



**Universitat**  
de les Illes Balears

## **TRABAJO DE FIN DE GRADO**

# **INFLUENCIA DEL ESTRÉS HÍDRICO-SALINO SOBRE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL ALOE VERA (*Aloe barbadensis* Miller)**

**José Luis Miró León**

**Grado de Química**

**Facultad de Ciencias**

**Año Académico 2020-21**

# **INFLUENCIA DEL ESTRÉS HÍDRICO-SALINO SOBRE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL ALOE VERA (*Aloe barbadensis* Miller)**

**José Luis Miró León**

**Trabajo de Fin de Grado**

**Facultad de Ciencias**

**Universidad de las Illes Balears**

**Año Académico 2020-21**

Palabras clave del trabajo:

*Aloe barbadensis* Miller, estrés hídrico-salino, pectinas, acemanano, propiedades funcionales

Nombre Tutor/Tutora del Trabajo: *FEMENIA MARROIG, Antoni*.

Se autoriza la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con fines exclusivamente académicos y de investigación

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## Resumen

En el siguiente trabajo de fin de grado se ha realizado un estudio sobre el efecto que ejercen dos variables independientes, como son el régimen de hidratación y la salinidad de riego, sobre los polisacáridos de la planta de *Aloe barbadensis* Miller, con el objetivo de evaluar cuáles son las condiciones de riego más adecuadas. Se han determinado las principales características tanto de los polisacáridos que forman las paredes celulares como del acemanano, polisacárido de reserva. Tanto el estrés hídrico como el gradiente salino provocaron un aumento significativo de la cantidad total de polisacáridos presentes en la planta. En cuanto a los polisacáridos de la pared celular, se observó un incremento de la cantidad de pectinas unida al aumento de la salinidad, independientemente de si se operaba con abundancia o déficit de riego. Los niveles de acemanano presentes en la planta de Aloe vera aumentaron en relación a las dos variables estudiadas, incrementándose en un 48% para las muestras sometidas a estrés hídrico respecto a las muestras tratadas con hidratación abundante; y hasta en un 79% a medida que la salinidad de riego se incrementó. También se detectó un importante aumento de la calidad del acemanano, determinada mediante el grado de acetilación (DA), independientemente del tipo de riego aplicado. En general, la calidad del acemanano producido por la Aloe vera aumentó a medida que se incrementó la salinidad del riego. En concreto, el DA del acemanano aumentó en un 86% para las muestras con hidratación abundante y hasta en un 155% para las muestras tratadas con déficit de hidratación. En conclusión, los resultados obtenidos indican la importancia del control de las condiciones de riego, en particular el tipo de hidratación y la salinidad aplicadas, con el fin de conseguir plantaciones de Aloe vera que produzcan acemanano no solo en mayor cantidad sino también de mejor calidad.

## Resum

En el següent treball de fi de grau s'ha realitzat un estudi sobre l'efecte que exerceixen dues variables independents, com són el règim d'hidratació i la salinitat de reg, sobre els polisacàrids de la planta d'*Aloe barbadensis* Miller, amb l'objectiu d'avaluar quines són les condicions de reg més adients. S'han determinat les principals característiques tant dels polisacàrids que formen les parets cel·lulars com de l'acemanà, polisacàrid de reserva. Tant l'estrès hídric com el gradient salí van provocar un augment significatiu de la quantitat total de polisacàrids presents a la planta. En relació als polisacàrids de la paret cel·lular, es va observar un increment de la quantitat de pectines unida a l'augment de la salinitat, independentment de si s'operava amb abundància o dèficit de reg. Els nivells de acemanà presents a la planta d'Aloe vera van augmentar en relació a les dues variables estudiades, incrementant-se en un 48% per a les mostres sotmeses a estrès hídric en comparació a les mostres tractades amb hidratació abundant; i fins a un 79% a mesura que la salinitat de reg es va incrementar. També es va detectar un important augment de la qualitat de l'acemanà, determinada mitjançant el grau d'acetilació (DA), independentment del tipus de reg aplicat. En general, la qualitat de l'acemanà produït per la Aloe vera augmentar a mesura que es va incrementar la salinitat del reg. En concret, el DA de l'acemanà va augmentar en un 86% per a les mostres amb hidratació abundant i fins a en un 155% per a les mostres tractades amb dèficit d'hidratació. En conclusió, els resultats obtinguts indiquen la importància del control de les condicions de reg, en particular el tipus d'hidratació i la salinitat aplicades, per tal d'aconseguir plantacions d'Aloe vera que produeixin acemanà no només en major quantitat sinó també de millor qualitat.

## Abstract

In the following final degree project, a study has been carried out on the effect that two independent variables, such as the hydration regime and the irrigation salinity, produce on the polysaccharides of the *Aloe barbadensis* Miller plant, with the aim of evaluating which are the most suitable irrigation conditions. The main characteristics of both, the cell wall polysaccharides and acemannan, a reserve polysaccharide, have been determined. Both water stress and the saline gradient promoted a significant increase in the total amount of polysaccharides present in the plant. Regarding the polysaccharides of the cell wall, an increase in the amount of pectins was observed together with an increase in salinity, regardless of whether the plants were treated with abundant or insufficient irrigation. The levels of acemannan present in the Aloe vera plant increased in relation to the two variables studied, rising by 48% for the samples subjected to water stress compared to the samples treated with abundant hydration; and up to 79% as the irrigation salinity increased. A significant increase in the quality of acemannan was also detected, determined by the degree of acetylation (DA), regardless of the type of irrigation applied. In general, the quality of the acemannan produced by Aloe vera augmented as the salinity of the irrigation increased. Specifically, the DA of acemannan increased by 86% for the samples with abundant hydration and up to 155% for the samples treated with a hydration deficit. In conclusion, the results obtained indicate the importance of controlling the irrigation conditions, in particular the type of hydration and the salinity applied, in order to achieve Aloe vera plantations that produce acemannan not only in higher quantity but also of better quality.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>6</b>
1.1. Aloe <i>barbadensis</i> Miller, contextualización.....	6
1.2. Usos del Aloe vera.....	6
1.2.1. Aloe como dietética.....	6
1.2.2. Aloe en cosmética .....	7
1.2.3. Aloe como planta medicinal.....	7
1.3. Acemanano como compuesto bioactivo .....	7
1.4. Polisacáridos de la pared celular.....	8
1.4.1. Polisacáridos estructurales.....	9
1.4.2. Polisacáridos matriciales.....	9
1.5. Propiedades funcionales .....	10
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>11</b>
3.1. Muestras .....	11
3.2. Residuo Insoluble en Alcohol (AIR).....	12
3.3. Fracciones solubles o aislamiento de Acemanano .....	12
3.4. Análisis de azúcares neutros.....	12
3.5. Determinación de azúcares neutros.....	13
3.6. Preparación de patrones del análisis de azúcares neutros .....	14
3.7. Análisis y determinación de ácidos urónicos.....	14
3.8. Grado de metilesterificación de las pectinas (DME).....	15
3.9. Propiedades funcionales .....	15
3.10. Grado de acetilación del Acemanano.....	16
3.11. Estudio y análisis estadístico.....	17
<b>4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>17</b>
4.1. Residuo insoluble en alcohol (AIR) .....	17
4.1.1. Rendimiento de extracción del AIR.....	17
4.2. Polisacáridos de la pared celular.....	18
4.2.1. Polisacáridos estructurales.....	20
4.2.2. Polisacáridos matriciales .....	21
4.3. Fracciones solubles (FS): aislamiento del acemanano .....	26
4.3.1. Polisacáridos de reserva.....	26
4.3.2. Grado de acetilación del acemanano.....	28
4.4. Propiedades funcionales .....	29
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>31</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>32</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1. *Aloe barbadensis* Miller, contextualización

*Aloe barbadensis* Miller (Figura 1), conocida como Aloe vera o sábila, se trata de una planta suculenta y perenne de la familia de las Liliaceae de tallo corto y de hojas verdes rígidas, anchas y triangulares, dispuestas en forma de roseta basal, que pueden medir hasta 50 cm de largo y 15 cm de ancho; éstas, presentan dientes en el margen exterior de aproximadamente 2 mm, duros, gruesos y de color más claro que la propia hoja. Existen más de 300 especies diferentes de Aloe, entre los que se engloba la especie *barbadensis* Miller, fuente de estudio en este trabajo. La planta presenta aproximadamente un 99% de agua (Femenia et al. (1999)), por lo que el restante 1% está compuesto por una mezcla de polisacáridos (representando aproximadamente un 60% de la fracción sólida).



**Figura 1.** Ejemplar de *Aloe barbadensis* Miller

El Aloe vera se trata de una planta de secano, procedente de climas áridos y calurosos. Se cree que es originaria de Arabia, aunque su plantación y distribución engloba grandes regiones subtropicales, donde se incluye el Mediterráneo. Se trata de una planta que no es capaz de tolerar el frío ni la humedad en exceso, por lo que su producción a gran escala se desarrolla en gran parte de Centroamérica y Sudamérica (Venezuela, Colombia, México, etc.).

## 1.2. Usos del Aloe vera

Las propiedades fisicoquímicas que presenta la planta de aloe son muy diversas, lo que hace que pueda asumir un rol principal en un gran rango de aplicaciones industriales: desde la medicina, las industrias farmacéuticas, cosmética hasta en la industria agroalimentaria.

### 1.2.1. Aloe vera como alimento

Los extractos y geles de Aloe se reconocen como uno de los suplementos alimenticios más potentes e importantes que existen (Habtemariam (2017)) en la actualidad en la industria agroalimentaria. Una de las principales razones probablemente se deba a la gran cantidad de constituyentes activos que lo componen: polisacáridos, vitaminas, enzimas, elementos minerales, azúcares, antraquinonas, ácidos grasos, hormonas, etc. (Surjushe et al. (2008)). Además de su gran concentración en polisacáridos, lo cual provoca que los extractos de aloe resulten altamente saciantes y que presenten una actividad y efectos laxantes muy elevada. Esto se debe a que parte de los compuestos bioactivos del aloe son

antraquinonas, presentes en el latex, que incrementa el contenido en agua intestinal y estimula la secreción y la peristalsis intestinal (Ishii et al. (1994)). No obstante, un elevado porcentaje de la población presenta efectos secundarios debido a alergias atribuidas a la familia de las Liliaceae, entre las que se encuentra el Aloe *barbadensis* Miller.

### 1.2.2. Aloe vera en cosmética

Uno de los principales usos del Aloe vera, incluso más importante en términos cuantitativos que el uso como suplemento alimenticio, es su utilización en productos cosméticos. Una de las características que definen al Aloe vera es su alta efectividad en las aplicaciones cutáneas y dermatológicas, creando un amplio campo de posibilidades y trabajo. Se utiliza como aditivo en cremas solares o “after-sun” debido a sus propiedades regenerativas, calmantes e hidratantes; este es el uso más común del Aloe vera en esta industria. No obstante, también se agrega por los mismos motivos en jabones, geles de baño y productos de limpieza facial. Su alto contenido en vitaminas, además de su capacidad de almacenamiento de agua debido a los polisacáridos de reserva cumplen el requisito establecido por la industria cosmética (Ijaz et al. (2021)). No obstante, pueden darse efectos adversos en el caso de que la persona a la que se aplica el producto sufra de alergia a la planta.

### 1.2.3. Aloe vera como planta medicinal

A la planta de Aloe vera, se le atribuyen muchas propiedades curativas, siendo una de las plantas medicinales por excelencia. A pesar de que anteriormente se ha mencionado que existen más de 300 especies diferentes de Aloe, en sólo cuatro de las especies conocidas se ha demostrado que se presenten propiedades medicinales: Aloe *perryi* Baker, Aloe *ferox*, Aloe *arborescens* y Aloe *barbadensis* Miller (Vega et al. (2005)). Su uso en el ámbito terapéutico debe remontarse hasta el siglo XXI a.C., y desde entonces ha sido utilizada para combatir o aminorar los efectos de diferentes enfermedades desde dolencias estomacales hasta el cáncer (Murugesan et al. (2021)). Aunque su especialidad se encuentra en el sector de dermatología, en particular, en el tratamiento contra afecciones cutáneas causadas por radiación (Visuthikosol et al. (1995); Sharifi et al. (2021); Maenthaisong et al. (2007)), se ha documentado casos en los que el Aloe vera es capaz de ocasionar múltiples beneficios que no están relacionados con la epidermis (Alnouri et al. (2020); Shelton (1991)). Existen numerosos casos donde el uso de Aloe vera favorece la evolución y mejora en el caso de psoriasis, dermatitis seborreica, acné, herpes, etc.; sin embargo, aunque se trata de un gran reparador, antiinflamatorio y mitigante en quemaduras de primer y segundo grado, no se cumple para las quemaduras de tercer grado (Bunyapraphatsara et al. (1996)), pudiendo ocasionar efectos secundarios como la propagación de la infección; aunque por regla general, los geles de Aloe se emplean para la reepitelización en quemaduras. Estas propiedades han sido asociadas a los diferentes polisacáridos y compuestos fenólicos, que se tratan de los componentes bioactivos de la propia planta (Minjares-Fuentes et al. (2016); Alvarado-Morades et al, (2019)).

El efecto benéfico que causa el Aloe vera sobre un organismo se atribuye a los componentes bioactivos que presenta: antraquinonas como aloína, glicósidos de antraquinonas, cumarinas como la umbeliferona y, en particular, polisacáridos, entre los que destaca el acemanano.

### 1.3. Acemanano: principal compuesto bioactivo en el Aloe vera

Un compuesto bioactivo es aquel que tiene un efecto sobre un organismo vivo, independientemente de si se trata de un tejido o únicamente de una célula, siendo capaces de estimular receptores, inhibir enzimas entre otras funciones. Varios estudios han concluido que el aumento del consumo de compuestos bioactivos puede aportar un efecto muy positivo en la salud; disminuyendo el riesgo de

sufrir enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares, problemas respiratorios e incluso Alzheimer (Bhushan et al. (2021), Hassimotto et al. (2005)). La mayoría de los compuestos bioactivos pueden encontrarse tanto en organismos vegetales como en animales, además de poder obtenerlos de forma sintética.

