

**ESTUDIO COMPARATIVO DEL CONTENIDO DE ÁCIDO ASCÓRBICO DEL MUCÍLAGO DE *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller.), ENTRE DIFERENTES CULTIVOS DEL DEPARTAMENTO DE RISARALDA, COLOMBIA. POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (CLAE).**

**CARLOS ANDRÉS ESTUPIÑÁN IGLESIAS**

**DIRECTOR:**

**GLORIA EDITH GUERRERO ALVAREZ**  
**PhD en Ciencias Químicas**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA**  
**FACULTAD DE TECNOLOGÍA**  
**ESCUELA DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA QUÍMICA INDUSTRIAL**  
**PEREIRA**  
**2012**

**ESTUDIO COMPARATIVO DEL CONTENIDO DE ÁCIDO ASCÓRBICO DEL MUCÍLAGO DE *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller.), ENTRE DIFERENTES CULTIVOS DEL DEPARTAMENTO DE RISARALDA, COLOMBIA. POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (CLAE).**

**TRABAJO DE GRADO**

**Requisito final para optar al título de Químico Industrial**

**PRESENTADO POR:**

**CARLOS ANDRÉS ESTUPIÑÁN IGLESIAS**

**DIRECTOR:**

**GLORIA EDITH GUERRERO ALVAREZ  
PhD en Ciencias Químicas**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
ESCUELA DE QUÍMICA  
PROGRAMA QUÍMICA INDUSTRIAL  
PEREIRA  
2012**

**NOTA DE ACEPTACIÓN DE TRABAJO DE GRADO**

**ESTUDIO COMPARATIVO DEL CONTENIDO DE ÁCIDO ASCÓRBICO DEL MUCÍLAGO DE *Aloe vera (Aloe barbadensis Miller.)*, ENTRE DIFERENTES CULTIVOS DEL DEPARTAMENTO DE RISARALDA, COLOMBIA. POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (CLAE).**

**Presentado por:  
CARLOS ANDRÉS ESTUPIÑÁN IGLESIAS**

Los suscritos director y jurado del presente trabajo de grado, una vez realizada la versión escrita y presenciado la sustentación oral, decidimos otorgar la nota de:

\_\_\_\_\_

Con la connotación:

\_\_\_\_\_

Para constancia firmamos en la ciudad de Pereira hoy:

\_\_\_\_\_

Director:

\_\_\_\_\_

**GLORIA EDITH GUERRERO ALVAREZ**  
PhD en Ciencias Química

Jurado:

Firma

\_\_\_\_\_

Jurado:

Firma

\_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por guiarme en el cumplimiento de mi deber prescrito.

A mi Madre María del Carmén Iglesias Quintero, mi eterna gratitud por su amor incondicional, por su esfuerzo, y continua motivación.

A Jhonier E, por brindarme su constante apoyo fraternal.

Y a mi familia, de quienes siempre he recibido lo mejor, su presencia ha sido toda una bendición.

A la directora de este estudio Gloria Edith Guerrero por sus valiosos consejos y por brindarme amablemente la oportunidad de pertenecer al grupo de Oleoquímica, y al profesor Juan Pablo Arrubla por las asesorías recibidas.

A cada uno de los profesores y profesoras por compartir sus conocimientos y enseñanzas tanto académicas como humanas.

A mis amig@s y conocid@s, en especial a Nataly Villa, Lina Villa, Jenny Veléz, Iván Yanza, Marcelo Trujillo, y Carlos Vinasco, por los momentos que compartimos y porque sin ustedes la culminación de este trabajo no hubiese sido posible. Les deseo muchos éxitos en cada uno de sus proyectos de vida.

## CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ANEXOS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
2. JUSTIFICACIÓN	14
3. OBJETIVOS	17
3.1 OBJETIVO GENERAL	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4. MARCO TEÓRICO.	18
4.1 GENERALIDADES DEL <i>Aloe vera</i> .	18
4.1.1 Clasificación botánica del <i>Aloe vera</i> .	18
4.1.2 Morfología del <i>Aloe vera</i> .	18
4.1.3 Fenología del <i>Aloe vera</i> .	20
4.1.4 Estructura de la hoja de <i>Aloe vera</i> .	21
4.1.5 Proceso fotosintético del <i>Aloe vera</i> .	22
4.1.6 Composición química del mucílago de <i>Aloe vera</i> .	23
4.1.7 Usos del <i>Aloe vera</i> .	25
4.1.8 Establecimiento del cultivo de <i>Aloe vera</i> .	27
4.1.8.1 Condiciones edafoclimáticas del <i>Aloe vera</i> .	27
4.1.8.2 Plantación del <i>Aloe vera</i> .	28
4.1.8.3 Fertilización y riegos.	29
4.1.8.4 Control de malezas.	29
4.1.8.5 Prevención de plagas y enfermedades.	29
4.1.8.6 Reproducción.	33
4.1.8.7 Ciclo productivo y recolección.	33
4.1.9 Producción y comercialización del <i>Aloe vera</i> .	33
4.1.9.1 <i>Aloe vera</i> en el mundo.	34
4.1.9.2 <i>Aloe vera</i> en América.	35
4.1.9.3 <i>Aloe vera</i> en Colombia.	37
4.2 VITAMINAS DEL <i>Aloe vera</i> .	38
4.2.1 Generalidades del Ácido ascórbico.	39
4.2.1.1 Estructura.	39
4.2.1.2 Isomería.	40
4.2.1.3 Abreviación.	42
4.2.1.4 Propiedades de la vitamina C.	43

