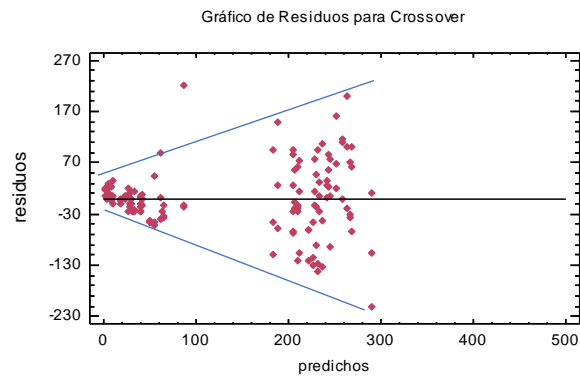
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
COVARIABLES					
ALG	1.47586E6	1	1.47586E6	350.06	0.0000
PEG	16872.5	1	16872.5	4.00	0.0474
Temperatura	39072.9	1	39072.9	9.27	0.0028
EFFECTOS PRINCIPALES					
<b>A: Aloe</b>	39885.5	3	13295.2	3.15	<b>0.0270</b>
RESIDUOS	577591.	137	4215.99		
TOTAL (CORREGIDO)	2.14929E6	143			

Para validar la interpretación del análisis, se realizó la comprobación de los tres supuestos:

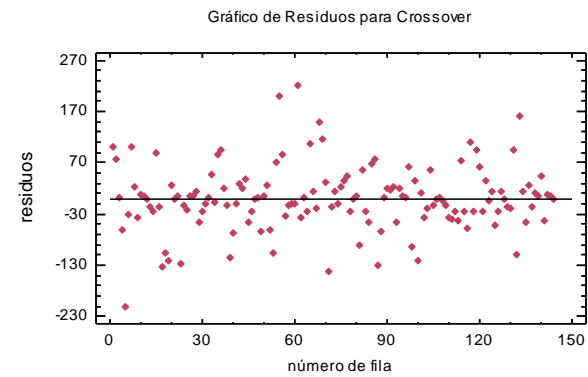
**Normalidad:** No cumple: los datos en el gráfico de Probabilidad normal no muestran una tendencia lineal y; el valor obtenido en la Prueba de Kolmogorov-Smirnov fue de **valor-p = 0.000025**, por ello, se rechaza la idea de que los datos provengan de una distribución normal (histograma)



**Varianza constante:** No cumple: se presenta un patrón de agrupación en forma de embudo (líneas azules)



**Independencia:** Cumple, los datos no presentan un patrón de agrupación.



Dado que no se pudo comprobar los tres supuestos, se realizó la transformación logarítmica de la variable de respuesta ( $G'=G''$ ), resultando en lo siguiente:

### **ANOVA Multifactorial – Transformación logarítmica**

Se formularon las siguientes hipótesis nula ( $H_0$ ) y alternativa ( $H_1$ ):

$$H_0: \mu_{0\%} = \mu_{0.2\%} = \mu_{0.4\%} = \mu_{0.6\%}$$

$H_1$ : al menos una de las medias de los cuatro tratamientos es diferente

Se procedió a realizar el ANOVA Multifactorial utilizando la transformación logarítmica de la variable de respuesta, en donde:

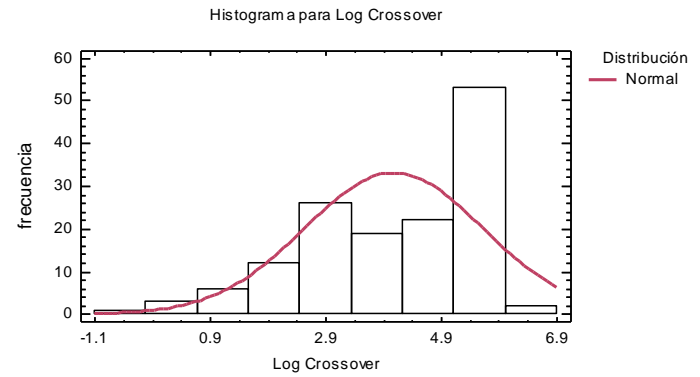
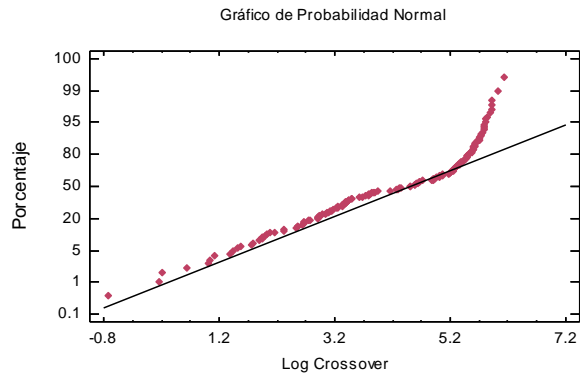
Factor principal:	Biomasa adicionada de <i>Aloe arborescens</i>
Covariables:	Alginato (ALG) y Polietilenglicol (PEG) y temperatura

