

MATERIAL BIOACTIVO CON UN EXTRACTO DE *Aloe vera* COMO MATERIAL DE RECUBRIMIENTO O ENCAPSULACIÓN Y SU MÉTODO DE OBTENCIÓN

Resumen

5

En la presente invención se enseña una aplicación novedosa del extracto de *Aloe vera*, específicamente del extracto relacionado a sus cristales o parénquima mucilaginoso de dicha planta, para encapsular compuestos activos bajo cualquier tecnología de encapsulación, así como los productos estables y activos derivados
10 de dicha encapsulación y el proceso de obtención de los mismos.

Sector Tecnológico

La presente invención se ubica dentro de las aplicaciones farmacéuticas, de la
15 industria alimentaria y/o agrícola, y en general en cualquier tipo de industria que requiera de materiales y técnicas de recubrimiento, en especial en donde dichas técnicas y materiales de recubrimiento permitan mantener la estabilidad, las características fisicoquímicas de los materiales a ser recubiertos o una actividad biológica o química específica, como lo es, por ejemplo y en especial, en el área
20 de desarrollo de alimentos funcionales.

Técnicas Anteriores

Actualmente, hay un interés creciente en el uso de gel de *Aloe vera* en la industria alimentaria, que se utiliza como fuente de alimentos funcionales, en alimentos,
5 bebidas y helados (Moore y MacAnalley, 1995).

Es así como, por ejemplo, se han utilizado geles de *Aloe vera* como material de recubrimiento comestible para la estabilización de los parámetros físico-químicos relacionados con la calidad de la fruta (cereza dulce) durante el almacenamiento
10 en frío y la prolongación de la vida útil, así como su papel en el control de deterioro microbiano. Por lo que sabe, evidenciándose como una alternativa a la utilización de fungicidas poscosecha sintéticos (Martínez-Romero et al., 2006. Postharvest sweet cherry quality and safety maintenance by *Aloe vera* treatment: A new edible coating. Postharvest Biology and Technology.39(1): 93–100.)

15

También se han revelado con anterioridad métodos de extracción para el gel de *Aloe vera*:

Se puede producir un jugo a partir de las hojas de una planta de *Aloe*; ajustando
20 el pH del jugo de 3 a 3,5; precipitando sustancias activas mediante la adición de un solvente (US 4851224). Para asegurar que una solución de *Aloe vera* purificada sea estéril, se somete a un tratamiento térmico a 363.15 K dos veces, durante 5 minutos, se realiza doble filtración y se selecciona un agente antiséptico (JP2002068997), también se pulveriza el jugo de *Aloe vera* y se hace pasar el

material obtenido a través de capas delgadas de carbono activo y tierra de diatomeas y un filtro de eliminación microbiana en una cámara libre de gérmenes (JP2002205955).

- 5 La extracción de los compuestos del gel de Aloe vera también se puede realizar secando el parénquima por liofilización o por secado con aire caliente, extracción de compuestos del Aloe vera a partir del resultante Aloe vera en polvo, por un método de extracción de fluido supercrítico usando como disolvente el dióxido de carbono y en un tiempo de extracción de 50 a 70 minutos (EP 2206509).

10

También se revelan algunos usos del gel de Aloe vera, como por ejemplo, cuando se produce un agente profiláctico y un extracto para disminuir la obesidad (JP2000319190). Por otra metodología también se pueden extraer derivados de la Aloesina con aminoácidos naturales, péptidos, aminoácidos y azúcares. Los

- 15 compuestos de la invención US 8314070 poseen propiedades osmoprotectoras, adecuadas para la aplicación tópica u oral para el tratamiento de enfermedades de la piel.

Por otra parte, algunos documentos académicos enseñan algunas de las

- 20 tecnologías de encapsulación más comunes y los materiales de encapsulación utilizados para mantener la viabilidad de las bacterias probióticas en condiciones externas adversas. Entre estas tecnologías se discuten tecnologías de fluidos supercríticos para encapsulación así como nuevos materiales y finalmente se concluye que varias variables afectan la viabilidad de las células probióticas

encapsuladas y, por lo tanto, se necesitan herramientas de optimización que incluyan respuesta, algoritmos genéticos, programación secuencial cuadrática para la selección apropiada del material (Serna-Cock *et al.* 2013. Probiotic encapsulation. African Journal of Microbiology Research Vol. 7(40), pp. 4743-4753).