4.2.1.5 Alimentos ricos en vitamina C.	48
4.2.1.6 Usos y producción de la vitamina C.	49
4.2.1.7 Métodos de análisis de la vitamina C.	51
4.3 FUNDAMENTO TEÓRICO DE LA TÉCNICA INSTRUMENTAL UTILIZADA.	52
4.3.1 Cromatografía Generalidades.	52
4.3.1.1 Cromatografía líquida (CL).	52
4.3.1.2 Instrumentación para CLAE.	53
4.3.1.3 Tipos de separación por CLAE.	56
4.4 PARÁMETROS ESTADÍSTICOS.	59
4.4.1 Linealidad.	59
4.4.2 Sensibilidad.	60
4.4.3 Exactitud.	61
4.4.4 Precisión.	61
4.4.5 Comparación entre medias (ANOVA de un factor).	62
4.4.5.1 Pruebas específicas para establecer diferencias significativas.	62
5. MARCO DE REFERENCIA.	63
5.1 Antecedentes de los cultivos de <i>Aloe vera</i> visitados en los diferentes municipios del departamento de Risaralda.	67
6. METODOLOGÍA.	73
6.1 Muestra de análisis.	73
6.1.1 Descripción de las muestras.	73
6.1.2 Muestreo.	73
6.2 Extracción del ácido ascórbico del mucílago de <i>Aloe vera</i> .	73
6.3 Métodos de análisis del contenido de vitamina C del mucílago de <i>Aloe vera</i> por CLAE.	75
6.3.1 Análisis cualitativo.	75
6.3.2 Análisis cuantitativo.	76
6.3.3 Análisis estadístico.	76
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	78
7.1 Descripción de la muestra.	78
7.2 Método de extracción del contenido de ácido ascórbico del mucílago de <i>Aloe vera</i> .	79
7.3 Métodos de análisis del contenido de ácido ascórbico del mucílago de <i>Aloe vera</i> .	81
7.3.1 Análisis cualitativo.	81
7.3.2 Análisis cuantitativo.	85

7.3.2.1	Estimación de la concentración de ácido ascórbico en las muestras del mucilago de <i>Aloe vera</i> de las plantas procedentes de los cultivos del departamento de Risaralda.	85
7.3.3	Análisis estadístico.	86
7.3.3.1	Rango de Linealidad.	86
7.3.3.2	Sensibilidad.	88
7.3.3.3	Exactitud.	89
7.3.3.4	Precisión.	90
7.3.3.5	Comparación entre medias.	91
7.4	DISCUSIÓN GENERAL.	96
8.	CONCLUSIONES.	99
9.	RECOMENDACIONES.	100
	BIBLIOGRAFIA.	101
	ANEXOS.	108

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación botánica del <i>Aloe vera</i> [25].	18
Tabla 2. Especies de <i>Aloe vera</i> .	19
Tabla 3. Fenología del <i>Aloe vera</i> .	20
Tabla 4. Composición química del mucílago de <i>Aloe vera</i> y sus características.	24
Tabla 5. Algunos estudios relacionados con las aplicaciones, usos y propiedades del <i>Aloe vera</i> .	26
Tabla 6. Condiciones edafoclimáticas del <i>Aloe vera</i> [6].	28
Tabla 7. Daños causados por patógenos en el <i>Aloe vera</i> .	31
Tabla 8. Distribución general de cultivos de penca de sábila en Colombia en hectáreas [17].	37
Tabla 9. Vitaminas hidrosolubles del <i>Aloe vera</i> [4].	38
Tabla 10. Propiedades Físicas de la vitamina C [59].	43
Tabla 11. Alimentos y contenido de vitamina C [59].	48
Tabla 12. Algunos estudios sobre <i>Aloe vera</i> relacionados con su contenido de ácido ascórbico.	50
Tabla 13. Estudios comparativos del contenido de vitamina C en plantas diferentes al <i>Aloe vera</i> .	63
Tabla 14. Estudios comparativos del contenido de metabolitos en <i>Aloe vera</i> .	65
Tabla 15. Análisis del contenido de ácido ascórbico del mucílago de <i>Aloe vera</i> por CLAE.	75
Tabla 16. Concentraciones de los patrones utilizadas para la Curva de calibración.	76
Tabla 17. Concentración (mg/L) de AA en gel de <i>Aloe vera</i> por zona de cultivo	86
Tabla 18. Contenido de AA/ Kg hoja de <i>Aloe vera</i>	86
Tabla 19. Datos cromatográficos para diferentes concentraciones (mg/L) de AA.	87
Tabla 20. Estadísticos descriptivos.	87
Tabla 21. Resumen del modelo de regresión lineal.	88
Tabla 22. Valor calculado de los límites de detección y cuantificación.	89
Tabla 23. Porcentaje de recuperación de las muestras.	89
Tabla 24. Determinación de la concentración de una solución referencia de 1,0 mg/L de ácido ascórbico por curva de calibración.	90
Tabla 25. Repetibilidad de un patrón de 1,0 mg/L de ácido ascórbico medido durante cinco días consecutivos.	90
Tabla 26. Reproducibilidad del método de cuantificación de un patrón de 1mg/L de AA medido una vez al mes.	91
Tabla 27. Condición 1: Prueba de Normalidad.	92
Tabla 28. Condición 2: Prueba de homogeneidad de varianzas.	92
Tabla 29. Descriptivos ANOVA de un factor.	93
Tabla 30. Comparaciones Múltiples.	94