El acemanano es un polisacárido de reserva o almacenamiento que se encuentra en el interior de las células parenquimatosas del gel de Aloe vera (Femenia et al. (1999)). De acuerdo con Chokboribal et al. (2015), se trata de una cadena única de polisacáridos de manosa acetilada en su mayoría (>60%) unidos mediante enlaces  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) junto con unidades de glucosa (aproximadamente un 20%) que incorporan en su estructura cadenas laterales de galactosa (aproximadamente un 10%) unidas al C-6 de la manosa. Además, la acetilación de las unidades de manosa se divide entre los carbonos localizados como C-2, C-3 y C-6, por lo que condicionan la incorporación de galactosa a la cadena principal. Se estima que la proporción acetil:manosa en el acemanano es de 1 o mayor (Fogleman et al. (1992)). Estos grupos acetilo son los grupos funcionales que, presentes en el acemanano, influyen significativamente en las propiedades fisicoquímicas y biológicas de la planta, por lo que el hecho de que el acemanano se comporte como un compuesto bioactivo depende fundamentalmente del grado de acetilación que presenta (Campestrini et al. (2013)).

Diferentes estudios han demostrado que las manosas acetiladas, que se encuentran en la cadena principal del acemanano, son capaces de activar las células hematopoyéticas, también conocidas como células madre, las cuales se encargan de producir los elementos formes o componentes de la sangre (glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas). Esta activación produce un beneficio en el sistema inmunológico del organismo, por lo que se conoce al acemanano como un inmunoestimulador natural (Reynolds and Dweck (1999)); aunque también es cierto que no se conoce el mecanismo exacto de acción del acemanano sobre el sistema. Además de su potencial como antiinflamatorio e inmunoestimulador, en estudios en ratas, a las cuales se les implantaron células de sarcoma murino, el acemanano presentó un rol clave en la síntesis y liberación de interleucina-1 (IL-1) y de un factor de necrosis tumoral de macrófagos, provocando la inhibición de la actividad de las células cancerosas hasta conseguir el deterioro completo de éstas (Peng et al. (1991)).

El acemanano es un polisacárido presente en el Aloe vera compuesto mayoritariamente de manosa, un tipo de azúcar. Sin embargo, la manosa no sólo se encuentra en el Aloe vera como constituyente del acemanano, sino que también tiene función estructural, como parte de las hemicelulosas. Éstas últimas, además de la celulosa, entran en la categoría de polisacáridos de la pared celular.

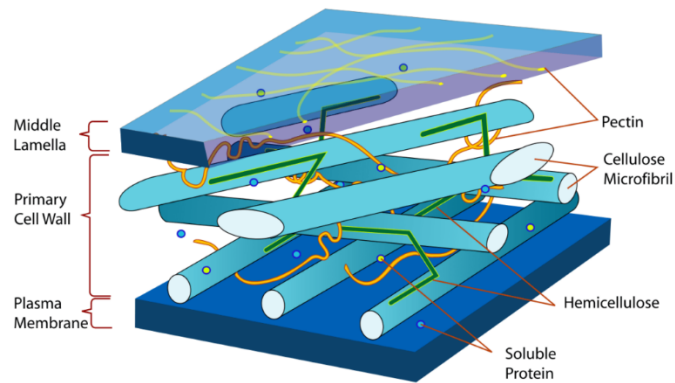
#### 1.4. Polisacáridos de la pared celular

La pared celular (figura 2) es una membrana rígida que proporciona soporte, estabilidad y actividad a la célula. Se encuentra en la periferia y encierra la totalidad del sistema vital y contenido de la célula, de manera que sirve como protección ante agentes externos.

La pared celular primaria está formada mayoritariamente por polisacáridos que se dividen entre estructurales y matriciales, éstos son los encargados de componer y dar funcionalidad a la pared. Los polisacáridos estructurales están formados en su gran mayoría por celulosa, mientras que los matriciales se dividen en hemicelulosas y pectinas.

En el caso de la existencia de paredes secundarias, además de los polisacáridos también se deposita lignina, que se trata de un polímero de origen fenólico que confiere rigidez a la pared celular (Bailey (1938)).





**Figura 2.** Representación de los polisacáridos presentes en la pared celular primaria. Fuente: LadyofHats (2007) a través de Wikimedia Commons, con nombre de archivo "Plant cell wall diagram".

### 1.4.1. Polisacáridos estructurales

La planta de Aloe vera, como vegetal, presenta un sistema de polisacáridos en la pared celular que tiene celulosa como el principal polisacárido estructural, el cual se encarga de mantener y dar forma a la propia pared.

#### A) Celulosa

La celulosa es un biopolímero formado por moléculas de  $\beta$ -glucosa unidas mediante enlaces  $\beta(1\rightarrow4)$ -O-glucosídico una respecto a la otra y se trata de la molécula biológica orgánica más abundante del sistema terrestre. La celulosa es el polisacárido principal de la pared celular de cualquier organismo vegetal y comprende aproximadamente un tercio de la masa total de dicha pared (Ochoa-Villarreal et al. (2012)) y forma parte tanto de la pared celular primaria como secundaria (Bailey (1938)). Existen interacciones intercatenarias entre cadenas independientes de celulosas, de manera que consiguen formar fibras; el tipo de interacciones que dan dicha formación son enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo que presenta la conformación de silla de las unidades de glucosa y fuerzas de Van der Waals. La conformación en forma de silla y tener dichos grupos hidroxilo en ecuatorial permite un gran número de interacciones intercatenarias que consigue crear moléculas de elevado peso molecular, lo que también resulta en que las interacciones con el disolvente se minimicen en gran cantidad, resultando a la celulosa como un polímero muy insoluble en cualquier disolvente, y especialmente en agua (Medronho et al. (2012)).

### 1.4.2. Polisacáridos matriciales

Los polisacáridos matriciales están compuestos en su gran mayoría por hemicelulosas y pectinas, y a diferencia de la celulosa, éstos forman la disolución donde se halla la celulosa; es decir, forman la matriz de la pared celular.

#### A) Hemicelulosas

A diferencia de la celulosa, las hemicelulosas son polisacáridos de bajo peso molecular y con una menor ordenación, formando estructuras más bien amorfas no empaquetadas. Éstas tienen una estructura de cadenas principales que se unen mediante enlaces  $\beta(1\rightarrow4)$  con configuración ecuatorial, formadas mayoritariamente por xiloglucanos, xilanos, manosas y glucanos. La función que tienen es la de fortalecer la pared celular mediante interacciones de tipo hidrógeno o incluso enlaces covalentes y/o iónicos con las moléculas de celulosa y, en el caso de las paredes secundarias mayoritariamente, con lignina. Se ha estudiado que, además de los monosacáridos que se han mencionado, existen en

determinadas paredes celulares glucanos que se unen mediante enlaces  $\beta(1\rightarrow3, 1\rightarrow4)$ , diferentes a los enlaces mencionados anteriormente, pero todavía se encuentra en una hipótesis más que en una realidad (Vibe Scheller and Ulvskov (2010)).

Los tipos de hemicelulosas se clasifican según los azúcares mayoritarios que la componen y, al igual que la celulosa, debido a la numerosa cantidad de interacciones que son capaces de formar con otras moléculas y con ellas mismas, presentan una elevada insolubilidad en agua (Davidson and McDonald (1998)).

### *B) Pectinas*

Las pectinas son un grupo de polisacáridos donde, a diferencia de las hemicelulosas y de la celulosa, incorpora en su estructura monosacáridos ácidos como el ácido galacturónico, aunque también incluye azúcares neutros como la ramnosa, la arabinosa y la galactosa. Se trata de un grupo de compuestos muy complejos, los cuales pueden clasificarse en dos grandes grupos: homogalacturonanos y ramnogalacturonanos. Los primeros consisten en una cadena lineal de residuos de ácido galacturónico unidos mediante enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$ , y la diferencia con los segundos es que éstos últimos adicionan en su cadena principal unidades de ramnosa, las cuales permiten que unidades de arabinosa y galactosa se unan por el C-4 de la ramnosa de forma lateral a la estructura principal de ácido galacturónico, por lo que presentará ramificaciones (Yapo (2011)).

Como bien se ha mencionado anteriormente, las pectinas incorporan grupos ácidos a la estructura, en especial y aproximadamente el 90% de éstos es el ácido galacturónico. El grupo -COOH que presenta puede encontrarse metilado, de manera que, en lugar de un grupo ácido, existe un éster. Este parámetro se conoce como el grado de metilesterificación de las pectinas y tiene una importante funcionalidad en la pared celular, como por ejemplo la remodelación del tejido endospermo en frutos con semillas (Cruz-Valderrama et al. (2018)). Por lo cual, el proceso de metilesterificación aumenta a medida del proceso de maduración de la planta.

A pesar de todo el conocimiento que se tiene sobre los polisacáridos pécticos, no se conoce su funcionamiento ni su constitución de manera completa, lo que abre un amplio campo de posibilidades y desarrollo sobre la funcionalidad e importancia de este tipo de polisacáridos (Yapo (2011)).

### 1.5. Propiedades funcionales

Los tejidos vegetales presentan una capacidad y características diferentes uno de otro que dependientes de los polisacáridos de la pared celular, que pueden tener una importancia en procesos industriales, como se ha comprobado en el caso del Aloe vera. Estas propiedades funcionales se dividen el hinchamiento (Sw), capacidad de retención de agua (WRC) y capacidad de adsorción de aceite (FAC).

#### 1.5.1. Hinchamiento (Sw)

La capacidad de hinchamiento se define por la cantidad de líquido (agua) que puede absorber un producto o material sumergido en un exceso del propio líquido. Por lo tanto, se determina la capacidad del producto de aumentar su volumen en presencia de un exceso de agua (Ruiz-Garza et al. (2017)).

#### 1.5.2. Capacidad de retención de agua (WRC)

La capacidad de retención de agua se define por la cantidad de agua que es capaz de retener un material o producto después de la aplicación de una fuerza externa y, por lo tanto, permanece

hidratada después de ser sometida, por ejemplo a un proceso de centrifugación (Ruiz-Garza et al. (2017)). La diferencia respecto al hinchamiento es que, en este caso, el líquido no se encuentra en exceso, sino que es el máximo que puede retener en su interior.

### 1.5.3. Capacidad de adsorción de aceite (FAC)

La capacidad de adsorción de aceite se define como la cantidad de lípidos que presenta un material o producto tras ser sometido a un proceso de centrifugación. Se trataría de un proceso donde se somete la muestra de Aloe vera a un exceso de aceite y mediante la centrifugación se libera el dicho aceite que no se encuentra fuertemente ligado a los polisacáridos.

## 2. OBJETIVOS

---

El actual trabajo de fin de grado se enmarca en una colaboración internacional que lleva a cabo el Grupo de Ingeniería Agroalimentaria del Departamento de Química de la Universitat de les Illes Balears (UIB) con el grupo de Ingeniería de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED), en México. El trabajo conjunto tiene como objetivo global “Evaluar la influencia del estrés hídrico-salino sobre las características fisicoquímicas de la planta Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller)”.

En este contexto, el presente trabajo se centra en el estudio de los principales polisacáridos presentes en el Aloe vera y por tanto se ha marcado como objetivo general **estudiar la influencia del estrés hídrico-salino sobre los polisacáridos presentes en la planta Aloe vera.**

Con la finalidad de alcanzar el objetivo propuesto se han establecido los siguientes objetivos de carácter específico:

- Caracterizar los polisacáridos de la pared celular de la planta de Aloe vera: celulosa, hemicelulosas y pectinas.
- Determinar las principales características de los polisacáridos pécticos.
- Caracterizar el principal polisacárido de reserva del Aloe vera: el acemanano.
- Determinar el grado de acetilación del acemanano
- Estudiar las propiedades funcionales (hinchamiento, capacidad de retención de agua y capacidad de retención de aceite), derivadas del conjunto de polisacáridos de la planta Aloe vera

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 3.1. Muestras

Las muestras utilizadas, analizadas y sobre las que se han aplicado todos los procesos de determinación a lo largo del trabajo proceden de plantas de Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller), concretamente de 10 ejemplares que han fueron sometidos a diferentes condiciones de riego y salinidad.

El tratamiento de déficit/exceso de agua de riego que han experimentado es el que se va a estudiar, utilizando la siguiente nomenclatura: “HA” implica que la muestra ha sido hidratada habitualmente, por lo que se encuentra en tratamiento de exceso hídrico; por otra parte, “HD” implica que la muestra ha sido sometida a una hidratación desfavorable, por lo que se encuentra en tratamiento de déficit hídrico. Además de lo expuesto anteriormente, el número que acompaña a la codificación representa la concentración salina en mM del agua de riego. Por lo tanto, la muestra “HA50” implica que la planta ha sufrido un tratamiento de exceso hídrico y que el agua de riego tenía una concentración de 50 mM de sal.

### 3.2. Residuo Insoluble en Alcohol (AIR)

Los residuos insolubles en alcohol (AIR) obtenidos a partir de las muestras Aloe vera fueron obtenidos mediante la inmersión de las propias muestras congeladas en etanol caliente, hasta alcanzar una concentración final de 85% (v/v) siguiendo la metodología descrita por Waldron and Selvendran (1990) y posteriormente adaptada por Femenia et al. (1999) para muestras de Aloe vera. Teniendo en cuenta que las muestras se encuentran libres de almidón, el AIR se estableció como material de partida para el estudio de los polisacáridos que forman la pared celular de la planta. Cada muestra de diferente hidratación y salinidad de riego ha sido sometida a este desarrollo, por lo que se han obtenido 10 muestras en diferentes condiciones (Desde HA0 hasta HD200) con su correspondiente vial de plástico graduado y herméticamente sellada. Este proceso se llevó a cabo en la Universidad Juárez del Estado de Durango, Gómez Palacio, México.

### 3.3. Fracciones solubles o aislamiento de Acemanano

El aislamiento del principal compuesto bioactivo de la planta de Aloe vera, el acemanano, fue llevado a cabo por el proceso y metodología descrita por Femenia et al., (2003). Alrededor de 300 mg de AIR de las muestras de Aloe vera fueron suspendidos en 200 mL de agua destilada, agitándose por 2 h a temperatura ambiente mediante un agitador magnético. Una vez cumplido el periodo, se centrifugó la mezcla a 13000 xg y se recogió el sobrenadante de la mezcla, rico en acemanano, que posteriormente fue congelado a -40 °C y sometido a un proceso de liofilización. El material que resulta insoluble en esta fase y no forma parte del sobrenadante son los polisacáridos que forman la pared celular del Aloe vera. Posteriormente, el producto resultante fue etiquetado como “fracción soluble” y empaquetado en condiciones anhidras. Cada muestra de diferente hidratación y salinidad de riego ha sido sometida a este desarrollo, por lo que se obtienen 10 muestras de diferentes condiciones (Desde HA0 hasta HD200) con su correspondiente vial de plástico graduado y herméticamente sellada. Este proceso también se llevó a cabo en la Universidad Juárez del Estado de Durango, Gómez Palacio, México.