Una vez realizado el análisis, se obtuvo el siguiente resumen estadístico:

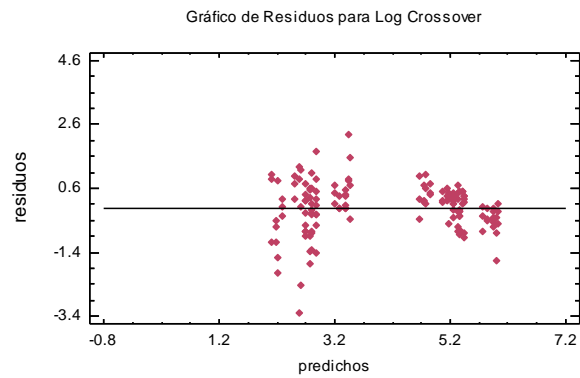
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
COVARIABLES					
ALG	235.336	1	235.336	382.52	0.0000
PEG	0.186295	1	0.186295	0.30	0.5830
Temperatura	13.1833	1	13.1833	21.43	0.0000
EFFECTOS PRINCIPALES					
<b>A: Aloe</b>	8.23755	3	2.74585	4.46	<b>0.0050</b>
RESIDUOS	84.2849	137	0.615218		
TOTAL (CORREGIDO)	341.228	143			

Para validar la interpretación del análisis, se realizó la comprobación de los tres supuestos:

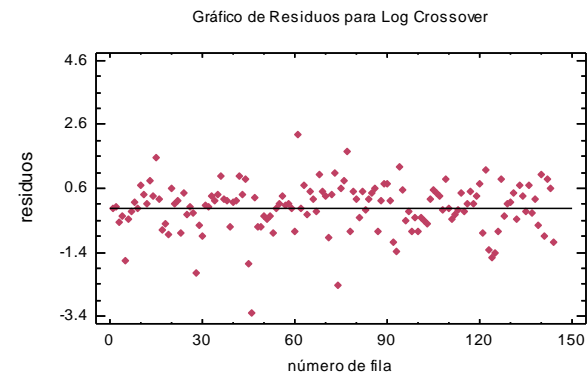
**Normalidad:** No cumple: los datos en el gráfico de Probabilidad normal no muestran una tendencia lineal y; el valor obtenido en la Prueba de Kolmogorov-Smirnov fue de **valor-p = 0.00493**, por lo que se rechaza la idea de que los datos provengan de una distribución normal (histograma).



**Varianza constante:** Cumple, no hay un patrón de distribución marcado.



**Independencia:** Cumple, los datos no presentan un patrón de agrupación.



A pesar de que no se cumplieron los tres supuestos para validar el análisis del ANOVA Multifactorial, se realizó la Prueba de Múltiples Rangos con el Método LSD, ya que, no se pudo realizar la prueba de Kruskal-Wallis, puesto que uno de los requisitos para es la varianza constante y esta solo se cumple con la transformación logarítmica de la variable de respuesta ( $G'=G''$ ).

<i>Aloe</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
0.6	36	3.68942	0.130726	X
0.2	36	4.09229	0.130726	X
0	36	4.27089	0.130726	X
0.4	36	4.27929	0.130726	X

La parte superior de la tabla muestra dos grupos homogéneos según la alineación de las X's en las columnas, esto quiere decir que no hay diferencia estadísticamente significativa entre aquellas formulaciones que compartan una misma columna de X's.

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Limites</i>
0 - 0.2		0.178602	0.365578
0 - 0.4		-0.00840121	0.365578
0 - 0.6	*	0.581465	0.365578
0.2 - 0.4		-0.187003	0.365578
0.2 - 0.6	*	0.402864	0.365578
0.4 - 0.6	*	0.589867	0.365578

La parte inferior de la tabla muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias y con un asterisco (\*) indica las que presentan una diferencia significativa.

Medias y 95.0% de Fisher LSD

También se obtuvo la Gráfica de medias (Método LSD  $\alpha=0.05$ ).