Tabla 31. Subconjuntos homogéneos por zona de cultivo y Pruebas de contraste.....	95
---	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fenología del <i>Aloe barbadensis</i> Miller a. Flor; b. Hoja; c. Tallo; d. Raíz.....	21
Figura 2. Estructura y corte transversal de la hoja de <i>Aloe vera</i> .....	22
Figura 3. Proceso metabólico del <i>Aloe vera</i> (variante fotosintética CAM).....	23
Figura 4. Plantación de <i>Aloe Vera</i> .....	28
Figura 5. Infestación en <i>Aloe vera</i> .....	30
Figura 6. Sello de certificación IASC. ....	33
Figura 7. Cultivos de <i>Aloe vera</i> en el mundo.....	34
Figura 8. Mercado internacional de <i>Aloe vera</i> .....	35
Figura 9. Cultivos de <i>Aloe vera</i> en América. ....	35
Figura 10. Mercado de <i>Aloe vera</i> en América. ....	36
Figura 11. Oxidación endiol a dicetona. ....	40
Figura 12. Estructura química del ácido ascórbico (estabilidad). ....	40
Figura 13. Movimiento de los pares de electrones en la desprotonación del ácido ascórbico. ....	41
Figura 14. Ataque nucleofílico del enol ascórbico sobre el protón para dar.....	41
Figura 15. Estereoisómeros del ácido ascórbico. ....	42
Figura 16. Productos de degradación del ácido ascórbico.....	44
Figura 17. Primer vía de degradación oxidativa del ácido ascórbico. ....	45
Figura 18. Segunda vía de degradación oxidativa del ácido ascórbico.....	46
Figura 19. Tercera vía de degradación oxidativa del ácido ascórbico.....	47
Figura 20. Equipo para cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE). ....	53
Figura 21. Celda de detector ultravioleta en CLAE. ....	55
Figura 22. Zonas de estudio del cultivo de <i>Aloe vera</i> . ....	69
Figura 23. Cultivo de <i>Aloe vera</i> del municipio de Belén de Umbría Risaralda.....	70
Figura 24. Cultivo de <i>Aloe vera</i> del corregimiento La Florida Risaralda. ....	70
Figura 25. Cultivo de <i>Aloe vera</i> del municipio de Marsella Risaralda.....	71
Figura 26. Cultivo de <i>Aloe vera</i> del municipio de Mistrató Risaralda.....	71
Figura 27. Cultivo de <i>Aloe vera</i> del municipio de Santuario Risaralda.....	72
Figura 28. Extracción de ácido ascórbico del mucílago de <i>Aloe vera</i> . ....	74
Figura 29. Aspecto de las hojas de <i>Aloe vera</i> .....	78
Figura 30. Esquema análisis del ácido ascórbico del mucílago de <i>Aloe vera</i> .....	79
Figura 31. Cromatogramas I) primer sistema de separación; II) segundo sistema de separación.....	80

Figura 32. Extracción de ácido ascórbico del gel de <i>Aloe vera</i> con diferentes volúmenes de Agua (H <sub>2</sub> O)- ácido sulfúrico (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) pH 2,7. ....	81
Figura 33. Cromatogramas de solución patrón de AA de 16 mg/L en agua acidulada en Columna Pinnacle DB C18; Fase móvil: agua 5% - Ac.Sulfúrico 95% pH 2,7.....	82
Figura 34. Cromatogramas muestras de <i>Aloe vera</i> .....	85
Figura 35.Comparación múltiple de Medias obtenidas en cinco muestras de <i>Aloe</i> para el contenido de AA. ....	95

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Interrelaciones entre las vías posibles de biosíntesis de L-AA en las plantas y el metabolismo central de hexosa de fosfato (22). ....	108
Anexo 2. Materiales y equipos. ....	109
Anexo 3. Cálculos. ....	110
Anexo 4. Promedio curvas de calibración del ácido ascórbico por CLAE. ....	111
Anexo 5. Datos del análisis del mucílago y fertilidad de los suelos de las zonas de estudio (tesis 2011).....	112

## RESUMEN

Este proyecto de grado consistió en el estudio comparativo del contenido de ácido ascórbico, por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE), del mucílago de *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller.) de plantas cultivadas en diferentes municipios del departamento de Risaralda (Belén de Umbría, La Florida, Marsella, Mistrató y Santuario). Con el fin de ampliar el conocimiento sobre la composición de los cultivos de *Aloe vera* en Risaralda para contribuir a la diversificación de los usos y propiciar mayores oportunidades en el mercado nacional e internacional.

Por medio del grupo de Oleoquímica de la Universidad Tecnológica de Pereira se implementaron dos metodologías para el proceso de extracción del contenido de ácido ascórbico del mucílago de *Aloe vera*. En la parte metodológica se detalla cada técnica empleada en el laboratorio con sus respectivas referencias. Por el método de extracción de la vitamina C con solución agua (H<sub>2</sub>O) – ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pH 2,7 se encontraron porcentajes de recuperación del (87,56 - 119,58)%. Las condiciones de operación más adecuadas para la cuantificación del ácido ascórbico por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) con detector ultravioleta (UV) fueron fase móvil: solución agua (5% H<sub>2</sub>O) – ácido sulfúrico (95% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pH 2,7 bajo condiciones isocráticas [1], [2]. Fase estacionaria: Pinnacle DB C18 (3 µm x 100 mm x 3,2 mm); longitud de máxima absorción: 248 nm y un flujo: 0,3 mL / min. La metodología de cuantificación presentó buena linealidad, precisión, exactitud y sensibilidad a un nivel de confianza del 95%.

Se analizó la variabilidad de los resultados obtenidos por lugar de cultivo. Se determinó que el valor del mayor y menor contenido de vitamina C en base húmeda de *Aloe vera* fue de 4,259 mg (± 0,2248) / kg de muestra<sup>1</sup> y de 1,272 mg (± 0,0550) / kg de muestra<sup>1</sup>, que corresponden a los cultivos de Belén de Umbría y Marsella respectivamente.

**Palabras clave:** Ácido ascórbico, *Aloe vera*, HPLC.

---

<sup>1</sup> (Media ± SD) obtenido del análisis por triplicado.

## ABSTRACT

This project consisted of a comparative study of ascorbic acid content, by high performance liquid chromatography (HPLC), of mucilage *Aloe vera* plant (*Aloe barbadensis* Miller.) grown in different municipalities in the department of Risaralda (Belén de Umbría, La Florida, Marsella, Mistrató y Santuario). In order to increase knowledge about the composition of *Aloe vera* grown in Risaralda and contribute to the diversification of uses and promote greater opportunities in the market national and international.

Through Oleochemical group of the Technological University of Pereira was implemented two methods for the extraction of ascorbic acid content of mucilage of *Aloe vera*. On the methodological details each technique used in the laboratory with appropriate references. By the method of extraction of vitamin C with water solution (H<sub>2</sub>O) – sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pH 2.7 was found recovery rates (87.56 – 119.58) %. The most appropriate operating conditions for the quantification of ascorbic acid by high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet detector (UV) were mobile phase: water solution (5% H<sub>2</sub>O) – sulfuric acid (95% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pH 2.7 under isocratic conditions [1], [2]. Stationary phase: Pinnacle DB C18 (3 µm x 100 mm x 3.2 mm) length of maximum absorption: 248 nm and a flow: 0.3 mL / min. The quantification methodology presented good linearity, precision, accuracy and sensitivity to a confidence level of 95%.