### 3.4. Análisis de azúcares neutros

Los polisacáridos son hidratos de carbono formados por la unión de diferentes unidades básicas conocidas como monosacáridos o azúcares que desempeñan características estructurales y de reserva energética.

En el caso de las muestras de Aloe vera, previamente a su análisis, se llevó a cabo la hidrólisis ácida de los mismos mediante el proceso descrito por Rodríguez-González et al. (2011).

Para los AIRs, en los cuales se encuentran presentes los polisacáridos de la pared celular, se pesaron aproximadamente 5 mg en un tubo pyrex y se adicionaron 200 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 12M (equivalente al 70%). Seguidamente, se incubaron a temperatura ambiente durante 3h con agitación cada 30 min, de esta

forma, se consigue la solubilización de las fibras de celulosa. A continuación, se adicionaron 2.2 mL de agua destilada con el objetivo de rebajar la concentración de  $H_2SO_4$  desde 12M a 1M y las muestras se volvieron a incubar a 100 °C, en un bloque seco, durante 2.5 h. No obstante, cuando esta segunda incubación alcanzó 1 h de duración, se colocaron los tubos en un baño de agua-hielo y se retiraron 0.5 mL del material hidrolizado para el posterior el análisis de ácidos urónicos. Una vez extraída la alícuota, se prosiguió con la hidrólisis 1.5 h más hasta llegar al objetivo de 2.5 h. Acabada la hidrólisis, los tubos se dispusieron en un baño de agua-hielo y se congelaron hasta su análisis (Saeman et al. (1954)).

Para las muestras de la fracción soluble, que contiene principalmente el acemanano, se omitió el paso con  $H_2SO_4$  12M y se realizó la hidrólisis directamente 2.5 h a 100 °C en un bloque seco con una concentración de  $H_2SO_4$  1M. Al igual que las muestras anteriores, éstas también fueron congeladas hasta su posterior análisis.

### 3.5. Determinación de azúcares neutros

Para la determinación cuantitativa de los azúcares presentes en las muestras, se les añadió a todas y cada una de ellas 200 µg de patrón interno, en concreto, 2-deoxy-glucosa, una hexosa que no se encuentra presente en la naturaleza, por lo cual no es posible encontrarla previamente en la muestra. Los monosacáridos que se identificaron y determinaron fueron los siguientes: ramnosa (Rha), fucosa (Fuc), arabinosa (Ara), xilosa (Xyl), manosa (Man), galactosa (Gal) y glucosa (Glc).

Para cada una de las muestras hidrolizadas, se tomó una alícuota de 1 mL junto con la cantidad adecuada de patrón interno y se neutralizó con 200 µL de  $NH_3$  al 25%. Seguidamente, se añadieron 100 µL de una solución de  $NaBH_4$  al 15% (m/v) en  $NH_3$  3M, la cual actúa como agente reductor y consigue reducir el grupo aldehído a alcohol, de forma que la estructura cíclica de todos los azúcares pasa a su forma alditólica. Posteriormente, las muestras fueron agitadas e incubadas en un bloque seco a 30 °C durante 1 h. Cumplido el tiempo en el bloque, los tubos de ensayo se depositaron en un baño de agua-hielo y se adicionaron 100 µL de ácido acético glacial de manera que el exceso de  $BH_4^-$  quedara eliminado. Más adelante, se tomó una alícuota de 300 µL de cada muestra, a la cual se le añadieron 450 µL de 1-metilimidazol junto a 3 mL de anhídrido acético. Esta adición consigue que se formen los acetatos de alditol. La importancia de los acetatos de alditol reside en que su volatilidad es muy superior a la del azúcar propio, de esta forma se convierten en compuestos detectables mediante cromatografía de gases. El uso del 1-metilimidazol hace que la reacción de acetilación tenga lugar, ya que en principio se trata de una reacción de cinética lenta, por lo que actúa como catalizador. Una vez añadidos todos los reactivos, las muestras fueron agitadas e incubadas nuevamente en un bloque seco a 30 °C durante 30 min.

Una vez formados los acetatos de alditol, éstos fueron extraídos del medio acuoso mediante el uso de  $CH_2Cl_2$ . La fase orgánica, por densidad, quedaba en la parte inferior del tubo de ensayo; y como la fase acuosa queda en la parte superior, se eliminó mediante succión. Se realizaron un total de tres lavados por muestra. Una vez los acetatos de alditol quedaron retenidos en la fase de  $CH_2Cl_2$ , se procedió a evaporar la fase orgánica bajo un flujo de argón a 40 °C hasta total sequedad. Una vez seca, se realizaron dos lavados con acetona, evaporando el disolvente por medio de un flujo de argón. Las muestras resultantes se congelaron durante 24 h.

Los azúcares neutros que contenían las muestras inicialmente, derivatizados en sus respectivos acetatos de alditol o alditol acetatos, fueron disueltos y encapsulados para su análisis utilizando 100 µL de  $CH_2Cl_2$  como disolvente (Selvendran, March, Ring (1979)).

Se aplicó una técnica de separación mediante cromatografía de gases (GC-FID) siguiendo un programa de temperatura de 9 min donde la temperatura inicial fueron 200 °C y la final 230 °C. Para ello,

existieron dos rampas de temperatura: la primera, aumentó de 200 °C a 220 °C con un proceso de incremento de 40 °C/min y se mantuvo durante 7 min a 220 °C; la segunda, aumentó de 220 °C a 230 °C con un proceso de incremento de 20 °C/min y se mantuvo durante 1 min a dicha temperatura. La columna capilar empleada fue una columna DB-225 (Agilent J&W Scientific, Santa Clara, CA 95051, United States) de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.15 µm de grosor de film. Como fase móvil se empleó una corriente de He con un caudal de 0.8 L/min. La temperatura del inyector fue 220 °C, mientras que la del detector (detector de ionización de llama o FID) fue de 230 °C. El cromatógrafo empleado fue Hewlett Packard 5890, de la misma empresa que la columna. El volumen de inyección se estableció en 1 µL, con 10 lavados de hexano y diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) entre inyecciones.

### 3.6. Preparación de patrones del análisis de azúcares neutros

Para una mayor precisión de análisis y una mejora en la cuantificación de los azúcares de la muestra, se prepararon 4 patrones de concentración conocida de azúcares: P1 (100 µL de cada azúcar y 200 µL de patrón interno [concentración azúcar y patrón interno: 1 mg/mL]), P2 (200 µL de cada azúcar y 200 µL de patrón interno), P3 (300 µL de cada azúcar y 200 µL de patrón interno) y P4 (400 µL de cada azúcar y 200 µL de patrón interno). Tanto los patrones como las muestras fueron sometidas al mismo proceso.

### 3.8. Análisis y determinación de ácidos urónicos

Los ácidos urónicos (UA) o azúcares ácidos fueron determinados mediante el método colorimétrico descrito por Blumenkrantz y Asboe-Hansen (1973).

Para la cuantificación de los UA, se realizó una curva de calibrado con una disolución de ácido galacturónico de concentración 200 µg/mL. Para ello, se prepararon 5 patrones de volumen total 500 µL: P0 (500 µL de agua destilada y 0 µL de ácido galacturónico), P20 (450 µL de agua destilada y 50 µL de ácido galacturónico), P40 (400 µL de agua destilada y 100 µL de ácido galacturónico), P60 (350 µL de agua destilada y 150 µL de ácido galacturónico), P80 (300 µL de agua destilada y 200 µL de ácido galacturónico).

Una vez obtenidos los patrones y las muestras, se aplicó un factor de dilución a éstas últimas. La dilución depende de la concentración final, por lo que se trata de una dilución experimental (realizando una primera dilución de tanteo con las muestras de AIR y las de FS, se decidió finalmente diluir con 1.5 mL de agua destilada las muestras procedentes de las FS y con 6.5 mL de agua destilada las muestras procedentes de los AIRs). A partir de las diluciones, se tomaron tres alícuotas de 0.5 mL de manera que quedaran 1 blanco y 2 réplicas. El motivo de la realización de un blanco es que algunas de las muestras presentan una coloración amarillenta que puede interferir en el detector colorimétrico, por lo que se utilizó como referencia de cada una de las réplicas.

Los tubos se colocaron en un baño de agua-hielo y se adicionaron 3 mL de una disolución de borato de sodio 50 mM preparada en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Una vez realizada la adición, se agitaron y se incubaron los tubos en un bloque seco durante 10 min a 100 °C. Transcurrido el tiempo, se refrigeraron los tubos en un baño de agua-hielo y se les añadió, en oscuridad, 100 µL de una disolución de meta-fenilfenol o MFF (al 0.15% (m/v) en 0.5% (m/v) de NaOH) sólo a las réplicas tanto de patrones como de las muestras. Se agitaron los tubos y se colocaron en el interior de un armario oscuro para dejar reaccionar, ya que el MFF reacciona con el grupo ácido de las respectivas muestras (UA) dando una coloración violeta. Al cabo de 30 min se leyó la absorbancia de las muestras y de los patrones con un espectrofotómetro UV-visible modelo UV-2401 PC Shimadzu a 520 nm.

Puesto que para cada muestra se hizo un duplicado, y de este duplicado se volvió a realizar un duplicado extra, se obtienen cuatro valores para cada muestra analizada. Esto es debido a que este método no es muy preciso, por lo que se busca una mayor exactitud utilizando un cuadruplicado de cada muestra.

### 3.8. Grado de metilesterificación de las pectinas (DME)

El DME de las pectinas se determinó y analizó mediante el uso de espectroscopía infrarroja o FTIR siguiendo la metodología descrita en Manrique y Lajolo (2002), Pappas et al. (2004) y Kyomugasho et al. (2015).

Para la preparación de la muestra, se recogieron aproximadamente 4 mg de muestra (AIR o FS) moliéndose y homogeneizándose junto a 16 mg de KBr (relación 4:1 con la muestra). Con ayuda de un porta muestras y una prensa hidráulica, se consiguió una pastilla que fue depositada en el instrumento y se analizó mediante espectroscopía FTIR. El espectrofotómetro utilizado fue el modelo Tensor 27 Bruker con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$  (Bruker Corporation, Billerica, MA 01821, United States).

El grado de metilesterificación se cuantificó utilizando las siguientes ecuaciones obtenidas a partir de la metodología descrita en las referencias anteriormente citadas.

$$DME = 127.4R + 2.2013 \quad [\text{Ecuación 1}]$$

$$R = \frac{Abs_{1740}}{Abs_{1740} + Abs_{1630}} \quad [\text{Ecuación 2}]$$

De las ecuaciones anteriores, "R" es un parámetro que se obtiene experimentalmente; "Abs<sub>x</sub>" representa el valor de la señal o de intensidad de absorbancia de las bandas tanto a  $1740\text{ cm}^{-1}$  (Abs<sub>1740</sub>) como a  $1630\text{ cm}^{-1}$  (Abs<sub>1630</sub>).

### 3.9. Propiedades funcionales

Las propiedades funcionales son aquellas propiedades fisicoquímicas características de un compuesto que influyen en la funcionalidad de éstos. En el caso de la planta de Aloe vera, se estudiaron los procesos de hidratación que controlan tanto el hinchamiento como la capacidad que tiene para retener agua, y además la capacidad que tiene para adsorber lípidos, expresado como la capacidad de retención de aceite. Estos procesos se llevaron a cabo en la Universidad Juárez del Estado de Durango, Gómez Palacio, México.

#### 3.9.1. Hinchamiento (Sw)

Para la medida del Sw, se utilizó la metodología descrita por Kuniak y Marchessault (1972) con modificaciones. Una muestra de aproximadamente 0.2 g de AIR se introdujo en una probeta con 10 mL de una disolución tampón de fosfato de sodio 1M a pH 6.2 durante 24 h. El objetivo fue que la muestra y el tampón alcanzaran el equilibrio, que coincide con el máximo hinchamiento posible que la muestra es capaz de alcanzar. Transcurrido el tiempo, se midió el volumen del AIR alcanzado en la probeta.

#### 3.9.2. Capacidad de retención de agua (WRC)

Para precisar la WRC, se determinó como el agua retenida por la muestra de AIR siguiendo la metodología descrita por Thibault et al. (1992). Para ello, se pesaron aproximadamente 0.2 g de muestra de AIR en un Erlenmeyer graduado y se suspendió durante 24 h en un exceso de disolución tampón de fosfato de sodio 1M a pH 6.2. Posteriormente, la suspensión se centrifugó durante 25 min



a 1.750 xg con el objetivo de diferenciar las dos fases (sólida y líquida), que posteriormente se separaron por decantación. La fase sólida, se pesó y se calculó la WRC mediante la diferencia de peso entre la muestra seca y la muestra hidratada.

### 3.9.3. Capacidad de adsorción de aceite (FAC)

Para determinar la FAC, el procedimiento fue muy similar al seguido para determinar la WRC, salvo que, en lugar de utilizar el tampón de fosfato de sodio, las muestras de AIR se sumergieron en aceite de girasol durante 24 h. Posteriormente se separaron mediante centrifugación (25 min a 1.750 xg) y se procedió a su decantación. La fase sólida fue pesada y se calculó la FAC mediante la diferencia de peso entre la muestra seca y la muestra que contenía el aceite retenido.

### 3.10. Grado de acetilación del Acemanano

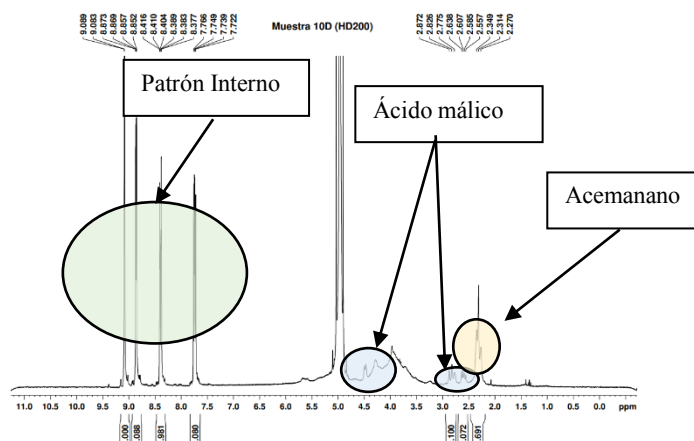
El grado de acetilación del acemanano se determinó mediante el uso de Resonancia Magnética Nuclear acorde con la metodología detallada por Bozzi et al. (2007).