Sin embargo, en el estado de la tecnología no se reporta actualmente la aplicación o empleo del Aloe vera en la encapsulación de compuestos bioactivos, es decir el Aloe vera no se ha empleado como sustancia o materia prima funcional para encapsulación o recubrimiento de compuestos bioactivos, según la definición anteriormente expuesta, buscando extender la viabilidad y la actividad de dichos compuestos.

Así mismo, tampoco se encuentran en el estado de la técnica documentos que revelen con anterioridad los conocimientos necesarios para emplear el extracto de *Aloe vera* como material de pared o material de encapsulación o de cobertura, para mantener la supervivencia de células u otros compuestos bioactivos, ni se habían implementado de forma práctica todas las características fisicoquímicas ni se habían establecido las condiciones para su uso como encapsulante.

Breve Descripción de la Invención

Los compuestos bioactivos, son compuestos que cumplen funciones en el cuerpo que pueden promover la buena salud (NCI). Vos *et al.* (2010. Encapsulation for

preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. International Dairy Journal. 20: 292–302.), clasifican a los compuestos bioactivos en dos grupos: en moléculas bioactivas como lípidos, vitaminas, péptidos, ácidos grasos, antioxidantes, minerales, y en células vivas bioactivas como los probióticos. Estos últimos de interés en la industria farmacéutica y alimentaria. Los probióticos son microorganismos que suministrados en cantidades adecuadas pueden generar beneficio a la salud del hospedero (Araya, 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. <http://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>). Los probióticos más conocidos son las bacterias ácido lácticas que se utilizan en gran medida en la industria alimentaria debido a las propiedades funcionales. Sin embargo, para que pueda desarrollarse el efecto probiótico, las bacterias probióticas deben permanecer vivas desde que se consumen hasta que se instalan en el intestino, lo cual se dificulta debido a que en el paso de las bacterias por el tracto gastrointestinal, las células se ven expuestas a un bajo pH y altas concentraciones de sales biliares en el intestino y mueren (Cook et al., 2012. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society, 162(1), 56–67. doi:10.1016/j.jconrel.2012.06.003).

20

Por lo tanto, el empleo de materiales de pared, (llamados también materiales de encapsulación, o materiales de cobertura), basados en polisacáridos y en proteínas, mejoran la supervivencia de las células (Hubálek, 2003. Protectants Used in the Cryopreservation of Microorganisms, Cryobiology, 46, 205-229). Los

materiales de pared no solo deben servir de protección para los probióticos, sino que también deben ser seguros para el consumo, es decir que sean GRAS (Generally Recognized As Safe); y económicos, ya que un costo elevado de los materiales de encapsulación influye directamente en el producto final.

5

Todos los métodos de encapsulación conocidos son susceptibles de ser usados con el material de recubrimiento enseñado aquí, no obstante los métodos de encapsulación aplicados en la presente invención son de tipo físico (liofilización) y físico – químico (extrusión). La extrusión es una técnica para encapsular
10 compuestos bioactivos empleando hidrocoloides (alginato y carragenina) como materiales de encapsulación (Burgain et al., 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. J Food Eng. 104(4): 467-483). Esta técnica implica la preparación de una solución de hidrocoloide, el compuesto bioactivo se añade a la misma, y la extrusión de la suspensión de
15 células se realiza a través de una boquilla que forma gotitas en caída libre a una solución de baño de endurecimiento (Krasaekoopt et al., 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. International Dairy Journal, 13(1), 3–13. doi:10.1016/S0958-6946(02)00155-3). En cuanto a la liofilización, es una técnica en donde el compuesto se recubre con el material de cobertura y
20 luego se congela a baja temperatura, generalmente entre 243.15 K y 253.15 K, seguido de la sublimación del agua a vacío, a una presión entre 5000 a 10000 Pa.

Con la aplicación aquí propuesta y utilizando las tecnologías de encapsulación enunciadas es posible proteger la estructura de los compuestos bioactivos y su

actividad. Esto hace que se facilite la formulación de productos alimenticios, haciéndolos más saludables y palatables, además, se aumenta la estabilidad en el procesamiento y en el producto final (Kailasapathy, 2006. Highly recommended books on Probiotics and Foodborne Pathogens Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Curr. Issues Intest. Microbiol. 3: 39-48), lo que redundará en el aumento en la demanda de los encapsulados.