So was analyzed the variability in results obtained by growing location. It was determined that the highest and lowest value of vitamin C in wet base of *Aloe vera* was 4,259 mg (± 0,2248) / kg of sample<sup>1</sup> y de 1,272 mg (± 0,0550) / kg of sample<sup>1</sup>, corresponding to crops of Belén de Umbría y Marsella respectively.

**Keywords:** *Ascorbic acid, Aloe vera and HPLC.*

---

<sup>1</sup>(Mean ± SD) obtained from triplicate analysis.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Teniendo en cuenta que el *Aloe vera* es una planta que se introdujo desde el año 2004 en la región Cafetera y que son escasos los estudios en su composición química, se planteó el estudio comparativo del contenido de ácido ascórbico por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE), del mucílago de *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller.) de plantas cultivadas en diferentes municipios del departamento de Risaralda (Belén de Umbría, La Florida, Marsella, Mistrató y Santuario). Con el fin de ampliar el conocimiento sobre la composición de los cultivos de *Aloe vera* en Risaralda para contribuir a la diversificación de los usos y propiciar mayores oportunidades en el mercado nacional e internacional.

## 2. JUSTIFICACIÓN

El *Aloe vera* es una planta perenne de la familia *Liliaceae*, originaria de África, específicamente de la península de Arabia, es una planta de hojas alongadas, carnosas y poseen un borde espinoso dentado. El *Aloe vera* es un género de plantas que abarca más de 400 especies, y se ha demostrado científicamente que son cuatro tipos los que presentan mayores propiedades medicinales: *Aloe barbadensis* Miller, *Aloe perryi* Baker, *Aloe ferox* y *Aloe arborescens*. No obstante, el *Aloe barbadensis* Miller es considerada como la más utilizada en la medicina curativa y la más popular en el mundo entero llamada comúnmente *Aloe vera* [3], [4].

Según, estadísticas recientes del Consejo Científico Internacional de *Aloe vera* (International Aloe Science Council (IASC)), se estima que el mercado mundial de *Aloe*, productos derivados y productos con *Aloe*, es un negocio de US\$110 mil millones de dólares anuales; el comercio mundial de *Aloe* como materia prima sin procesar fue estimado en unos US\$124 millones de dólares, con un potencial de crecimiento hasta los US\$997 millones de dólares. El mercado mundial de *Aloe vera* continúa en plena expansión y es reconocido como un producto con gran potencial de comercialización. El continente americano aporta el 81% de la producción mundial de *Aloe vera*, donde México es el país con mayor volumen del mundo, con 10.700 hectáreas de *Aloe vera* cultivada, seguido por la República Dominicana con 3.500 hectáreas y después de eso, Venezuela, con 3.400 hectáreas cultivadas. Estados Unidos presenta 649 hectáreas sembradas, siendo el principal importador y procesador de *Aloe vera*; la producción de gel de *Aloe vera* ha sido dominada por compañías estadounidenses establecidas en Texas y el Golfo de México, con gran inversión en investigación y desarrollo de la producción, cosecha y procesamiento [5].

En Latinoamérica, uno de los mayores productores y exportadores es Venezuela, gracias a su ubicación estratégica con respecto a los Estados Unidos puede representar una gran oportunidad para la exportación de los productos venezolanos. Sin embargo, México, Costa Rica y República Dominicana son también importantes productores del *Aloe vera* en Latinoamérica [6].

Durante los últimos treinta años se han emprendido en diferentes partes del mundo programas dedicados a la investigación de *Aloe vera*, debido a sus propiedades terapéuticas, nutricionales y cosméticas. Con una gran demanda comercial en el ámbito mundial; principalmente en Hong Kong, Estados Unidos,

Japón y Latinoamérica [7], [8]. Actualmente la sábila se ha convertido en un producto de importancia para la industria y las empresas que la procesan, ya que elaboran productos de consumo general, como cremas, shampoo, enjuagues, lociones y bronceadores. En la industria farmacéutica y cosmética estudios farmacológicos de sus componentes han confirmado efectos como cicatrizante de heridas y quemaduras, laxante, antiulceroso, antiinflamatorio, analgésico y hepatoprotector [9].

Las numerosas aplicaciones del *Aloe vera* se deben a sus propiedades físicas y químicas. La planta contiene entre el 99 y 99.5 por ciento de agua con un pH promedio de 4.5. La materia sólida remanente contiene aproximadamente setenta y cinco ingredientes diferentes donde se incluyen vitaminas hidrosolubles como la tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), piridoxina (B6), ácido fólico y ácido ascórbico (C); entre las vitaminas liposolubles la A y la E y pequeñas trazas de cianocobalamina (B12); las cuales en su conjunto hacen parte de las propiedades nutricionales y funcionales de la planta. También se encuentran minerales, azúcares, antraquinonas o compuestos fenólicos de un gran poder antioxidante [3], [4], [10].

En Colombia, la principal variedad de sábila producida es *Aloe barbadensis Miller* y existen cultivos localizados en varios departamentos: Atlántico, Antioquia, Cundinamarca, Guajira, Magdalena, Tolima, Santander, Valle del Cauca y la Región Cafetera [5], [6]. Sin embargo se importa materia prima para la elaboración de productos a base de *Aloe vera*.

Actualmente en Colombia, existe un excelente potencial para producir *Aloe vera*. El cultivo de esta planta lo realizan en su mayoría pequeños productores; es importante mencionar que el desarrollo de la penca de sábila, su industrialización y producción no ha sido homogéneo en el país pero existe un interés por el gobierno nacional de consolidar la cadena productora de sábila la cual agrupara a todos los agentes que intervienen en su ejecución con el fin de potenciar su desarrollo competitivo y vincular beneficios para todos los actores [5], [11].