Para la preparación de la muestra, se recogieron aproximadamente 2 mg de muestra de la fracción soluble junto con 2 mg de patrón interno (nicotinamida) en un vial de manera que la relación sea 1:1 con la muestra. A la mezcla se le añadió 1 mL de agua deuterada (99.9%) y se consiguió disolver todo el material mediante la ayuda de un vórtex. Una vez las muestras fueron disueltas en el vial, se traspasaron a tubos Wildman Economic 5 mm para RMN y se procedió al análisis. Los espectros de  $^1\text{H-NMR}$  fueron registrados en el espectrómetro Bruker Avance 300 (Bruker Corporation, Billerica, MA 01821, United States), equipado con una sonda de gradiente Z multinuclear de banca ancha de 5 mm.

El grado de acetilación fue cuantificado utilizando las siguientes ecuaciones obtenidas a partir de la metodología descrita por Minjares-Fuentes et al. (2017):

$$DA = \left( \frac{A_{\text{processed}}}{A_{\text{reference}}} \right) \cdot 100 \quad [\text{Ecuación 3}]$$

En la ecuación anterior, “DA” implica “degree of acetylation”, que corresponde al grado de acetilación de la muestra; “ $A_{\text{processed}}$ ” hace referencia al área de la señal del acemanano y “ $A_{\text{reference}}$ ” hace referencia al área de la señal del primer pico significativo del patrón interno.



**Figura 3.** Asignación de señales en espectros de resonancia magnética nuclear de las muestras.

En la figura 3, mencionada en el apartado de materiales y métodos, se pueden observar las señales de resonancia de las especies que predominan en las muestras de fracción soluble. Las cuatro señales que aparecen a campo bajo, entre 7.5 y 9.0 ppm corresponden a la señal del patrón interno (nicotinamida).



Las muestras de Aloe vera se caracterizan por tener un pH ligeramente ácidos, por lo que las señales del ácido málico aparecen también en el espectro entre 2.5 y 4.5 ppm. La señal que se observa a campo más bajo es la señal del acemanano, que aparece aproximadamente a 2.4 ppm.

### 3.11. Estudio y análisis estadístico

Los resultados han sido analizados siguiendo un sistema de varianza utilizando un test Fisher LSD con un valor de significancia 0.05, donde se comprueba la homocedasticidad y/o heterocedasticidad de las muestras. Posteriormente fueron nuevamente analizados mediante una prueba t para muestras emparejadas suponiendo varianzas iguales o desiguales. Finalmente se crean dos hipótesis:  $H_0$ , donde se asume que los promedios de las muestras no son significativamente diferentes ( $\overline{x_{HD}} = \overline{x_{HA}}$ ); y  $H_1$ , donde los promedios de las muestras difieren significativamente ( $\overline{x_{HD}} \neq \overline{x_{HA}}$ ). Si el valor experimental es inferior al valor crítico, se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ ) y si el valor experimental es superior al valor crítico, se rechaza la hipótesis nula y se acepta  $H_1$ . El análisis estadístico se ha llevado a cabo utilizando una extensión de análisis de datos en las hojas de cálculo.

## 4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

---

### 4.1. Residuo insoluble en alcohol (AIR)

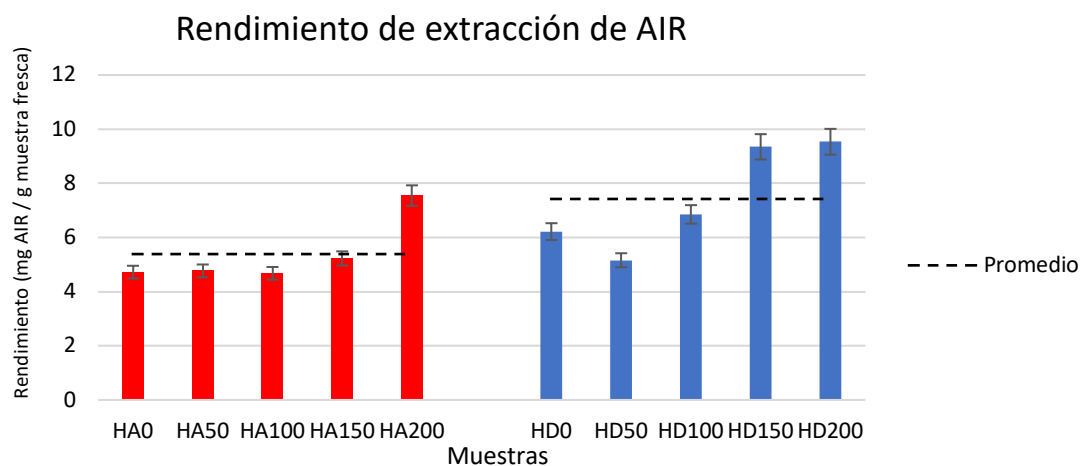
A partir de un estudio exhaustivo de los AIRs es posible determinar la composición química de principales polisacáridos presentes en la muestra, tanto los que forman parte de la pared celular del Aloe vera como aquellos cuya función principal es la de reserva energética. Por otra parte, los AIRs también permiten determinar las principales propiedades funcionales derivadas del conjunto de polisacáridos presentes en las células de la planta de Aloe vera.

#### 4.1.1. Rendimiento de extracción del AIR

Los rendimientos de extracción de los AIRs (expresados en base fresca) correspondientes a las muestras de Aloe vera, dependiendo de su régimen de riego y de la salinidad aplicada al riego, se muestran en la figura 4.

Como se puede observar, el rendimiento de las muestras adquirió valores desde 4.7 mg AIR/g muestra fresca (HA100) hasta los 9.5 mg AIR/g muestra fresca (HD200). Los promedios entre regímenes hídricos variaron, obteniéndose un valor de 5.4 mg AIR/g muestra fresca en el caso de las muestras sometidas a una hidratación abundante; y un valor de 7.4 mg AIR/g muestra fresca en el caso de las muestras que experimentaron un déficit de hidratación, siendo las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Resultados análogos fueron observados por Femenia et al. (2003) y Minjares-Fuentes et al. (2016), quienes detectaron diferencias significativas en los rendimientos de los AIRs para distintos ejemplares de Aloe vera sometidos a diferentes condiciones de riego. Sin embargo, en los resultados obtenidos por Hazrati et al. (2017), el déficit hídrico no fue determinante en el rendimiento de los AIRs, sino que éste se vio afectado por el uso de zeolitas.



**Figura 4.** Rendimiento de los AIR de las muestras de Aloe vera en diferente régimen de hidratación y salinidad.

Por otra parte, en la figura 4, en general, también puede observarse como, independientemente del régimen hídrico al que las plantas han sido sometidas, a medida que la salinidad aumenta también lo hace el rendimiento de los AIRs. En concreto, si se comparan las muestras con valores de salinidad 0 mM y salinidad 200 mM, se observa un aumento del 53.4% para las muestras sometidas a un régimen de deshidratación (HD) y de un 59.9% para las muestras que han experimentado una hidratación abundante. Esos valores indican que el aumento de la salinidad favorece los rendimientos de extracción de los AIRs, siendo los incrementos similares para los dos regímenes de hidratación aplicados en este estudio ( $p > 0.05$ ).

#### 4.2. Polisacáridos de la pared celular

Las muestras de AIR contienen todos los polisacáridos presentes en las muestras de Aloe vera, tanto los polímeros que forman la pared celular, considerados como fibra alimentaria, como los polisacáridos de reserva (Femenia et al., (1999)). Los polisacáridos están formados mediante una agrupación de azúcares, que son las unidades básicas denominados monómeros, unidas mediante enlaces glucosídicos. A partir de la hidrólisis realizada, se pudo determinar el contenido individual de cada uno de los azúcares que forman los diferentes polisacáridos, mediante cromatografía de gases. Los resultados obtenidos, expresados en forma de mg de azúcar por g de AIR, se muestran en la tabla 1.

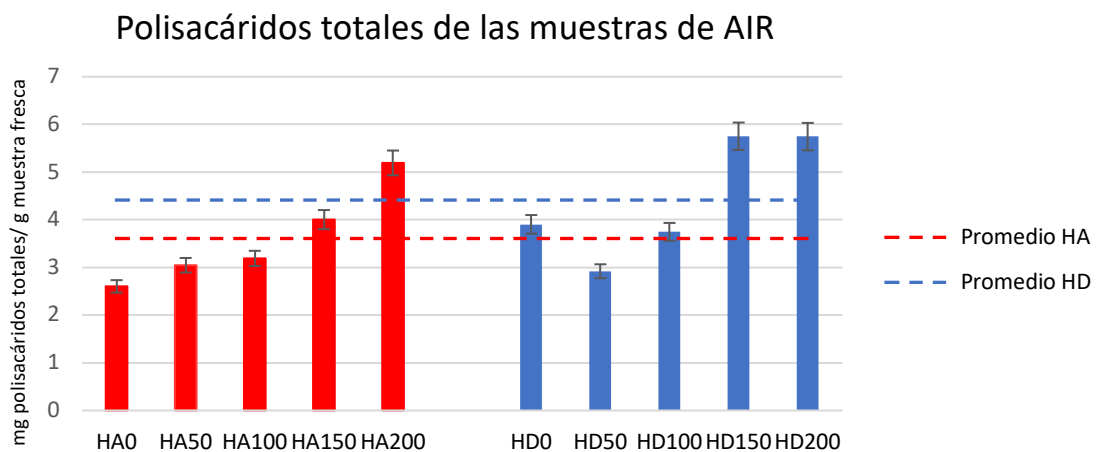
**Tabla 1.** Composición de azúcares de las muestras de residuo insoluble en alcohol (AIR).

		mg azúcar / g de AIR							
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA
HA	0	1.8±0.2	3.6±0.3	6.9±0.1	23.9±0.2	129.7±1.5	26.2±1.2	97.7±2.8	261.9±69.4
	50	2.0±0.7	4.0±1.1	7.6±0.2	28.6±0.9	131.5±1.5	34.6±1.0	98.6±4.5	332.4±21.7
	100	1.9±0.6	3.4±0.5	7.1±0.8	23.8±0.3	138.8±2.7	34.9±0.8	104.9±0.9	367.3±18.7
	150	1.8±0.2	3.6±0.4	7.4±0.7	29.3±0.7	122.6±0.8	62.4±3.9	112.7±0.4	426.2±12.0
	200	2.0±0.3	3.5±0.3	6.8±0.4	24.4±0.3	153.2±3.4	62.0±3.0	99.1±2.2	336.9±29.1
HD	0	1.3±0.1	3.6±0.4	7.2±0.7	22.9±0.1	123.4±0.4	26.0±0.3	91.8±3.3	351.8±24.0
	50	1.8±0.0	3.7±0.9	7.5±0.3	26.7±1.3	127.1±0.3	45.6±1.9	109.3±12.7	244.4±27.0
	100	2.0±0.3	2.9±1.1	8.0±0.9	29.4±0.2	94.0±8.9	66.6±7.8	110.0±7.2	234.1±24.7
	150	1.8±0.0	3.3±0.1	6.9±0.2	25.1±2.4	157.7±0.7	55.8±4.8	116.4±13.7	248.3±68.2
	200	1.6±0.2	2.5±0.2	6.8±0.4	23.0±1.3	165.4±4.6	52.9±4.2	123.6±13.8	226.6±40.0

Rha: ramnosa, Fuc: fucosa, Ara: arabinosa, Xyl: xilosa, Man: manosa, Gal: galactosa, Glc: glucosa y UA: ácidos urónicos

En general, los resultados indican una presencia mayoritaria de polisacáridos pécticos o pectinas. Este hecho puede deducirse a partir de la elevada cantidad detectada de ácidos urónicos y, en concreto, de ácido galacturónico (Femenia et al. (1999)); por otra parte la ramnosa, arabinosa y galactosa, aunque fueron detectados en menores cantidades en comparación a los valores de ácidos urónicos, también forman parte de las pectinas. Además de la presencia de polisacáridos pécticos, se detectaron importantes cantidades de glucosa y de manosa. En el caso de la manosa, este hecho se debe a que este monosacárido es uno de los principales componentes del principal polisacárido de reserva de la planta de Aloe vera, el acemanano (Femenia et al. (2003)). El 90% de la glucosa detectada tiene su origen en la celulosa, se trata de un polímero estructural formado únicamente por glucosa. El resto de azúcares detectados en las muestras, en particular fucosa y xilosa, indican la presencia de pequeñas cantidades de hemicelulosas.

A partir de la concentración de los azúcares detectados en los AIRs se pudo determinar la cantidad total de polisacáridos presentes en las muestras de AIR. En la figura 5 se muestran los mg totales de polisacáridos por g de muestra fresca, dependiendo de la hidratación y salinidad de las muestras.



**Figura 5.** Contenido total de polisacáridos en las muestras de AIR de la planta de Aloe vera dependiendo de la salinidad y la hidratación.

Como se puede observar en la figura 5, los promedios del total de polisacáridos presentes en las muestras con hidratación abundante y en las muestras con déficit hídrico fueron de 3.6 mg polisacáridos/g muestra fresca y de 4.4 mg polisacáridos/g muestra fresca, respectivamente. Estas diferencias son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) para los dos tipos de riego.

En general, los polisacáridos presentes en las muestras de AIR analizadas representaron entorno al 65-70% del material obtenido. Estos resultados son similares a los obtenidos en los trabajos de Femenia et al. (1999), donde los valores promedio de carbohidratos en las muestras de Aloe vera se situaron alrededor del 70% del contenido del AIR y de Femenia et al. (2003), donde el valor se situó alrededor del 63%; ambos valores son comparables a los valores determinados en este trabajo.

El elevado contenido en carbohidratos de las fracciones sólidas derivadas de la Aloe vera explican su uso como complemento alimenticio, donde los geles de aloe son incorporados a las dietas, siendo un gran sustituyente de los tradicionales cereales sin generar rechazos o carencias en parámetros de calidad del tejido muscular del individuo (Quirós-Pozo et al., (2021)).