Para lo aquí descrito, se entiende por gel de Aloe vera la sustancia obtenida del procesamiento de los cristales extraídos del parénquima de las hojas de la planta *Aloe vera*.

Descripción Detallada de la Invención

Para la encapsulación de compuestos bioactivos se empleó gel de *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller). Su eficacia para encapsular se probó con dos de las
5 tecnologías de encapsulación más utilizadas: la liofilización y la tecnología de extrusión. Sin embargo, la aplicación de estos dos métodos no es excluyente, ni tampoco limitante, y con los debidos ajustes de proceso ha de funcionar con los demás métodos de encapsulación como pueden ser el secado en *spray*, el recubrimiento en lecho fluidizado, la gelación iónica, o alguna otra de las técnicas
10 de encapsulación por método físico o físico químico.

Como paso previo a la encapsulación es necesario preparar o extraer el gel de Aloe vera. Aunque se mencionaron varias patentes y solicitudes de patente que reivindicán la extracción de compuestos de aloe vera, el método aquí aplicado es
15 muy sencillo y no mencionado en publicación conocida.

Las variables de respuesta de la invención son la viabilidad del compuesto bioactivo y la actividad antimicrobiana del metabolito. Estos efectos se le atribuyen a: (1) la capacidad de este género de bacterias de producir ácidos
20 orgánicos como ácido láctico y acético (Stiles, 1996), Stiles, M.E., 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 70, 331–345); (2) a la capacidad de producir compuestos de bajo peso molecular (Niku-Paavola

et al., 1999), Niku-Paavola, M.L., Laitila, A., Mattila-Sandholm, T., Haikara, A., 1999. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology* 86, 29–35); (3) a la capacidad de producir péptidos (Okkers et al., 1999) Okkers, D.J., Dicks, L.M.T., Silvester, M., Joubert, J.J.,
5 Odendaal, H.J., 1999. Characterisation of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *Journal of Applied Microbiology* 87, 726–734); y (4) a la capacidad de producir proteínas llamadas bacteriocinas (Magnusson and Schnurer, 2001). Magnusson, J., Schnurer, J., 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis*
10 strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1–5). Respecto al aspecto (4) fue el atributo que se verificó durante el desarrollo de la presente invención, en otras palabras, uno de los metabolitos es la bacteriocina (proteína) producida por la bacteria, la cual también posee actividad antimicrobiana y antifúngica.

15

El procedimiento es el que a continuación se describe:

Obtención de gel de *aloe vera*

- i. Se extrae el acíbar (líquido de color amarillo) cortando en la base de la hoja y dejando drenar durante 1 h (Miranda *et al.*, 2010. Effect of temperature on structural properties of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) gel and Weibull distribution for modeling drying process. *Food Bioprod Process.* 88(2–3):138–144).
- ii. Posteriormente, se separan los cristales de la epidermis de las hojas, y se procesan en un extractor mecánico de líquidos en condiciones asépticas hasta obtener un pre-gel.
- iii. El pre-gel se centrifuga durante 30 minutos a 278.15 K, posteriormente, el gel sobrenadante se separa y se centrifuga 30 minutos a 278.15 K.
- iv. El gel sobrenadante de la última centrifugación se almacena en condiciones estériles, protegido de la luz, en refrigeración a 277.15 K, durante 12 horas.

Encapsulación con gel de *aloe vera* mediante la técnica de liofilización.

Una vez obtenido el gel de *Aloe vera*, después del procedimiento de refrigeración, se aplica al proceso de encapsulación de sustancias bioactivas. Con la intención de determinar la influencia del proceso de preparación del gel en sus características protectoras se esterilizó una porción de él, como se describe a continuación.

- 5
- 10 Parte del gel obtenido en el proceso de extracción antes descrito, se esterilizó a 394.15 K por 10 min, y la otra parte se utilizó sin esterilizar. Tanto el gel de *Aloe vera* estéril como el no estéril fueron almacenados en refrigeración a 278.15 K durante 12 h.
- 15 El material de pared así generado, gel estéril y gel no estéril, se utilizó para encapsular compuestos bioactivos. Como bioactivos de prueba se eligieron células probióticas libres y metabolitos con actividad antimicrobiana. Se utilizó una relación entre compuesto bioactivo a material de pared de 1:4 respectivamente.

Finalmente, el material bioactivo recubierto con gel de *Aloe vera* puro, estéril y no estéril, se liofilizó siguiendo la secuencia: congelación a 253.15 K, presión de vacío 12 Pa y temperatura en el condensador 223.15 K.