En la región cafetera el cultivo se inició en el año 2004, aprovechando de una parte las bondades del clima tropical y la excelente calidad de los suelos y de otra promoviéndola como una actividad multipropósito de beneficio social. En Risaralda, El cultivo se encuentra extendido en los municipios de Guática, Mistrató, Belén de Umbría, Santuario, Santa Rosa y Combia y en el municipio de Montenegro en el departamento del Quindío. El cultivo de *Aloe vera* se encuentra

dentro de la apuesta productiva regional: cadena de mercados verdes y biocomercio, en el programa de plantas aromáticas y medicinales. Desde su establecimiento, se ha realizado solamente una caracterización preliminar de los cultivos [7], [8], [12]. La que mostró, que si bien los suelos son aptos, hay problemas fitosanitarios, se tiene una gran incertidumbre en la comercialización de la materia prima, por no estar dentro de las reglamentaciones exigidas por el INVIMA [13], y hay una carencia de soporte técnico para productores y procesadores de *Aloe vera*. Siendo entonces necesario realizar investigaciones científicas que permitan alcanzar un mayor aprovechamiento de los beneficios del *Aloe vera*.

Por lo tanto atendiendo esta necesidad, se plantea el estudio comparativo del contenido de ácido ascórbico del mucílago de *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller.), de plantas cultivadas en diferentes municipios del departamento de Risaralda (Belén de Umbría, La Florida, Marsella, Mistrató y Santuario). Con el fin de ampliar el conocimiento sobre la composición de los cultivos de *Aloe vera* en Risaralda para contribuir a la diversificación de los usos y propiciar mayores oportunidades en el mercado nacional e internacional.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Realizar el estudio comparativo del contenido de ácido ascórbico por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE), del mucílago de *Aloe vera* (*Aloe barbadensis Miller.*) de plantas cultivadas en diferentes municipios del departamento de Risaralda (Belén de Umbría, La Florida, Marsella, Mistrató y Santuario) para contribuir, a la diversificación de los usos y propiciar mayores oportunidades en el mercado nacional e internacional.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Implementar metodologías de análisis cualitativo y cuantitativo mediante técnicas espectrofotométricas y/o cromatográficas para la vitamina C.
- Realizar el análisis del contenido de vitamina C del mucílago de *Aloe vera*, de plantas cultivadas en los municipios del departamento de Risaralda (Belén de Umbría, la Florida, Marsella, Mistrató y Santuario).
- Comparar el contenido de ácido ascórbico del mucílago de *Aloe vera*, de plantas cultivadas en Risaralda y establecer por criterios estadísticos las diferencias y/o similitudes por lugar de cultivo.

## 4. MARCO TEÓRICO.

### 4.1 GENERALIDADES DEL *Aloe vera*.

#### 4.1.1 Clasificación botánica del *Aloe vera*.

El *Aloe vera* es una planta perenne y xerofítica; la primera por que se desarrolla a largo plazo y la segunda porque se adapta a vivir en áreas de poca disponibilidad de agua y se caracteriza por poseer tejidos para el almacenamiento de agua, por lo tanto, prefiere las condiciones áridas muy secas, la mayoría de ellas se originan en el África [14], [15], [16].

El *Aloe* es una planta fanerógama (con flores), angiosperma de la familia de los liliáceos que pertenece a la especie de plantas crasas o suculentas de las cuales también forman parte las cactáceas [17]. Actualmente la clasificación botánica oficial se ha denominado por el nombre de *Aloe barbadensis* para el *Aloe* medicinal, mientras que *Aloe vera* queda como la denominación corriente (Ver tabla 1) [18]. El *Aloe barbadensis* Miller, fue el que se adoptó en este estudio.





Tabla 1. Clasificación botánica del *Aloe vera* [25].

<b>REINO</b>	Plantae
<b>SUB-REINO</b>	Tracheobionta (Plantas vasculares)
<b>DIVISIÓN</b>	Magnoliophyta o Angiospermae
<b>CLASE</b>	Liliopsida o Monocotyledoneae
<b>SUB-CLASE</b>	Liliidae
<b>ORDEN</b>	Asparagale
<b>FAMILIA</b>	<i>Aloaceae</i>
<b>GENERO</b>	<i>Aloe</i>
<b>ESPECIE</b>	<i>vera</i>

#### 4.1.2 Morfología del *Aloe vera*.

De alrededor de 400 especies de *Aloe* existentes, se ha demostrado científicamente que son cuatro tipos los que presentan mayores propiedades medicinales: *Aloe arborescens* Mill, *Aloe barbadensis* Miller, *Aloe ferox* Mill y *Aloe succotrina* (Ver tabla 2) [10], [19], [20].

**Tabla 2. Especies de *Aloe vera*.**

Especie*	Descripción	Sinónimos
<p><b><i>Aloe arborescens</i> Mill</b></p> 	<p>Tiene tallos de (1-3) m; hojas numerosas, en forma de rosetas terminales, curvadas, lanceoladas, de color verde con dientes firmes en el margen, con pedicelos florales de (3-4) cm. Perigonio cerca de 4 cm de longitud, cilíndrico, ligeramente comprimido sobre el ovario, de color naranja-rojo, con los lóbulos externos libres en la base. Ha sido exportada a muchos países tropicales y subtropicales como una planta ornamental [7], [15].</p>	<p><i>Aloe frutescens</i>, <i>Aloe natalensis</i> [21].</p>
<p><b><i>Aloe barbadensis</i> Miller</b></p> 	<p>Planta con tallo erguido, bien desarrollado de (30-40) cm de longitud, hojas elongadas, carnosas y ricas en agua, alcanzan una altura de (50 – 70) cm, presentan un ancho en la base de (5–7) cm, una coloración de verde oscuro a verde azulado de márgenes con dientes curvados hacia delante de (3–5) mm de longitud y (5 – 20) mm de distancia, las flores son tubulares, colgantes y amarillas. Puede haber de 12 a 16 hojas por planta. Las jóvenes son más o menos erectas, mientras que las de mayor edad son más anchas y bajas. La planta es madura cuando tiene cerca de 4 años y tiene un período de vida cerca de 12 años [14].</p>	<p><i>Aloe vera</i>, <i>Aloe vulgaris</i>, <i>Aloe perfoliata</i> [22].</p>
<p><b><i>Aloe ferox</i> Mill</b></p> 	<p>Arbusto perenne con un tallo de (2-3) m de altura, tiene numerosa hojas en forma de rosetas que son de color verde claro, ovaladas- lanceoladas, de (40-60) cm de largo, espinoso en las cimas y en los bordes; inflorescencia en racimo erecto de 60 cm de altura; con flores de perianto 2,5cm de longitud, de color rojo, amarillo o naranja [24].</p>	<p><i>Aloe capiensis</i>, <i>Aloe del cabo</i> [22], [23].</p>
<p><b><i>Aloe succotrina</i></b></p> 	<p>Planta caulescente, con tallo erecto, corto; hojas en forma de rosetas, lanceoladas, de color verde a gris-verde, en ocasiones con unas pocas manchas blancas; dientes marginales de (2-4) mm, firmes, blancos, distanciados hasta 10 mm. Inflorescencia de aproximadamente 1 m, racimos cilíndrico-acuminados, de (25-35) cm. Flores de color rojo con ápice verde. Tépalos libres hasta la base [24].</p>	<p><i>Aloe perryi</i> <i>Baker</i>, <i>Aloe purpurascens</i>, <i>Aloe sinuata</i>, <i>Aloe socotrina</i> [22], [23].</p>