#### 4.2.1. Polisacáridos estructurales

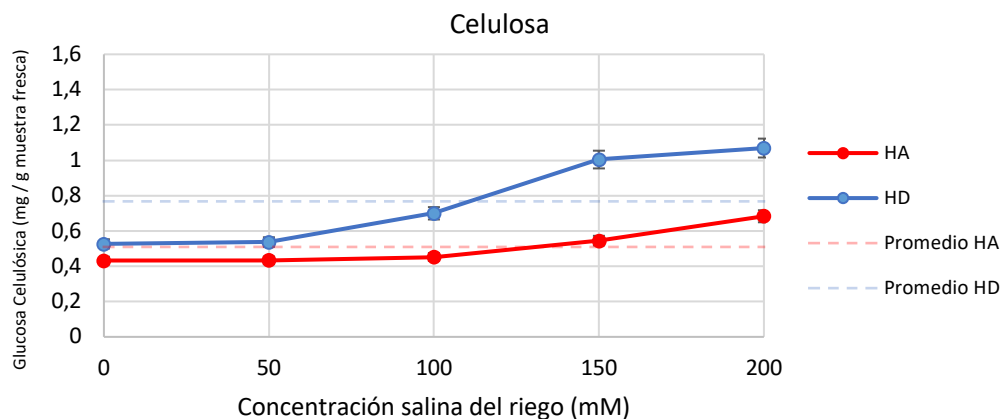
Los polisacáridos estructurales son aquellos que se encargan de dar forma, rigidez y turgencia a la célula. En este grupo, cabe destacar la celulosa.

##### A) Celulosa

La celulosa es el polímero estructural por excelencia en plantas y/o vegetales (Franz, Blaschek (1990)), compuesto por unidades básicas de glucosa unidas mediante enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 (Kumar Gupta et al. (2019)).

Aunque la mayor parte de la glucosa detectada en los AIRs se trata de glucosa celulósica, también existe una pequeña parte que forma parte del polisacárido de reserva, acemanano. Para la diferenciación entre la glucosa estructural y la glucosa perteneciente al acemanano, las cantidades de glucosa detectada en las muestras de la fracción soluble de los AIRs se sustrajeron al contenido total de glucosa de las muestras de AIR. Esta estimación implica que la glucosa de origen celulósico se obtiene mediante la diferencia entre la glucosa obtenida mediante la hidrólisis Saeman (1954) y la hidrólisis, llevada a cabo en condiciones más suaves, para las muestras de las fracciones solubles (Femenia et al. (2003)).

En la figura 6, se muestra el contenido en celulosa de las diferentes muestras analizadas, expresado en mg de celulosa por g de muestra fresca:



**Figura 6.** Contenido de celulosa en las muestras de Aloe vera dependiendo de la salinidad de riego y de la hidratación (HA: hidratación abundante; HD: hidratación deficitaria).

Como puede observarse en la figura 6, las muestras sometidas a un déficit de riego presentaron valores de celulosa más elevados respecto a las muestras sometidas a un régimen de hidratación abundante. Además, en ambos tipos de muestras, se observó como el contenido de celulosa aumentó de forma muy significativa para las muestras tratadas con déficit de hidratación ( $p < 0.05$ ), existiendo un incremento del 103% frente al valor inicial. Este incremento fue del 58% para las muestras tratadas con hidratación abundante. El aumento, en ambos casos, puede ser atribuido al aumento de la salinidad.

Estos resultados están en concordancia con los resultados observados por Le Gall et al. (2015), donde se asume que el aumento de la síntesis de celulosa se debe a la necesidad de la planta de mantener la integridad de la pared celular, así como la turgencia, permitiendo un crecimiento celular continuo bajo condiciones de estrés hídrico. Sin embargo, en estudios con diversos alimentos (Zhou et al. (2011) y

Sudachkova et al. (2002)), no observaron cambios significativos en el contenido de celulosa. Y contrariamente a las dos posturas anteriores, Moore et al. (2008), aseguraron que bajo una influencia de estrés hídrico, el contenido de la glucosa celulósica puede disminuir de forma significativa en comparación con los valores determinados para muestras tratadas sin ningún tipo estrés hídrico.

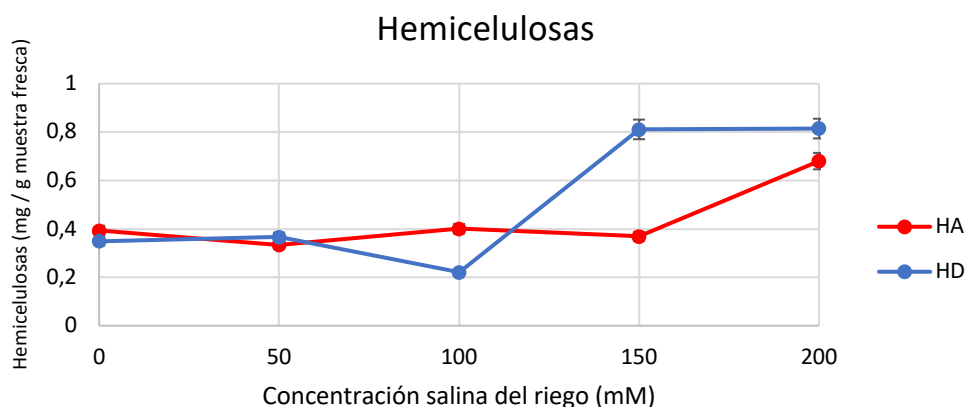
#### 4.2.2. Polisacáridos matriciales

Los polisacáridos matriciales son aquellos cuya función es la de unirse con los polisacáridos estructurales dando consistencia a la pared celular. Los principales tipos de polisacáridos matriciales presentes en la Aloe vera son las hemicelulosas y las pectinas.

##### A) Hemicelulosas

Las hemicelulosas son un tipo de polisacáridos, altamente ramificados, constituidos principalmente por xilosa, manosa, fucosa y glucosa (Femenia et al. (1999)). Los principales tipos de polisacáridos que integran esta fracción son los xilanos, xiloglucanos y mananos.

En la figura 7 se observa el contenido total de hemicelulosas (espresadas en base fresca) presentes en las diferentes muestras Aloe vera, tratadas bajo diferentes regímenes hídricos.



**Figura 7.** Contenido total de hemicelulosas por unidad de muestra fresca dependiendo de la salinidad de riego y de la hidratación (HA: hidratación abundante; HD: hidratación deficitaria).

En la figura 7 puede observarse el comportamiento del total de las hemicelulosas presentes en los AIRs, a medida que aumenta la salinidad del agua de riego para los dos tipos de hidratación aplicados.

En general, los resultados obtenidos en este trabajo para las hemicelulosas son muy similares a los publicados en Femenia et al. (2003) y Rodríguez-González et al. (2011), donde el porcentaje de hemicelulosas presentes en las muestras de Aloe vera se encuentra entre un 10-15% del total de polisacáridos de la pared celular.

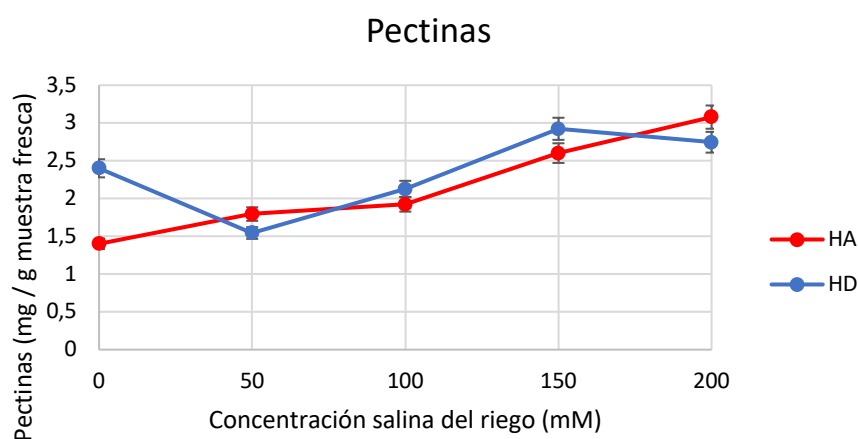
Como puede observarse en la figura 7, las muestras sometidas a hidratación abundante (HA) mostraron un comportamiento lineal y solo experimentaron un aumento significativo cuando se aplicó una salinidad de 200 mM. En cambio, para las muestras sometidas a un déficit de hidratación (HD), este aumento se produjo a partir de una salinidad de 150 mM. Comparando ambos regímenes, para un mismo valor de salinidad, sólo las muestras con salinidad 150 mM, mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

## B) Pectinas

Las pectinas están formadas por un conjunto de polisacáridos muy complejos, los cuales pueden presentar elevados índices de ramificación. Este grupo, predominante en las muestras de Aloe vera analizadas, está formado principalmente por ácido galacturónico, y en menor medida por ramnosa, arabinosa y galactosa.

Se trata de un compuesto bioactivo con numerosas propiedades beneficiosas para la salud, entre ellas destaca su capacidad de actuación como compuesto antitumoral (Gunning et al. (2009)). También se atribuyen propiedades de regeneración de tejidos, y debido a la importante concentración de pectinas que presenta la planta de Aloe vera, se entiende que sea una de las especies más utilizadas en medicina regenerativa (Gentilini et al. (2014)).

En la figura 8, se presentan los contenidos totales de pectinas (expresados en base fresca) detectadas en las diferentes muestras de Aloe vera analizadas.



**Figura 8.** Gráfico de concentración de pectinas en las muestras de AIR de Aloe vera dependiendo de la salinidad de riego y de la hidratación (HA: hidratación abundante; HD: hidratación deficitaria).

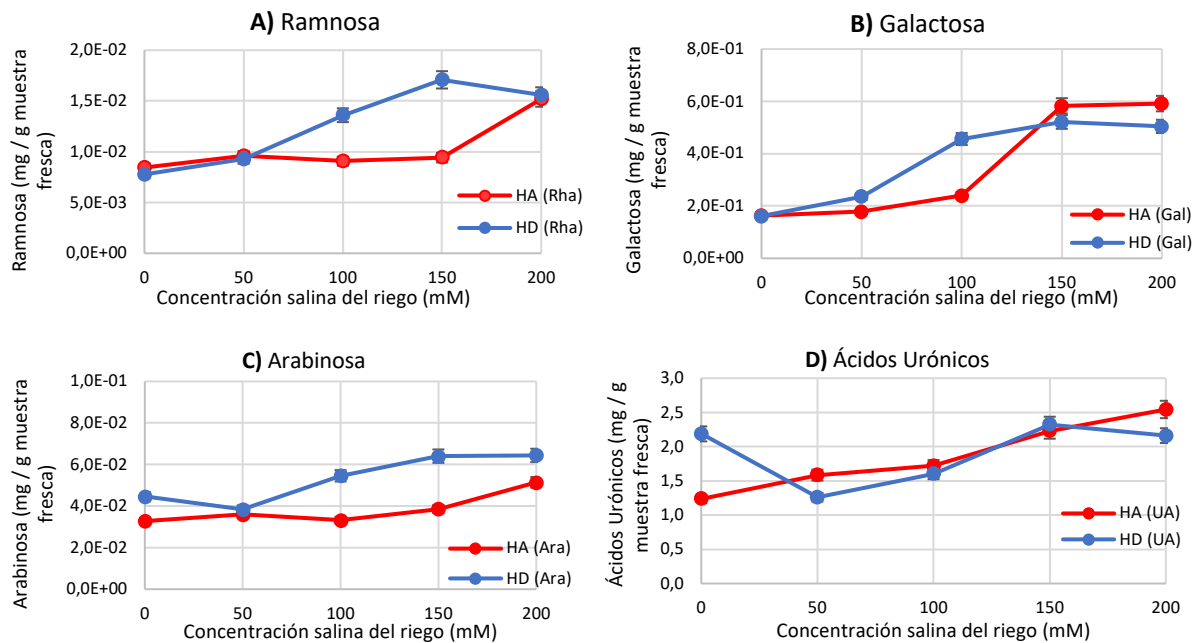
Las pectinas fueron el grupo de polisacáridos predominante en las muestras de Aloe vera, representando en torno al 36% del total de polisacáridos, independientemente del tipo de hidratación y del grado de salinidad aplicado.

En la figura 8, se observa cómo, en general, para ambos tipos de riego, el contenido total de pectinas por g de muestra fresca aumentó a medida que se incrementó el contenido salino. Por otra parte, excepto para las muestras HA0 y HD0, para un mismo grado de salinidad, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las muestras tratadas con riego abundante y las muestras con déficit de riego. La muestra que mayor concentración presentó fue la muestra HA200, con una concentración de 3.1 mg pectinas/g muestra fresca.

A continuación, en la figura 9, se muestran los contenidos individuales de los principales azúcares que forman las pectinas presentes en las diferentes muestras de Aloe vera.

En las diferentes gráficas de la figura 9, se puede observar, como en general, un comportamiento creciente de la concentración individual de cada monosacárido se corresponde con un aumento de la concentración de sal en el agua de riego. Esta observación apoya la hipótesis de Moore et al. (2008), quienes atribuyen este hecho a la formación de uniones, tipo covalente y/o no covalente, de las

pectinas con otros polisacáridos de la pared celular, de forma que se garantiza la integridad de la pared celular ante posibles factores externos.



**Figura 9.** Contenido de los principales azúcares que forman las pectinas presentes en las muestras de AIR de Aloe vera. A) Contenido de ramnosa por g de muestra fresca; B) Contenido de galactosa por g de muestra fresca; C) Contenido de arabinosa por g de muestra fresca; D) Contenido de ácidos urónicos por g de muestra fresca.

En las figuras 9A, 9B y 9C puede observarse el comportamiento del contenido total de ramnosa, galactosa y arabinosa, respectivamente, a medida que cambia la salinidad del agua de riego para ambos regímenes de hidratación. En todas las gráficas se observa una tendencia general que corresponde a un aumento de la cantidad de azúcar a medida que aumenta la salinidad, independientemente del tipo de riego aplicado. No obstante los valores de estos azúcares son muy bajos en comparación con la cantidad de ácidos urónicos presentes en cada una de las muestras.

Cabe destacar en la figura 9D, que el porcentaje de ácidos urónicos que presentan las pectinas de la Aloe vera se sitúa en torno al 87%, valor semejante al 90% determinado por Alvarado-Morales et al. (2019). La predominancia de este azúcar explica que la gráfica 9D presente un comportamiento idéntico al mostrado en la figura 8 para el conjunto de pectinas.

Por tanto, los resultados obtenidos indican que el gradiente salino ejerce una notable influencia sobre la generación de pectinas por parte del Aloe vera, independientemente del régimen de hidratación aplicado en este estudio.

### *Características estructurales de las pectinas*

Las principales características estructurales de las pectinas, es decir la linealidad y la presencia de ramificaciones, se determinaron haciendo uso de los parámetros descritos por Umaña et al. (2019). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2.