5 Encapsulación de mezcla de gel de *aloe vera* y otros compuestos mediante la técnica de liofilización.

El *Aloe Vera* se extrajo siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Para ésta técnica de encapsulación, el gel de *Aloe Vera* se evaluó en combinación con
10 otros materiales de pared. Para ello se emplearon en iguales proporciones alginato 0,5-3 %, caseinato de sodio 5-20% y gel de *Aloe vera* (1:1:1). Con esta mezcla se encapsuló utilizando una relación entre compuesto bioactivo y mezcla de materiales de pared en una relación 1:4 respectivamente y se liofilizó con los mismos parámetros de proceso.

Encapsulación con una mezcla de gel de *aloe vera* y otros compuestos, mediante la técnica de extrusión.

A los compuestos bioactivos (células probióticas libres y metabolitos con actividad antimicrobiana) se les añadió una solución previamente preparada de gel de *Aloe vera* al 90 -100% p/v, caseinato de sodio al 5-20% p/v y alginato de sodio al 0,5-3% p/v, utilizando una relación entre compuesto bioactivo y mezcla de material de pared de 1:4 respectivamente. La mezcla de material de pared y compuesto bioactivo se goteó, mediante extrusión, sobre una solución de CaCl_2 0,1M. Por cada parte de material de pared y compuesto bioactivo se utilizaron 10 partes de CaCl_2 0,1M. Se utilizó como distancia de caída 20 cm de altura. Inmediatamente se formaron las cápsulas, las cuales se mantuvieron en la solución durante 30 min (Gbassi *et al.*, 2009. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. *International Journal of Food Microbiology*. 129: 103-105), posteriormente, se lavaron con agua destilada estéril y, finalmente, las cápsulas fueron almacenadas en refrigeración a 277.15 K durante 8 semanas, en viales de 1,8 mL protegidas de la luz.

Pruebas de actividad antimicrobiana de los metabolitos sometidos a encapsulación con gel de *aloe vera* o con una mezcla de gel de *aloe vera* y otros compuestos.

- 5 La actividad antimicrobiana de los metabolitos restablecidos, después de haber sido sometidos a encapsulación por los métodos físicos o físico químicos probados, fue determinada estimando la inhibición de una bacteria indicadora, para el caso *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923TM, utilizando para ello una modificación de la técnica empleada por Ryan *et al.* (1996, “An application in
10 cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad- spectrum bacteriocin, lacticin 3147.” Appl. Environ. Microb. Vol. 62: 612-619).

El método específico para la detección de la actividad antimicrobiana de los metabolitos restablecidos hace uso de agar Baird Parker en placas de 5 mm de
15 espesor a las cuales se les realizan orificios de 17 mm de diámetro con la ayuda de un sacabocado debidamente esterilizado. Las placas se inoculan masivamente con el *Staphylococcus aureus* y en los orificios se inocula el compuesto bioactivo con actividad antimicrobiana, es decir los metabolitos después de restablecidos del procedimiento de encapsulación. Este método se empleó para liofilización y
20 extrusión.

Resultados de la encapsulación con gel de *Aloe vera* mediante la técnica de liofilización y actividad antimicrobiana.

El compuesto bioactivo (células libres), encapsulado en el material de pared gel de *Aloe vera*, mantuvo el 83.3% de la viabilidad inicial (Tabla 1). El compuesto bioactivo células libres, encapsulado en el material de pared gel de *Aloe vera* estéril, mantuvo el 53.33% de la viabilidad inicial. Las células libres sin protección, sometidas a liofilización, conservaron solo el 0.002% de su viabilidad inicial. En cuanto a la viabilidad resultante para la mezcla empleada, *Aloe vera*, alginato y caseinato, se tasó en 62,87%.

La Figura 1 despliega gráficamente los porcentajes de viabilidad para los ensayos realizados y la Figura 2 muestra una microfotografía de las bacterias encapsuladas en la mezcla liofilizada.