\*Fuente: fichas.infojardin.com

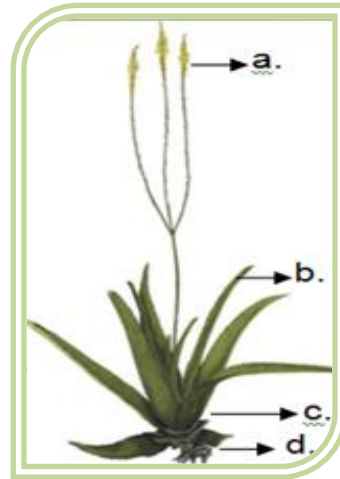
### 4.1.3 Fenología del *Aloe vera*.

Las especies de *Aloe* son plantas herbáceas o leñosas, arbustivas o a veces arborescentes, generalmente rizomatosas, con raíces tuberosas o con parte subterránea bulbosa (Ver tabla 3), en algunos casos con crecimiento secundario en grosor tipo anómalo [22]. Algunas especies son solitarias, otras se agrupan en formación [21].

**Tabla 3. Fenología del *Aloe vera*.**

<b>PARTES</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
<b>Raíz</b>	Es de (4 a 10) cm de largo y (4 a 5) cm de diámetro, formando un rizoma que puede ser dividido para propagar la planta. Cuando se corta el rizoma se da origen a una nueva planta [26], [27]. La rizósfera se concentra a una profundidad de (12 a 20) cm [26].
<b>Tallo</b>	Es corto y grueso de (30 a 40) cm de longitud [27], [28], alrededor van creciendo hojas en forma de rosetón hasta alcanzar alturas aproximadas de (1 a 3) m dependiendo de la especie [27], [29].
<b>Hojas</b>	Están agrupadas hacia el extremo; son simples, triangulares, suculentas, con punta estrecha, de (30 a 60) cm de largo, de (5 a 12) cm de base y de (0,8 a 3) cm de espesor. Los bordes de las hojas tienen dientes afilados, triangulares alrededor de 2 mm de largo presentando diferentes tonalidades de verde [30], [31], [32].
<b>Flores</b>	Son de (2,5 a 3) cm de largo, agrupadas en racimos en un solo tallo vertical aproximadamente de 1 m de largo [26]. Poseen una coloración amarillo-limón con líneas verde-manzana, colores que cambian a amarillo-ocre a medida que transcurren los distintos estados de maduración [14]. Sus corolas se componen de 6 pétalos, que forman la cubierta floral y se sueldan todas entre sí en un tubo. Están dispuestas en racimos que pueden ser verticales o colgantes. Los estambres salen fuera del cáliz, estos son 6, con largos filamentos que arrancan del fondo de la flor, debajo del pistilo [29].
<b>Fruto y semilla</b>	Es seco con una capsula oblonga de paredes dehiscentes (las anteras de la flor y el pericarpio del fruto se abren para dar salida al polen y a las semillas híbridas) [29]. Sus semillas son elipsoidales y aplanadas [14]; no son fértiles, por lo que no se pueden usar para propagar la planta [27].

El *Aloe barbadensis* Miller (Ver figura 1), tiene una coloración amarillenta en sus flores, los estambres con largos filamentos que arrancan del fondo de la flor, debajo del pistilo. El fruto es seco, con una cápsula de paredes dehiscentes (lo que quiere decir que las anteras de la flor y el pericarpio del fruto se abren para dar salida, el primero al polen y el segundo a las semillas) [18].



**Figura 1. Fenología del *Aloe barbadensis* Miller a. Flor; b. Hoja; c. Tallo; d. Raíz**

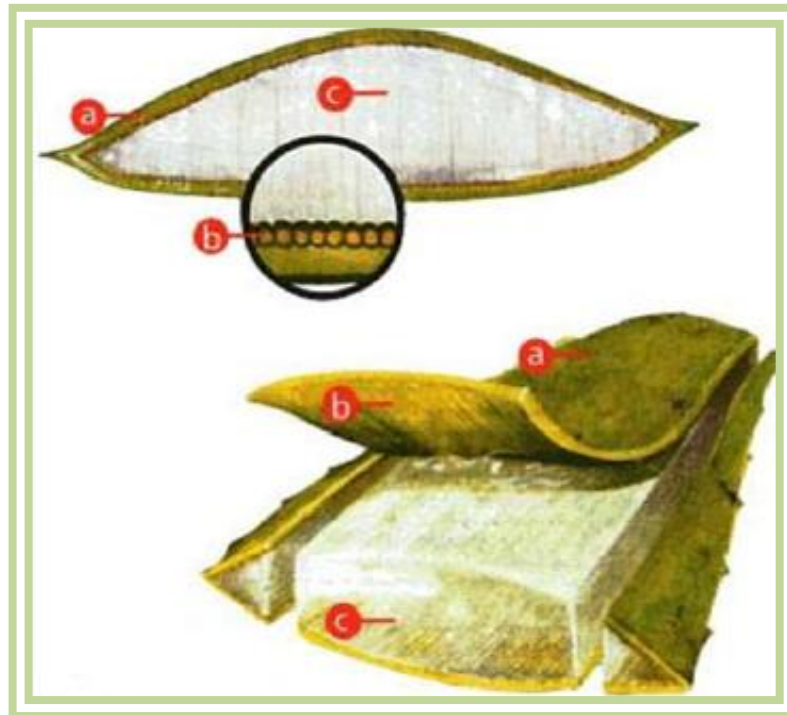
Fuente: [justaloe.blogspot.com](http://justaloe.blogspot.com)