En general, se puede observar cómo los valores correspondientes al parámetro GalA/(Rha+Ara+Gal), el cual determina la linealidad de las pectinas, disminuyen a medida que el contenido salino aumenta para ambos regímenes hídricos. Por tanto, los resultados indican que las muestras de Aloe vera sometidas a elevados gradientes salinos, independientemente de la abundancia o déficit de riego aplicado, presentan pectinas más ramificadas

En cuanto a la presencia de rahmogalacturonanos del tipo I (RG-I), los valores obtenidos para el parámetro GalA/Rha, excepto para las muestras HD0 y HA150, sugieren que no existen grandes diferencias entre las muestras analizadas.

En cuanto a la longitud aproximada del tipo de pectinas RGI, determinada por el parámetro (Gal+Ara)/Rha; se observa en general, para ambos regímenes hídricos aplicados, un aumento a medida que la salinidad también se incrementa.

**Tabla 2.** Características estructurales de las pectinas.

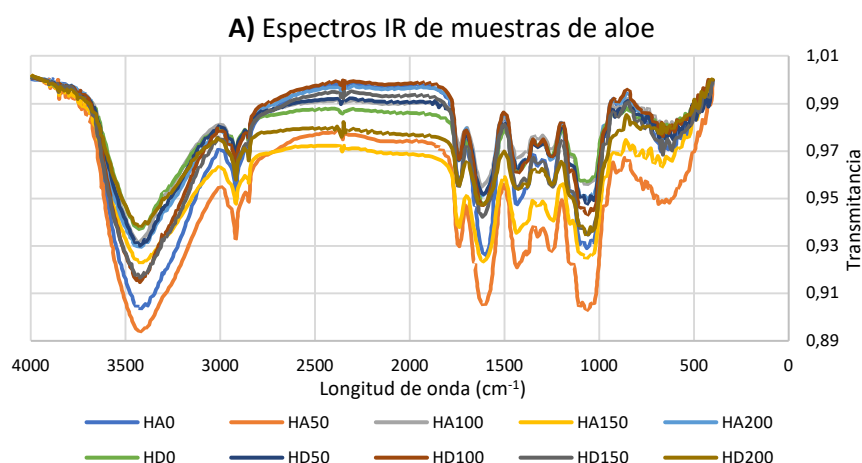
		$\frac{\text{GalA}}{(\text{Rha}+\text{Gal}+\text{Ara})}$	$\frac{\text{GalA}}{\text{Rha}}$	$\frac{(\text{Gal}+\text{Ara})}{\text{Rha}}$
HA	0	6.0±0.3	146.4±7.3	23.2±1.2
	50	7.1±0.4	165.3±8.3	22.4±1.1
	100	6.1±0.3	189.4±9.5	30.0±1.5
	150	3.5±0.2	236.5±11.8	66.0±3.3
	200	3.9±0.2	167.4±8.4	42.3±2.1
HD	0	10.2±0.5	281.4±14.1	26.5±1.3
	50	4.5±0.2	135.8±6.8	29.5±1.5
	100	3.1±0.2	117.9±5.9	37.6±1.9
	150	3.9±0.2	135.9±6.8	34.3±1.7
	200	3.7±0.2	138.8±6.9	36.5±1.8

*Rha: ramnosa, Ara: arabinosa, Gal: galactosa, y GalA: ácido galacturónico*

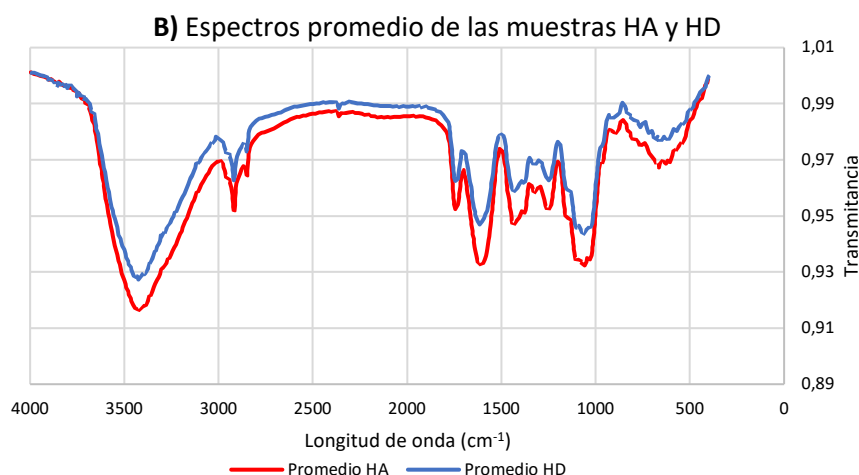
Como conclusión, se puede observar cómo ninguno de los tres parámetros analizados parece estar afectado por el régimen hídrico de la planta; sin embargo, el contenido salino aplicado si ejerce una notable influencia sobre los valores de estos parámetros.

#### Grado de metilesterificación de las pectinas (DME)

Finalmente, se determinó el DME de las pectinas mediante espectroscopía infrarroja (FTIR). Los espectros de infrarrojo de los AIRs de las muestras de Aloe vera se muestran en la figura 10A.



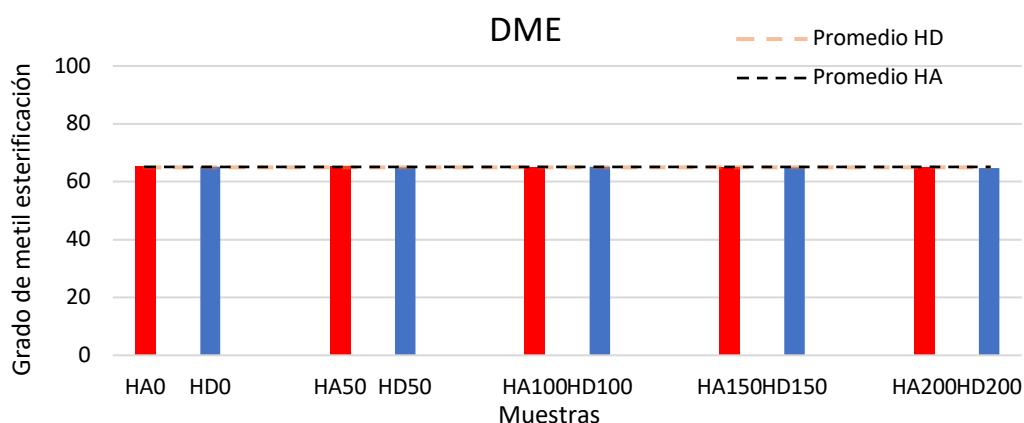




**Figura 10.** Espectros infrarrojo de las muestras de AIR de Aloe vera: A) Espectros individuales para cada muestra y B) Espectros promedio para cada tipo de riego (HA y HD)

Como se observa en las figuras 10A, los espectros de todas las muestras fueron similares, siendo la intensidad de señal la única variación observada. En la figura 10B aparecen los espectros promedio para el conjunto de las muestras con un mismo tipo de riego, mostrando también el mismo tipo de bandas para ambos regímenes hídricos.

A partir de los espectros obtenidos se determinó el DME para cada una de las muestras. Los resultados se muestran en la figura 11.



**Figura 11.** Grado de metilesterificación de las pectinas.

Como puede observarse de forma clara, las muestras no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) para ninguna de las dos variables estudiadas en este trabajo. El DME medio, considerando todas las muestras, se situó en torno al 65%, de ahí que los polisacáridos pécticos presentes en todas las muestras de Aloe vera analizadas puedan clasificarse como pectinas de alto grado de metilación (HMP) (Hosseini et al. (2016)).

Estos resultados contrastan con los valores obtenidos por Minjares-Fuentes et al. (2017), para el DME de las pectinas de diferentes muestras de Aloe vera que se situaron entorno al 19%; aunque presentan mayor similitud con los resultados obtenidos por Rodríguez-González et al. (2011), quienes obtuvieron valores del DME para pectinas de Aloe vera comprendidos entre el 43 y el 51%.

Considerando el conjunto de polisacáridos de la pared celular, se puede concluir que las variables de hidratación y salinidad no han sido determinantes en el caso de las hemicelulosas, aunque sí se han

observado diferencias significativas en el caso de la celulosa, donde las muestras sometidas a déficit hídrico presentaron una mayor concentración respecto a las muestras tratadas con riego abundante. En el caso de las pectinas, aunque en general, los regímenes de riego, déficit o abundancia, no afectaron ni al contenido ni a las características de las pectinas, ambos factores si se vieron influenciados de forma significativa por el gradiente salino aplicado en cada uno de los tratamientos.

#### 4.3. Fracciones solubles (FS): aislamiento del acemanano

Las fracciones solubles están constituidas mayoritariamente por aquellos polisacáridos que no forman parte de la pared celular y, que por tanto, se encuentran principalmente en el interior de la célula. Este es el caso del acemanano, un polisacárido de reserva o almacenamiento presente en el citoplasma de las células parenquimáticas del gel de Aloe vera.

##### 4.3.1. Polisacárido de reserva: acemanano

A continuación, en la tabla 3 se presenta el contenido de azúcares del acemanano presente en las diferentes fracciones solubles obtenidas a partir de los AIRs.

Tabla 2: *Composición de azúcares de las fracciones solubles (FS).*

		mg azúcar/g AIR		
		Man	Gal	Glc
HA	0	73.8±10.0	2.1±0.6	6.1±1.2
	50	94.1±20.8	3.0±0.5	7.6±0.5
	100	80.3±8.8	2.6±0.1	8.2±0.4
	150	84.9±4.6	3.3±0.7	8.4±0.9
	200	91.0±5.9	2.0±0.3	8.6±0.9
HD	0	93.93±24.8	2.2±0.3	7.1±1.2
	50	86.5±43.3	2.1±1.3	5.2±3.2
	100	96.9±30.1	3.4±1.1	7.8±1.7
	150	99.4±19.1	2.1±0.6	8.9±1.6
	200	105.5±12.7	3.1±0.0	11.5±0.4

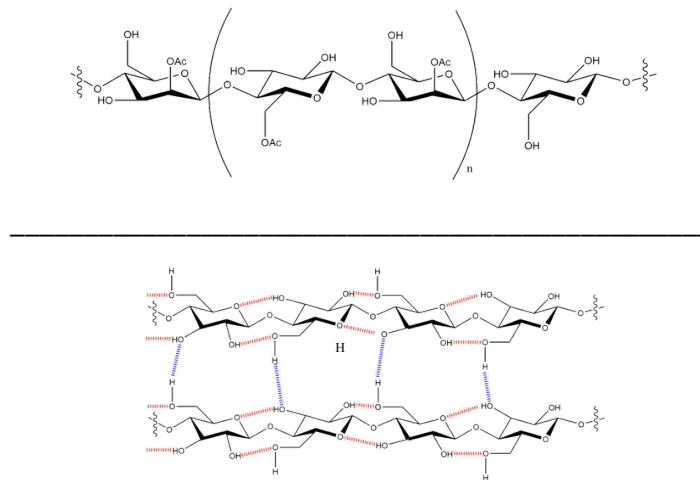
Man: manosa, Gal: galactosa y Glc: glucosa

Como puede observarse, todas las muestras se caracterizan por la presencia predominante de la manosa, seguido por cantidades menores de glucosa y galactosa. Estos resultados son análogos a los obtenidos en Femenia et al. (2003) o Kumar and Kumar (2019), quienes reportaron que la manosa supone entre el 82 y el 85% del conjunto de monosacáridos que componen el acemanano.

Los resultados obtenidos indican que los polisacáridos que forman la pared celular, tanto estructurales como matriciales, no han logrado solubilizarse en la FS. Sin embargo, el acemanano, debido a que la estructura de las propias cadenas de este polímero impide una coordinación mayor entre las diferentes cadenas debido a restricciones estéricas (cosa que no ocurre en la celulosa), hace que la interacción con el agua sea factible y, por lo tanto, aumente su solubilidad. Esta observación concuerda con los resultados de solubilidad en agua obtenidos por Nema et al. (2018).

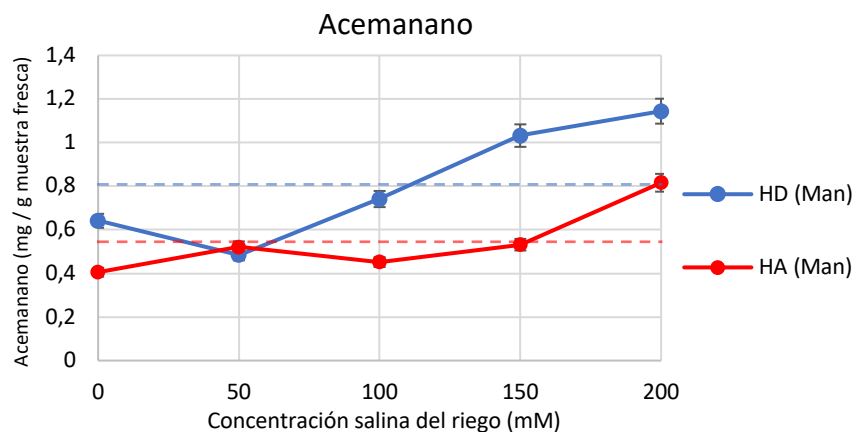
A continuación, en la figura 12 se muestran las configuraciones tanto de la celulosa como del acemanano, de forma que se observa como la celulosa no tiene impedimento para establecer una mayor coordinación entre varias cadenas del mismo polímero, mientras que las cadenas de acemanano sí, principalmente debido a los grupos acetilo que presenta su estructura; por ese motivo

interacciona con el agua y no se coordinan las cadenas, aumentando la insolubilidad como ocurre en el caso de las microfibras de celulosa.



**Figura 12.** En la parte superior, cadena de polisacáridos formada por manosa acetilada. En la parte inferior, doble cadena de celulosa presentando interacciones intracatenarias (rojas) e intercatenarias (azules).

Por otra parte, en la tabla 1, puede observarse como las muestras siguen varios patrones: por ejemplo, las muestras que han estado sometidas a déficit hídrico tienen mayor concentración de manosa en comparación con las muestras que han estado en hidratación abundante. Este hecho se observó en diferentes trabajos en los cuales se estudió la influencia de este parámetro hídrico (Femenia et al. (1999), Minjares et al. (2017)). El fenómeno observado puede atribuirse a que, cuando la planta sufre un estrés hídrico, ésta presenta una necesidad de almacenar de agua para mantener sus niveles de hidratación constantes. Sin embargo, las plantas que han sido hidratadas de forma abundante, no tienen la misma necesidad, ya que consiguen mantener el nivel de hidratación de forma externa y de manera habitual. Para ello, el polisacárido que tiene la función de reserva de agua, el acemanano, aumenta en concentración a medida que la planta experimenta condiciones de sequía.