Los resultados muestran evidentes beneficios del uso del gel de *Aloe vera* como material de protección de probióticos. Es mayor la protección brindada por el gel de *Aloe vera* no esterilizado que cuando se usa esterilizado:

Material	% Viabilidad
A	83,333
AE	53,333
Mezcla	62,870
Células libres liofilizadas	0,002
Células libres (sin liofilizar)	100,000

Tabla 1. Porcentaje de viabilidad de bacteria ácido láctica en diferentes materiales de pared, encapsulados por liofilización. A: Aloe vera, AE: aloe vera esterilizado, Mezcla: mezcla de Aloe vera con otros materiales de encapsulación

Por lo anterior, una alternativa de encapsulación con *Aloe vera*, es emplearlo sin esterilizar, bajo condiciones asépticas para garantizar que el contenido de polisacáridos no se vea afectado, así como sus propiedades funcionales. Además el gel de *Aloe vera* presenta ventajas económicas, frente a los protectores comerciales como glucosa, que son 3 veces más costosos.

Resultados de las pruebas de actividad antimicrobiana de los metabolitos sometidos a encapsulación con gel de *Aloe vera* o con una mezcla de gel de *Aloe vera* y otros compuestos.

- 5 Los resultados tabulados permiten inferir que cuando la pared del encapsulado está constituido por *Aloe vera* puro hay un mayor halo de inhibición, comparado con los demás tratamientos estudiados para esta técnica (Tabla 2), mientras que cuando la pared de la cápsula está constituida por *Aloe vera* estéril, el metabolito restablecido después de la liofilización genera un halo de inhibición menor
- 10 comparado con los demás tratamientos. Si la pared se construye con gel de *Aloe vera* más alginato de sodio y caseinato de sodio (mezcla), el metabolito al ser restablecido produce un halo de inhibición de la bacteria patógena de 2.07 mm.

Material	Halos de inhibición (mm)
Aloe vera puro	2,48
Aloe vera estéril	1,87
Mezcla (Alginato de sodio, caseinato de sodio y Aloe vera)	2,07
Células libres (Control)	2,07

- 15 **Tabla 2.** Halos de inhibición de los metabolitos producidos por la bacteria ácido láctica probada, encapsulada por la técnica de liofilización. .

Resultados de la encapsulación con una mezcla de gel de *Aloe vera* y otros compuestos, mediante la técnica de extrusión.

La combinación *Aloe vera* al 90 -100% p/v, caseinato de sodio al 5-20% p/v y
5 alginato de sodio al 0,5-3% p/v, se utilizó para encapsular compuestos probióticos
por extrusión, los cuales, una vez formados, se almacenaron por 8 semanas en
ambiente refrigerado. Al restablecer los compuestos probióticos al final de la
prueba, se alcanzó un porcentaje de viabilidad promedio de 18.37% después del
tiempo de almacenamiento. El tratamiento control (compuestos activos sin
10 encapsular), almacenados durante 8 semanas bajo refrigeración conservan 1.33%
de su viabilidad.

Resultados de las pruebas de actividad antimicrobiana de los metabolitos sometidos a encapsulación por extrusión con una mezcla de gel de *Aloe vera* y otros compuestos.

- 5 Los resultados de las pruebas de actividad antimicrobiana de los metabolitos, realizada con la bacteria indicadora *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923TM mediante la técnica de extrusión se presentan en la tabla 3.

La actividad antimicrobiana del metabolito restablecido después de ocho semanas de almacenamiento de las cápsulas bajo refrigeración presenta un halo de
10 inhibición del patógeno de $1.87 \pm 0,15$ mm y un porcentaje de retención de la actividad antimicrobiana de 78,5%. El control, constituido por compuesto bioactivo no encapsulado, muestra halo de inhibición de $1,70 \pm 0,40$ mm y porcentaje de retención de actividad antimicrobiana del 57%.

Material	Retención de actividad antimicrobiana (%)
Aloe vera, Alginato de sodio y caseinato de sodio	78,5
Células libres	57

15

Tabla 3. Retención de actividad antimicrobiana (%) del compuesto bioactivo por la técnica de extrusión.

Morfología, diámetro y humedad de las cápsulas

Morfología: Las cápsulas se ubicaron en el rayado central de una cámara de Neubauer (BOECO, Alemania) la cual posee rayado de longitudes conocidas, a continuación la cámara de Neubauer se enfocó en un microscopio de luz (Leica, USA) utilizando el objetivo 4X . Posteriormente se adaptó al microscopio, una cámara digital (Canon, PowerShot A2400 IS) con lente de proyección (Adapter Canon for Microscope. CAT 150200), con la cual se realizó la adquisición de imágenes. Condiciones de la cámara digital: Marca Canon, modelo PowerShot A2400 IS 16,0 Megapíxeles, tempo de exposición 1/3, ajuste de blanco (AWB) automático, resolución 3648 x 2736, ISO 200, flash desactivado.