#### **4.1.4 Estructura de la hoja de *Aloe vera*.**

La planta tiene hojas carnudas triangulares con bordes dentados. Cada hoja está compuesta por tres capas:

- a) Capa externa o corteza:** tiene una función de proteger y sintetizar carbohidratos y proteínas. Dentro de la corteza hay ramilletes vasculares responsables del transporte de sustancias como agua y almidón [6].
- b) Vainas vasculares:** las vainas vasculares están dispuestas a modo de nervios en la parte más exterior de la hoja pegando con la capa externa, ricas en aloína. Las vainas vasculares intermedias están formadas por haces de células poligonales [17].
- c) Centro de la hoja:** contiene células delgadas en las paredes del parénquima que producen un líquido claro ligeramente viscoso (mucilaginoso) conocido como el gel de *Aloe*. Las funciones principales del interior de la hoja es el almacenamiento de agua, carbohidratos y minerales que la planta usa como energía [33].

En la figura 2 se distinguen claramente los tejidos de fuera hacia dentro.



**Figura 2. Estructura y corte transversal de la hoja de *Aloe vera*.**  
**a. Capa externa o corteza, b. Vainas Vasculares c. Centro de la hoja.**

Fuente: Taringa.net. *Aloe vera* – Planta Medicinal

#### **4.1.5 Proceso fotosintético del *Aloe vera*.**

El *Aloe* al ser una planta suculenta tiene una extraordinaria capacidad para absorber y retener la poca agua que pueda haber en el suelo, incluso del rocío. Para ello dispone de una red de raíces muy desarrollada y muy cerca de la superficie [17].

Normalmente una planta abre los estomas durante el día para captar el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) que intervendrá en los procesos fotosintéticos.

El *Aloe* presenta un curioso proceso metabólico, una variante fotosintética llamada CAM. Básicamente se caracteriza por que los estomas se abren de noche y se cierran de día (Ver figura 3), evitando así la evapotranspiración a través de los estomas, ya que la humedad relativa es más alta y las temperaturas son más bajas. Constituyendo un mecanismo adaptativo y una ventaja ecológica en lugares donde el factor limitante es el agua [17].

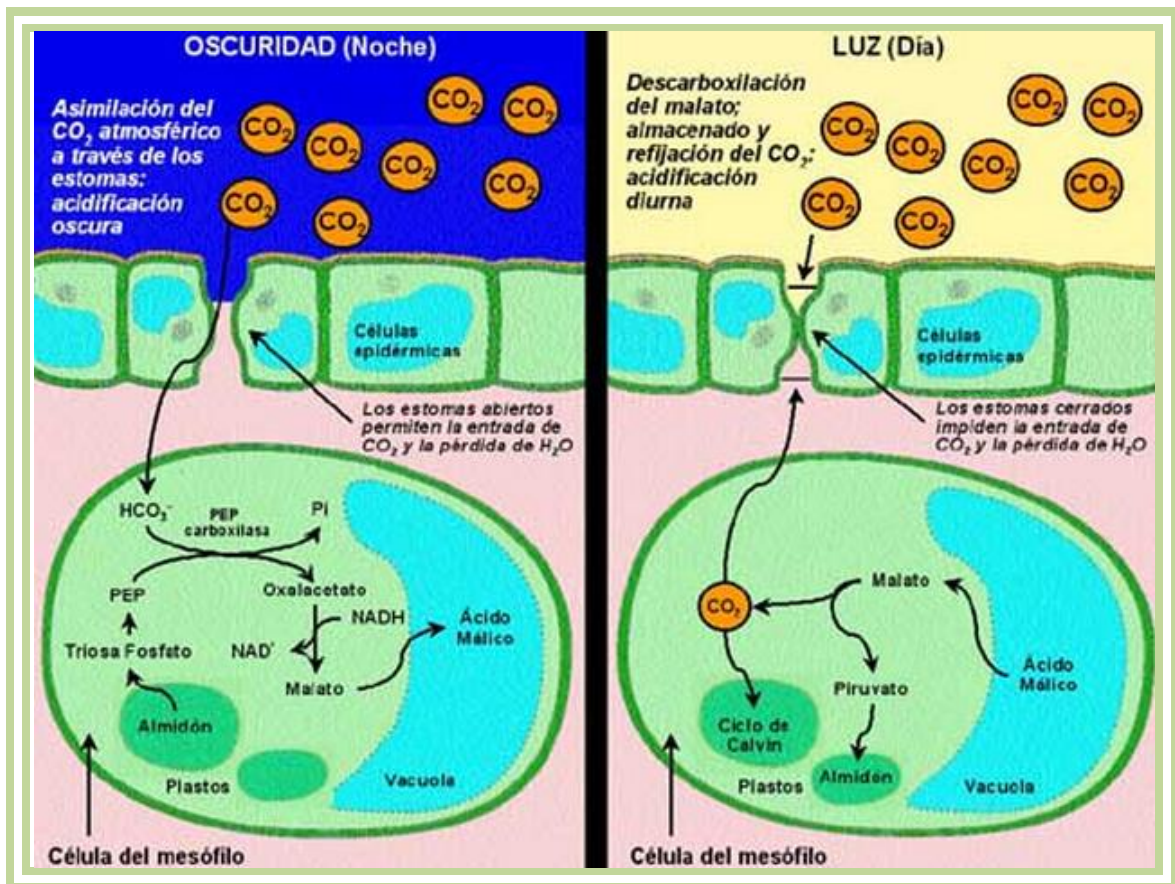


Figura 3. Proceso metabólico del *Aloe vera* (variante fotosintética CAM).