**Figura 13.** Concentración de acemanano en las muestras de fracción soluble de Aloe vera.

La figura 13 muestra la concentración de acemanano, expresada en base fresca, para todas las muestras de Aloe vera analizadas. Los valores promedio que adoptan las muestras dependiendo de su régimen de hidratación son de 0.80 mg acemanano/g muestra fresca para las muestras en déficit hídrico y de 0.54 mg acemanano/g muestra fresca para las muestras de abundante riego.

Por otra parte, en general, se observa un aumento también de la concentración de manosa a medida que aumenta el contenido salino en cada uno de los regímenes de riego. Volviendo a la hipótesis anterior, las muestras que experimentan una mayor deshidratación generan más acemanano, por lo cual no es de extrañar que las muestras sometidas a mayor salinidad en el riego también presenten una mayor concentración de acemanano, como mecanismo protector de la planta que permita atenuar una posible deshidratación. En el caso de las muestras de Aloe vera, la sal retiene parte del agua de riego y, por lo tanto, puede provocar una mayor deshidratación.

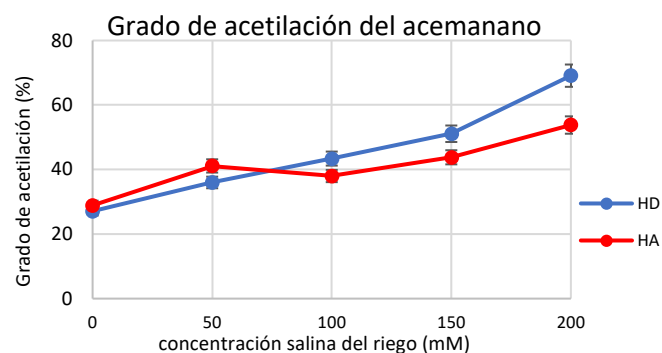
Desde un punto de vista cuantitativo, se observa como la producción de acemanano, a medida que la salinidad de riego aumenta, se incrementa en aproximadamente un 100% para las muestras con hidratación abundante y en un 79% para las muestras con déficit hídrico. Además, comparando muestras con un mismo grado de salinidad, por ejemplo HA200 vs. HD200, se observa como la producción de acemanano aumenta en un 40% en las muestras que se encuentran en déficit hídrico respecto a las muestras con hidratación abundante. Finalmente, si se comparan muestras con valores extremos, por ejemplo HA0 vs. HD200, vemos como la producción de acemanano aumenta en un 182% en la muestra HD200 en comparación con la muestra HA0.

Estos resultados ponen de manifiesto la importancia tanto del tipo de riego como de la salinidad aplicada para la obtención de plantas de Aloe vera con elevados contenidos de acemanano.

#### 4.3.2. Grado de acetilación (DA) del acemanano

La acetilación del acemanano mejora la viscosidad y la estabilidad térmica del polisacárido (Kumar and Kumar (2019)). Además, la acetilación afecta a la bioactividad y a las propiedades físicas del propio acemanano (tales como la solubilidad e hidrofobicidad) y por otra parte, la desacetilación de éste polímero desempeña un papel crucial en la pérdida de su actividad biológica de acuerdo con los estudios realizados por Chokboribal, et al. (2015).

Por tanto, el DA del acemanano puede considerarse como un buen indicador de la calidad del acemanano presente en las muestras de Aloe vera; de forma, que a medida que el grado de acetilación aumenta, también lo hace la calidad de la muestra (Bozzi et al. (2007), Minjares-Fuentes et al. (2017)).



**Figura 14.** Grado de acetilación del acemanano presente en las muestras de fracción soluble de Aloe vera

Como puede observarse en la figura 14, los valores del DA obtenidos para las muestras de Aloe vera presentaron importantes diferencias en función del tratamiento de riego aplicado. En el caso de las muestras tratadas en régimen de estrés hídrico, el DA tomó valores comprendidos entre el 27.1% y el 69.1%; mientras que, en las muestras en régimen de hidratación abundante, el RDA se situó en el rango comprendido entre el 20.4% y el 53.8%. Para ambos regímenes (HD y HA) se observó una tendencia

similar, en concreto. el DA aumentó a medida que lo hacía la concentración salina aplicada. Cabe destacar que, excepto para la concentración salina 200 mM, para una misma concentración salina las diferencias entre los valores de los DA determinados para ambos regímenes de hidratación no fueron significativas ( $p > 0.05$ ).

Por lo tanto, los resultados indican que, independientemente del tipo de riego aplicado, la calidad del acemanano producido por la Aloe vera aumenta a medida que se incrementa la salinidad del riego. En particular, a medida que la salinidad aumenta (desde 0 hasta 200 mM), el DA del acemanano aumenta en un 86% para las muestras con hidratación abundante y hasta en un 155% para las muestras con déficit de hidratación. Además, si se comparan los valores del DA para la concentración salina de 200 mM, se observa un incremento del 28% en las muestras de HD frente a las muestras de HA.

Estos resultados indican de forma clara la gran influencia que ejercen las condiciones de riego, tanto de hidratación y en particular de salinidad, sobre la calidad del acemanano producido por la planta Aloe vera.

#### 4.4. Propiedades funcionales

Las propiedades funcionales que se le atribuyen a cualquier material vegetal rico en polisacáridos dependen tanto del tipo de polisacáridos que la forman como, de la disposición espacial en la que éstos se colocan y enlazan entre sí (Jarvis (2011)). Por tanto, las modificaciones tanto físicas como químicas que puedan experimentar los polímeros pueden tener una gran influencia en las propiedades funcionales relacionadas bien con la hidratación, tales como el hinchamiento (Sw) y la capacidad de retención de agua (WRC), o bien con la adsorción de moléculas orgánicas, como por ejemplo la capacidad de adsorción de lípidos (FAC) (Thibault et al. (1992)).

Por tanto, en este estudio, se evaluó la posible influencia tanto del diferente régimen de hidratación como del gradiente salino aplicado sobre las propiedades funcionales, derivadas del conjunto de polisacáridos presentes en la Aloe vera.

##### 4.4.1. Hinchamiento (Sw)

Los valores correspondientes al hinchamiento o swelling (Sw) de las muestras de Aloe vera analizadas se muestran en la figura 15. Esta propiedad indica la capacidad total de adsorción de agua que tienen las muestras.

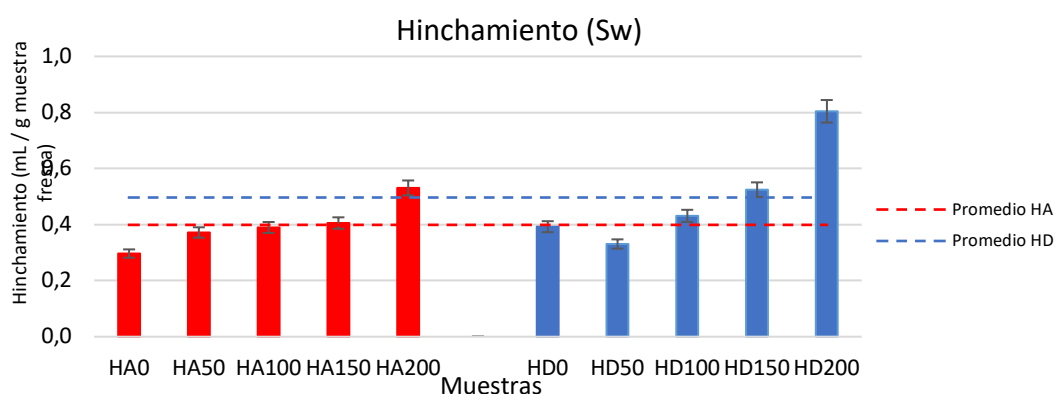


Figura 15. Hinchamiento de las muestras de AIR de Aloe vera.

Como puede observarse, para las muestras tratadas en régimen de estrés hídrico, los valores oscilaron entre 0.33 mL/g muestra fresca y 0.80 mL/g muestra fresca; en el caso de las muestras que han sido hidratadas con hidratación abundante, los valores oscilaron entre 0.30 mL/g muestra fresca y 0.53

mL/g muestra fresca. Los resultados sugieren que a medida que la salinidad aumenta, también lo hace la capacidad de hinchamiento y, además, las muestras que sufren estrés hídrico tienen mayor capacidad de hinchamiento; especialmente a medida que la salinidad se incrementa.

#### 4.4.2. Capacidad de retención de agua (WRC)

La capacidad de retención de agua se determina a partir de la cantidad de agua que es retenida en el interior de una muestra después de que ésta sea sometida a un proceso de centrifugación.

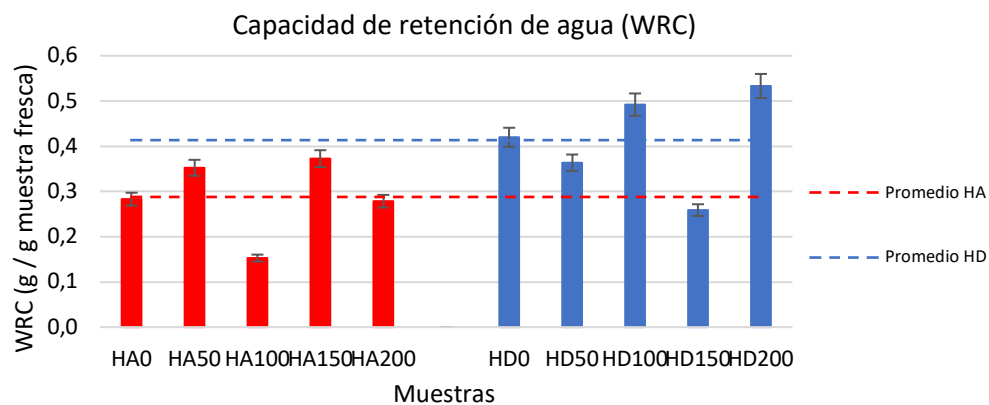


Figura 16. WRC de las muestras de AIR de Aloe vera.

Como puede observarse en la figura 16, para las muestras de Aloe vera sometidas a déficit hídrico, los valores se situaron en un rango comprendido entre 0.26 g/g muestra fresca y 0.53 g/g muestra fresca; mientras que para las muestras sometidas a una humedad abundante, los valores oscilaron entre 0.15 g/g muestra fresca y 0.37 g/g muestra fresca. A pesar de no observarse una tendencia clara en función del gradiente salino para ninguno de los tratamientos aplicados, si se observó una importante diferencia entre los valor promedio de la WRC para ambos tratamientos, siendo superior en el caso de las muestras tratadas con déficit hídrico.

#### 4.4.3. Capacidad de adsorción de aceite (FAC)

Finalmente se determinó la capacidad de adsorción de aceite, es decir la cantidad de aceite que puede retener la muestra en el interior durante después de ser sometida a un proceso de centrifugación, de forma análoga a la WRC. Cabe destacar que la FAC se ha relacionado directamente con la reducción de niveles de colesterol en sangre y con la inhibición de factores toxicológicos y carcinogénicos (Elleuch et al. (2011)).

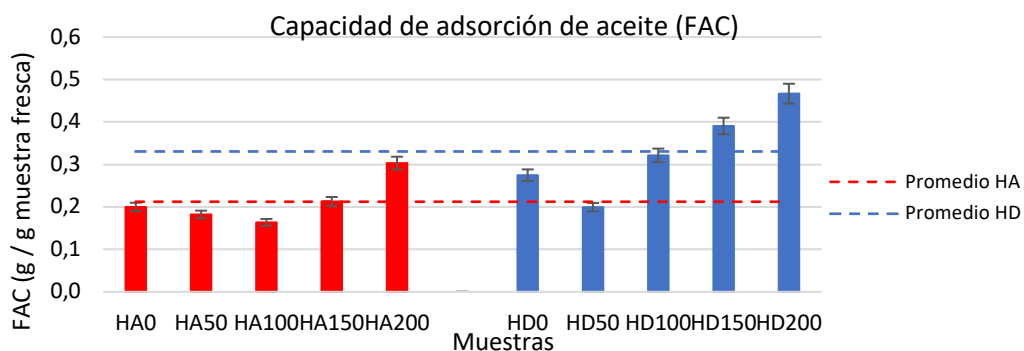


Figura 17. FAC de las muestras de AIR de Aloe vera.

En la figura 17 se muestran los valores obtenidos para la FAC para las muestras de Aloe vera analizadas.

En general, se observa cómo tanto para hidratación abundante como deficitaria, los valores aumentan a medida que aumenta la salinidad del tratamiento hídrico. Las muestras sometidas a un estrés hídrico presentaron valores comprendidos entre 0.20 g aceite/g muestra fresca y 0.47 g aceite/g muestra fresca; mientras que los valores para las muestras sometidas a un régimen de riego abundante se situaron entre 0.16 g aceite/g muestra fresca y 0.30 g aceite/g muestra fresca. Por otra parte, también se observa como las muestras sometidas a un estrés hídrico presentan valores de FAC más elevados, ( $p < 0.05$ ) que las muestras tratadas con hidratación abundante.

## 5. CONCLUSIONES

---

A partir del estudio realizado con las muestras de Aloe vera se han podido extraer las siguientes conclusiones:

- 1) El contenido total de los polisacáridos de la planta de Aloe vera aumentó en relación a las dos variables estudiadas, grado de hidratación y gradiente salino; pudiendo observarse un aumento del 22% en las muestras con déficit hídrico respecto a las muestras tratadas con hidratación abundante, y un 68% a medida que la concentración salina del riego aumentó.
- 2) Los niveles de celulosa presente en las paredes celulares de la planta de Aloe vera fueron mayores en las muestras sometidas a estrés hídrico, registrándose un aumento del 50% respecto a las muestras tratadas hidratación abundante.
- 3) Los niveles de pectinas presentes en la planta aumentaron a medida que la salinidad del riego también lo hizo, registrándose un aumento del 53% entre la máxima (200 mM) y mínima (0 mM) salinidad; sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles de pectinas debido al régimen hídrico aplicado. Por otra parte, ni el régimen hídrico ni el salino afectaron de forma significativa a las características estructurales de los polisacáridos pécticos.
- 4) Los niveles de acemanano presentes en la planta de Aloe vera aumentaron en relación a las dos variables estudiadas, incrementándose en un 48% para las muestras sometidas a estrés hídrico respecto a las muestras tratadas con hidratación abundante; y hasta en un 79% a medida que la salinidad de riego se incrementó.
- 5) También se detectó un importante aumento de la calidad del acemanano, determinada mediante el grado de acetilación, independientemente del tipo de riego aplicado. En general, la calidad del acemanano producido por la Aloe vera aumentó a medida que se incrementó la salinidad del riego. En concreto, el DA del acemanano aumentó en un 86% para las muestras con hidratación abundante y hasta en un 155% para las muestras tratadas con déficit de hidratación.