Diámetro de capsula: Se empleó el diámetro de Feret para medir el diámetro de cápsulas, el cual se define como la distancia entre dos tangentes paralelas en el lado opuesto de la imagen de una partícula orientada aleatoriamente (Merkus, 2009). Este diámetro se obtuvo mediante un proceso de adquisición de imágenes, nombrado en el párrafo anterior. Mediante el software ImageJ 1.47c (Rasband, 2012) se determinó la circularidad de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Circularidad = \frac{4 \cdot \pi \cdot Area}{Perimetro^2}$$

Un valor de 1.0 en la circularidad indica un círculo perfecto. A medida que el valor se aproxima a 0.0, indica un polígono alargado.

La medición del diámetro de cápsula se realizó a 20 muestras de cada tratamiento durante ocho semanas de almacenamiento, a partir de las cuales se calculó un promedio y se realizó la distribución de tamaño.

Determinación del contenido de humedad: El contenido de humedad de las cápsulas se realizó por secado en horno a 100 °C, y se determinó por la diferencia de peso, y se expresó en porcentaje de humedad en base húmeda.

Resultados

Forma

15

Los valores más altos de circularidad los presentó la combinación alginato de sodio al 3.68%, caseinato de sodio al 10,00% y aloe vera al 95,00%.

Diámetro de capsula

Mediante metodología de superficie de respuesta, logramos obtener una ecuación del modelo matemático que describe el diámetro de las cápsulas de *W. confusa* elaboradas mediante extrusión con alginato de sodio (A), caseinato de sodio (C) y

5 *Aloe vera*.

$$\begin{aligned} \text{Diámetro (mm)} = & 78,5397 - 2,11612 * A + 0,357733 * C \\ & - 1,60008 * Aloe - 0,104744 * A^2 + 0,026125 * A * Aloe \\ & + 0,000506145 * C^2 - 0,003875 * C * Aloe + 0,00834547 * Aloe^2 \end{aligned}$$

10

De acuerdo a la Figura 5, la interacción Alginato de sodio con Aloe vera tiene efecto positivo sobre el diámetro de cápsulas, mientras que el alginato de sodio, el caseinato de sodio, Aloe vera y la interacción entre estos dos últimos, tienen

15 efecto negativo sobre el diámetro de cápsulas.

Encontramos además que a concentraciones bajas, el alginato de sodio tiene una relación directamente proporcional con el diámetro de capsula, hasta alcanzar un valor máximo, a partir de este presenta una relación inversamente proporcional,

20 por lo tanto concentraciones altas de alginato generaron cápsulas de menor tamaño.

Se encontró la combinación de los valores de cada componenete encapsulante, los cuales minimizan el diámetro de capsula, de acuerdo al análisis de optimización el valor óptimo es de 1,593 mm.

Meta: Minimizar Diámetro de cápsula (mm)			
Valor óptimo = 1,593			
Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Alginato de sodio (%p/v)	0,320	3,680	3,676
Caseinato de sodio (%p/v)	1,590	18,410	1,590
Aloe vera (%p/v)	89,950	100,000	90,479

- 5 **Tabla 4.** Respuesta óptima del diseño de superficie de respuesta para la actividad antimicrobiana de *W. confusa*

El material bioactivo recubierto o encapsulado tiene entonces una circularidad óptima de $0,808 \pm 0,025$, un diámetro óptimo para su funcionalidad 1.593 mm y una humedad inferior al 5%

10

El material bioactivo recubierto o encapsulado tiene unas condiciones óptimas para su funcionalidad cuando se combinan 3.676 %p/v de alginato de sodio, 1.590 %p/v de caseinato de sodio y 90.479 %p/v de Aloe vera.

- 15 Descripción de las figuras.

La Figura 1 despliega gráficamente la viabilidad de los compuestos bioactivos después de haber sido sometidos a los procesos de encapsulamiento considerados para los ensayos. Es notoria la superioridad del encapsulamiento

con Aloe vera puro y liofilizado.

La Figura 2 presenta el resultado de la encapsulación de un compuesto bioactivo con Aloe vera, mediante la tecnología de liofilización. En la microfotografía es posible diferenciar: a) bacterias ácido lácticas (compuesto bioactivo) parcialmente encapsuladas atrapadas en el material de encapsulación y b) Células totalmente encapsuladas, recubiertas con el material de encapsulación (Caseinato de sodio, alginato de sodio y Aloe vera).

La Figura 3 muestra la actividad antimicrobiana de los metabolitos restablecidos después de los procedimientos de encapsulación con Aloe vera y otros materiales de pared cuando la encapsulación se realiza por la técnica de liofilización.

La Figura 4 muestra la actividad antimicrobiana de los metabolitos restablecidos después de los procedimientos de encapsulación con Aloe vera y otros materiales de pared cuando la encapsulación se realiza por la técnica de extrusión.

La Figura 5 (a y b) muestra que la interacción Alginato de sodio con Aloe vera tiene efecto positivo sobre el diámetro de cápsulas, mientras que el alginato de sodio, el caseinato de sodio, Aloe vera y la interacción entre estos dos últimos, tienen efecto negativo sobre el diámetro de cápsulas. En la Figura 5b se muestra que a concentraciones bajas, el alginato de sodio tiene una relación directamente proporcional con el diámetro de cápsula, hasta alcanzar un valor máximo, a partir de este presenta una relación inversamente proporcional con el diámetro de

capsula, por lo tanto concentraciones altas de alginato generan cápsulas de menor diámetro por ende de menor tamaño. Por el contrario, la concentración de Aloe vera y de caseinato, tienen relación inversamente proporcional con el diámetro de capsula, hasta alanzar un valor mínimo, a partir del cual el diámetro de la cápsula

5 aumenta a medida que aumenta la concentración de estos compuestos.

Reivindicaciones modificadas

1. Un método para la obtención de un material de recubrimiento o encapsulamiento, caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

5

- a. Extraer el acíbar del material vegetal de Aloe vera, cortando en la base de la hoja y dejando drenar durante 1 hora.

- b. Separar los cristales de la epidermis del material vegetal y procesarlo en un extractor mecánico de líquidos en condiciones asépticas hasta obtener un pre-gel.

10

- c. Centrifugar el pre-gel durante 30 minutos a 278.15 K, separar el gel sobrenadante y centrifugarlo una segunda vez, 30 minutos a 278.15 K.

- d. Almacenar el gel obtenido de la última centrifugación en condiciones estériles, protegido de la luz, en refrigeración a 277.15 K, durante 12 horas.

15

2. Un método para obtener un material bioactivo encapsulado con un extracto de Aloe vera como material de recubrimiento o de encapsulación, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

20

- a. Extraer el acíbar del material vegetal de Aloe vera, cortando en la base de la hoja y dejando drenar durante 1 hora.

b. Separar los cristales de la epidermis del material vegetal y procesarlo en un extractor mecánico de líquidos en condiciones asépticas hasta obtener un pre-gel.

c. Centrifugar el pre-gel durante 30 minutos a 278.15 K, separar el gel sobrenadante y centrifugarlo una segunda vez, 30 minutos a 278.15 K.

d. Almacenar el gel obtenido de la última centrifugación en condiciones estériles, protegido de la luz, en refrigeración a 277.15 K, durante 12 horas.

e. Encapsular con gel de Aloe vera únicamente mediante la técnica de liofilización o encapsular con una mezcla de gel de Aloe vera y otros materiales de recubrimiento o encapsulación mediante la técnica de liofilización o encapsular con una mezcla de gel de Aloe vera y otros materiales de recubrimiento o encapsulación mediante la técnica de extrusión.

3. El método para obtener un material bioactivo encapsulado con un extracto de Aloe vera como material de recubrimiento o de encapsulación de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque la encapsulación de la material bioactivo puede llevarse a cabo a través de métodos físicos o fisicoquímicos tales como la liofilización, la extrusión, la coacervación, la polimerización interfacial o policondensación, la extracción-evaporación del disolvente, la gelificación, a través de un cilindro rotatorio con multiorificios, por deposición electrostática, por secado en spray, por recubrimiento en lecho fluidizado o a través de gelación iónica.