En conclusión, los resultados obtenidos indican la importancia del control de las condiciones de riego, en particular el tipo de hidratación y la salinidad aplicadas, con el fin de conseguir plantaciones de Aloe vera que produzcan acemanano no solo en mayor cantidad sino también de mejor calidad.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

---

- Alnouri D. M. A., Kouchaji C., Nattouf A., AlSayed-Hasan M. M. A. (2020). Effect of aloe vera mouthwash on dental plaque and gingivitis indices in children: A randomized controlled clinical trial. *Pediatric Dental Journal*, **30**, 1-8.
- Alvarado-Morales G., Minjares-Fuentes R., Contreras-Esquivel J. C., Montañez J., Meza-Velázquez J. A., Femenia A. (2019). Application of thermosonication for Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) juice processing: Impact on the functional properties and the main bioactive polysaccharides. *Ultrasonics Sonochemistry*, **56**, 125-133.
- Bailey I. W. (1938). Cell wall structure of higher plants. *Industrial and Engineering Chemistry*, Harvard University, Cambridge, Massachusetts, 41-47.
- Bhushan I., Sharma M., Mehta M., Badyal S., Sharma V., Sharma I., Singh H., Sistla S. (2021). Bioactive compounds and probiotics—a ray of hope in COVID-19 management. *Food Science and Human Wellness*, **10**, 131-140.
- Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G. (1973). New Method for Quantitative Determination of Uronic Acids. *Analytical Biochemistry*, **54**, 484-489.
- Bozzi A., Perrin C., Austin S., Arce-Vera F. (2007). Quality and authenticity of commercial aloe vera gel powders. *Food Chemistry*, **103**, 22-30.
- Bunyaphatsara N., Jirakulchaiwong S., Thirawarapan S., Manonukul J. (1996). The efficacy of Aloe vera cream in the treatment of first, second and third degree burns in mice. *Phytomedicine*, **2**, 247-251.
- Campestrini L. H., Silveira J. L. M., Duarte M. E. R., Koop H. S., Nosedá M. D. (2013). NMR and rheological study of Aloe barbadensis partially acetylated glucomannan. *Carbohydrate Polymers*, **94**, 511-519.
- Chokboribal J., Tachaboonyakiat W., Sangvanich P., Ruangpornvisuti V., Jettanacheawchankit S., Thunyakitpisal P. (2015). Deacetylation affects the physical properties and bioactivity of acemannan, an extracted polysaccharide from Aloe vera. *Carbohydrate Polymers*, **133**, 556-566.
- Cruz-Valderrama J. E., Jiménez-Durán K., Zúñiga-Sánchez E., Salazar-Iribe A., Márquez-Guzmán J., Gamboa-deBuen A. (2018). Degree of pectin methyl esterification in endosperm cell walls is involved in embryo bending in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **495**, 639-645.
- Davidson M. H., McDonald A. (1998). Fiber: Forms and function. *Nutrition Research*, **18**, 617-624.
- Elleuch M., Bedigian D., Roiseux O., Besbes S., Clecker C., Attia H. (2011). Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry*, **124**, 411-421.
- Femenia A., García-Pascual P., Simal S., Rosselló C. (2003). Effects of heat treatment and dehydration on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from Aloe barbadensis Miller. *Carbohydrate Polymers*, **51**, 397-405.
- Femenia A., Sánchez E. S., Simal S., Rosselló C. (1999). Compositional features of polysaccharides from Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. *Carbohydrate Polymers*, **39**, 109-117.
- Fogleman R. W., Shellenberger T. E., Balmer M. F., Carpenter R. H., McAnalley B. H. (1992). Subchronic oral administration of acemannan in the rat and dog. *Veterinary and Human Toxicology*, **34**, 144-147.
- Franz G., Blaschek W. (1990). 8 - Cellulose. *Methods in Plant Biochemistry*. Academic Press, **2**, 291-322.
- Gentilini R., Bozzini S., Munarin F., Petrini P., Visai L., Tanzi M. C. (2014). Pectins from Aloe Vera: Extraction and production of gels for regenerative medicine. *Journal of Applied Polymer Science*, **131**, 39760.
- Gunning A. P., Bongaerts R. J. M., Morris V. J. (2009). Recognition of galactan components of pectin by galectin-3. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, **23**, 415-424.
- Habtemariam S. (2017). Could We Really Use Aloe vera Food Supplements to Treat Diabetes? Quality Control Issues. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2017**, 1-10.
- Hassimotto N. M. A., Genovese M. I., Lajolo F. M. (2005). Antioxidant Activity of Dietary Fruits, Vegetables and Commercial Frozen Fruit Pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 2928-2935.
- Hazrati S., Tahmasebi-Sarvestani Z., Mokhtassi-Bidgoli A., Modarres-Sanavy S. A. M., Mohammadi H., Nicola S. (2017). Effects of zeolite and water stress on growth, yield and chemical compositions of Aloe vera L. *Agricultural Water Management*, **181**, 66-72.
- Hosseini S. S., Khodaiyan F., Yarmand M. S. (2016). Optimization of microwave assisted extraction of pectin from sour orange peel and its physico-chemical properties. *Carbohydrate Polymers*, **140**, 59-65.
- Ijaz N., Durrani A. I., Rubab S., Bahadur S. (2021). Formulation and characterization of Aloe vera gel and tomato powder containing cream. *Acta Ecologica Sinica*.
- Ishii Y., Tanizawa H., Takino Y. (1994). Studies of Aloe. V. Mechanism of Cathartic Effect. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **17**, 651-653.



- Kumar Gupta P., Sai Raghunath S., Venkatesh Prasanna D., Venkat P., Shree V., Chithananthan C., Choudhary S., Surender K., Geetha K. (2019). An Update on Overview of Cellulose, Its Structure and Applications. *IntechOpen*, p.
- Kumar S., Kumar R. (2019). Role of acemannan O-acetyl group in murine radioprotection. *Carbohydrate Polymers*, **207**, 460-470.
- Kuniak L., Marchessault R. H. (1972). Study of the Crosslinking Reaction between Epichlorohydrin and Starch. *Starch-Starke*, **24**, 110-116.
- Kyomugasho C., Christiaens S., Shpigelman A., Van Loey A. M., Hendrickx M. E. (2015). FT-IR spectroscopy, a reliable method for routine analysis of the degree of methylesterification of pectin in different fruit- and vegetable-based matrices. *Food Chemistry*, **176**, 82-90.
- Le Gall H., Philippe F., Domon J. M., Gillet F., Pelloux J., Rayon C. (2015). Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress. *Plants*, **4**, 112-166.
- Maenthaisong R., Chaiyakunapruk N., Niruntraporn S., Kongkaew C. (2007). The efficacy of aloe vera used for burn wound healing: A systematic review. *Burns*, **33**, 713-718.
- Manrique G. D., Lajolo F. M. (2002). FT-IR Spectroscopy as a Tool for Measuring Degree of Methyl Esterification in Pectins Isolated from Ripening Papaya Fruit. *Postharvest Biology and Technology*, **25**, 99-107.
- Medronho B., Romano A., Miguel M. G., Stigsson L., Lindman B. (2012). Rationalizing cellulose (in)solubility: reviewing basic physicochemical aspects and role of hydrophobic interactions. *Cellulose*, **19**, 581-587.
- Minjares-Fuentes R., Femenia A. (2018). *Aloe vera*. Plant and Algae Extracts, Part III, 145-152.
- Minjares-Fuentes R., Femenia A., Comas-Serra F., Rodríguez-González V. M. (2018). Compositional and Structural Features of the Main Bioactive Polysaccharides Present in the Aloe vera Plant. *Journal of AOAC International*, **101**, 1711-1719.
- Minjares-Fuentes R., Femenia A., Comas-Serra F., Rosselló C., Rodríguez-González V. M., González-Laredo R. F., Gallegos-Infante J. A., Medina-Torres L. (2016). Effect of different drying procedures on physicochemical properties and flow behavior of Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) gel. *LWT - Food Science and Technology*, **74**, 378-386.
- Minjares-Fuentes R., Femenia A., Garau M. C., Candelas-Cadillo M. G., Simal S., Rosselló C. (2016). Ultrasound-assisted extraction of hemicelluloses from grape pomace using response Surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, **138**, 180-191.
- Minjares-Fuentes R., Medina-Torres L., González-Laredo R. F., Rodríguez-González V. M., Eim V., Femenia A. (2017). Influence of water deficit on the main polysaccharides and the rheological properties of Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) mucilage. *Industrial Crops & Products*, **109**, 644-653.
- Minjares-Fuentes R., Rodríguez-González V. M., González-Laredo R. F., Eim V., González-Centeno M. R., Femenia A. (2017). Effect of different drying procedures on the bioactive polysaccharide acemannan from Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller). *Carbohydrate Polymers*, **168**, 327-336.
- Moore J. P., Farrant J. M., Driouich A. (2008). A role for pectin-associated arabinans in maintaining the flexibility of the plant cell wall during water deficit stress. *Plant Signaling & Behavior*, **3**, 102-104.
- Moore J. P., Vitré-Gibouin M., Farrant J. M., Driouich A. (2008). Adaptations of higher plant cell walls to water loss: Drought vs desiccation. *Physiologia Plantarum*, **134**, 237-245.
- Nema J., Shrivastava S. K., Mitra N. G. (2008). Chemical characteristics of acemannan polysaccharides of Aloe Ferox species under stresses of soil, pH and irrigation. *Asian Journal of Science and Technology*, **9**, 7677-7680.
- Ochoa-Villarreal M., Aispuro E., Vargas-Arispuro I., Martínez-Téllez M. A. (2012). Plant Cell Wall Polymers: Function, Structure and Biological Activity of Their Derivatives. *Polymerization*, 63-86.
- Pappas C. S., Malovikova A., Hromadkova Z., Tarantilis P. A., Ebringerova A., Polissiou M. G. (2004). Determination of the degree of esterification of pectinates with decyl and benzyl ester groups by diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) and curve-fitting deconvolution method. *Carbohydrate Polymers*, **56**, 465-469.
- Peng S. Y., Norman J., Curtin G., Corrier D., McDaniel H. R., Busbee D. (1991). Decreased mortality of Norman murine sarcoma in mice treated with the immunomodulator, Acemannan. *Molecular Biotherapy*, **3**, 79-87.
- Quirós-Pozo R., Ventura-Castellano A., Ramírez-Bolaños S., Roo-Filgueira J., Robaina L. (2021). Evaluation of Aloe vera by-product against cereals in feeds for golden mullet (*Liza aurata*). *Aquaculture Reports*, **20**, 100659.
- Reynolds T., Dweck A. C. (1999). Aloe vera leaf gel: a review update. *Journal of Ethnopharmacology*, **68**, 3-37.
- Rodríguez-González V. M., Femenia A., González-Laredo R. F., Rocha-Guzmán N. E., Gallegos-Infante J. A., Candelas-Cadillo M. G., Ramírez-Baca P., Simal S., Rosselló C. (2011). Effects of pasteurization on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from Aloe barbadensis Miller. *Carbohydrate Polymers*, **86**, 1675-1683.

- Ruiz-Garza A. E., Nuñez-González M. A., Amaya-Guerra C. A., Baez-González J. G., Aguilera-González C. J., Montemayor-Leal J. (2017). Caracterización funcional de fibras comerciales modificadas por medios físicos. *Facultad de ciencias biológicas en Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, **2**, 422-427.
- Saeman J. F., Moore W. E., Mitchell R. L., Millet M. A. (1954). Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. *Tappi*, **37**, 336-340.
- Scheller H. V., Ulvskov P. (2012). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, **60**, 263-289.
- Selvendran R. R., March J. F., Ring S. G. (1979). Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fibre. *Analytical Biochemistry*, **96**, 282-292.
- Sharifi E., Chehelgerdi M., Fatahian-Kelishadroki A., Yazdani-Nafchi F., Ashrafi-Dehkordi K. (2021). Comparison of therapeutic effects of encapsulated Mesenchymal stem cells in Aloe vera gel and Chitosan-based gel in healing of grade-II burn injuries. *Regenerative Therapy*, **18**, 30-37.
- Shelton R. M. (1991). Aloe Vera: Its Chemical and Therapeutic Properties. *International Journal of Dermatology*, **30**, 679-683.
- Sudachkova N. E., Mynyutina I. L., Semenova G. P. (2002). Influence of Water Déficit on Contents of Carbohydrate and Nitrogenous Compounds in *Pinus sylvestris* L. and *Larix sibirica* Ledeb. Tissues. *Eurasian Journal of Forest Research*, **4**, 1-11.
- Surjushe A., Vasani R., Saple D. G. (2008). Aloe vera: A short review. *Indian Journal of Dermatology*, **53**, 163-166.
- Thibault J. F., Lahaye M., Guillon F. (1992). *Physico-chemical Properties of Food Plant Cell Walls*. Schweizer T.F., Edwards C.A. (eds) Dietary Fibre — A Component of Food. 21-39. London: Springer.
- Umaña M. M., Dalmau M. E., Eim V. S., Femenia A., Rosselló C. (2019). Effects of acoustic poder and pH on pectin-enriched extracts obtained from citrus by-products. Modelling of the extraction process. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **99**, 6893-6902.
- Vega A., Ampuero N., Díaz L., Lemus R. (2005). El Aloe Vera (*Aloe barbadensis* Miller) como componente de alimentos funcionales. *Revista Chilena de Nutrición*, **32**, 208-214.
- Visuthikol V., Chowchuen B., Sukwanarat Y., Sriurairatana S., Boonpucknavig V. (1995). Effect of Aloe vera gel to healing of burn wound – a clinical and histologic study. *Journal of the Medical Association of Thailand*, **78**, 403-409.
- Waldron K. W., Selvendran R. R. (1990). Composition of the cell walls of different asparagus (*Asparagus officinalis*) tissues. *Physiologia Plantarum*, **80**, 568-575.
- Yapo B. M. (2011). Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins—A new hypothetical model. *Carbohydrate Polymers*, **86**, 373-385.
- Zhou R., Li Y., Yan L., Xie J. (2011). Effect of edible coatings on enzymes, cell-membrane integrity, and cell-wall constituents in relation to brittleness and firmness of Huanghua pears (*Pyrus pyrifolia* Nakai, cv. Huanghua) during storage. *Food Chemistry*, **124**, 569-575.