4. El método para obtener un material bioactivo encapsulado con un gel de Aloe vera como material de recubrimiento o de encapsulación de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque se realiza por liofilización usando gel de Aloe vera puro como material de recubrimiento o de encapsulación, utilizando una relación entre material bioactivo y material de recubrimiento o encapsulación de 1:4 respectivamente, bajo las siguientes condiciones: congelación 223.15-253.15 K, presión de vacío 8-12 Pa y temperatura en el condensador 313.15-328.15.
5. El método para obtener un material bioactivo encapsulado con un gel de Aloe vera como material de recubrimiento o de encapsulación de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque el material bioactivo recubierto con gel de Aloe vera puro y encapsulado por liofilización presenta una viabilidad superior al 83%.
6. El método para obtener un material bioactivo encapsulado con un gel de Aloe vera como material de recubrimiento o de encapsulación de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque cuando el material bioactivo recubierto con gel de Aloe vera puro es un metabolito con actividad antimicrobiana y cuando la encapsulación se realiza por liofilización, la actividad antimicrobiana del metabolito restablecido después de la encapsulación es de 10 hasta 50%.

7. El método para obtener un material bioactivo encapsulado con un gel de Aloe vera como material de recubrimiento o de encapsulación de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque dicha encapsulación se realiza por liofilización, usando gel de Aloe vera esterilizado a 394.15 K por 10 minutos como material de recubrimiento o encapsulación, utilizando una relación entre material bioactivo y dicho material de recubrimiento o encapsulación de 1:4 respectivamente, bajo las siguientes condiciones: congelación 223.15-253.15 K, presión de vacío 8-12 Pa y temperatura en el condensador 313.15-328.15.

8. El método para obtener un material bioactivo encapsulado con un gel de Aloe vera como material de recubrimiento o de encapsulación de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque el material bioactivo recubierto con gel de Aloe vera esterilizado y encapsulado por liofilización presenta una viabilidad superior al 53%.

9. El método para obtener un material bioactivo encapsulado con un gel de Aloe vera como material de recubrimiento o de encapsulación de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque la encapsulación se realiza por liofilización y porque se adiciona al gel de Aloe vera otros materiales de recubrimiento o encapsulación; como alginato entre el 0,5% y 3% y caseinato de sodio entre el 5% y 20%; agregados en relación con el gel de Aloe vera en iguales proporciones (1:1:1); y en

donde dicha mezcla está en relación 1:4 con el material bioactivo; bajo las siguientes condiciones: congelación 223.15-253.15 K, presión de vacío 8-12 Pa y temperatura en el condensador 313.15-328.15.

- 5 **10.** El método para obtener un material bioactivo encapsulado con un gel de Aloe vera como material de recubrimiento o de encapsulación de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque cuando el material bioactivo recubierto con gel de Aloe vera y con alginato entre el 0,5% y 3% y caseinato de sodio entre el 5% y 20%, y cuando es encapsulado por liofilización, presenta una viabilidad superior al 62%.
- 10
- 11.** El método para obtener un material bioactivo encapsulado con un gel de Aloe vera como material de recubrimiento o de encapsulación de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque la encapsulación se realiza por extrusión sobre una solución de CaCl_2 0,1M a una relación 1:10 (mezcla: CaCl_2) a una distancia de caída 20 cm de altura; porque el gel de Aloe vera se encuentra entre el 90% y 100% p/v en combinación con caseinato de sodio entre el 5% y 20% p/v y alginato de sodio entre el 0,5% y 3% p/v; porque el material bioactivo y dicha combinación de material de recubrimiento o encapsulación se encuentran en una relación de 1:4 respectivamente; y porque el material bioactivo recubierto obtenido se almacena en refrigeración a 277.15 K y protegidos de la luz.
- 15
- 20

12. El método para obtener un material bioactivo encapsulado con un gel de Aloe vera como material de recubrimiento o de encapsulación de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque cuando el material bioactivo recubierto con gel de Aloe vera entre el 90% y 100% p/v en combinación con caseinato de sodio entre 5% y 20% p/v y alginato de sodio entre el 0,5% y 3% p/v, y cuando es encapsulado por extrusión, presenta una viabilidad promedio del 18,37%.

13. El método para obtener un material bioactivo encapsulado con un gel de Aloe vera como material de recubrimiento o de encapsulación de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque cuando el material bioactivo es un metabolito con actividad antimicrobiana recubierto con gel de Aloe vera en una proporción entre el 90% y 100% p/v en combinación con caseinato de sodio entre el 5% y 20% p/v y alginato de sodio entre 0,5% y 3% p/v, y cuando el encapsulamiento se realiza por extrusión, la retención de la actividad antimicrobiana del metabolito restablecido después de la encapsulación se encuentra entre el 70-80% .