Fuente: Consultatodo.com/aloevera

#### 4.1.6 Composición química del mucílago de *Aloe vera*.

Su composición y propiedades físico-químicas y farmacológicas pueden variar en función de la lluvia o el riego, del terreno, de la época de recolección y acopio de las hojas, de su edad, y según la forma de obtención del gel y su almacenamiento. Un 99,4% del peso del mucílago de *Aloe vera* es agua. Más del 60% de sólidos totales son polisacáridos mucilaginosos ligados a azúcares; y los sólidos restantes también pueden contribuir a su actividad terapéutica [14], [34], [35], [36].

En la tabla 4 se presentan los principales componentes de los sólidos totales y sus principales características.

**Tabla 4. Composición química del mucílago de *Aloe vera* y sus características.**

COMPONENTES		CARACTERISTICAS
<b>Vitaminas</b>		Al igual que otros vegetales, el <i>Aloe vera</i> es rico en vitaminas y tiene un bajo contenido de grasa y alto en fibra, que son responsables de sus usos terapéuticos y propiedades funcionales como antioxidantes [37].
<b>Enzimas</b>		La catalasa integra parte del sistema antioxidante y es importante ya que su función es destruir el H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> generado durante el metabolismo celular [4].
<b>Minerales</b>		Actúan como biocatalizadores que permiten la transformación química de sustratos, a partir de los cuales se producen los diferentes componentes necesarios para los procesos vitales [39].
<b>Glúcidos</b>	<b>Polisacáridos</b>	Forman el 25% de la fracción sólida [29]. Se ha demostrado que los polisacáridos, contribuyen a la actividad farmacológica en la estimulación de la proliferación celular y en actividades biológicas como anti - inflamatorias, antivirales, inmunomoduladoras, anti-ulcerativas, desinfectante, cicatrizante y como anti-oxidante [20], [40], [41],[42].
	<b>Monosacáridos</b>	

<b>Aminoácidos</b>		Lisina, valina, cisteína, glicina, fenilalanina, metionina, leucina, ácido aspártico, ácido glutámico, arginina y serina [38].	El <i>Aloe vera</i> proporciona 20 de los 22 aminoácidos requeridos por el cuerpo humano y 7 de los 8 aminoácidos esenciales que el cuerpo no sintetiza [29], [33].
<b>Compuestos fenólicos</b>	<b>Derivados hidroxiantracénicos</b>	Aloína, <i>áloe</i> emodina, 4-Hidroxialoína, 5-hidroxialoína.	Ejercen una amplia gama de actividades biológicas como: antifúngico, antimicrobiano, anticancerígeno y antioxidante [43]. Funcionan como analgésicos y poseen potentes propiedades antibióticas, tanto para virus como para bacterias [38].
	<b>Derivados cromónicos</b>	Aloesina, aloeninas A y B, aloeresina A y B, 8-C-glucosil-7-o-metil-(s) aloesil.	

#### 4.1.7 Usos del *Aloe vera*.

Históricamente, el *Aloe* ha sido utilizado en la medicina tradicional para el tratamiento de muchas enfermedades [44].

Durante los últimos 30 años se han emprendido en diferentes partes del mundo programas dedicados a la investigación de la planta denominada *Aloe vera* debido a sus propiedades físicas y químicas que tienen aplicación tanto en la industria cosmética como en la medicina natural, generando una gran demanda comercial en el ámbito mundial [7].

La industria del *Aloe vera* ha creado el International Aloe Science Council (IASC), que financia estudios científicos, con el fin de dilucidar el enigma de la eficacia de esta planta que no puede asignarse a ningún componente en particular, sino a un efecto sinérgico del conjunto de sus componentes [45].

Las aplicaciones, usos y propiedades se describen en la tabla 5, mediante algunos estudios realizados al *Aloe vera*.

**Tabla 5. Algunos estudios relacionados con las aplicaciones, usos y propiedades del *Aloe vera*.**

PAÍS	ESTUDIO	OBJETIVO	RESULTADOS
México 2011.	Estudio antimicrobiano del <i>Aloe vera</i> .	Evaluar las propiedades antimicrobianas de un extracto acuoso de <i>Aloe vera</i> en el hongo <i>Aspergillus niger</i> .	El compuesto liofilizado de <i>Aloe vera</i> , en las concentraciones utilizadas (30, 50, 70) mg/L, no presentó efecto inhibitorio sobre el crecimiento del hongo <i>Aspergillus niger</i> [46].
Colombia 2009.	Conservación de fresa ( <i>fragaria x ananassa duch cv. camarosa</i> ) mediante la aplicación de recubrimientos comestibles de mucílago de <i>Aloe barbadensis Miller</i> .	Obtener un recubrimiento comestible a partir del gel de <i>Aloe vera</i> para prolongar la vida útil de las fresas.	Se logró aumentar la vida útil de las fresas frescas en 10 días, disminuyendo las pérdidas de humedad [47].
Venezuela 2008.	Antraquinonas en <i>Aloe vera barbadensis Miller</i> de zonas semiáridas de Falcón Venezuela, como inhibidores de corrosión	Aislar la resina del <i>Aloe vera</i> , y determinar su acción inhibitoria de corrosión en el acero.	Se aislaron y caracterizaron tres grupos de compuestos de antraquinonas responsables de la actividad inhibitoria [48].
México 2007.	Proceso de Biotransformación Láctica de jugo de <i>Aloe vera</i> .	Estudiar un bioproceso para la biotransformación de cepas probióticas, evaluar los niveles de producción de ácido láctico	Se comprobó que el <i>Aloe vera</i> es un buen sustrato para promover la producción de ácido láctico, el jugo tiene propiedades inhibitorias para <i>Salmonella sp.</i> y <i>Escherichia coli</i> [49].
Perú 2007.	Efecto protector del <i>Aloe vera</i> (sábila) en lesiones gástricas inducidas con etanol en ratas.	Determinar el efecto citoprotector del gel de <i>Aloe vera</i> sobre la mucosa gástrica y compararla con la del sucralfato en animales de experimentación.	El tratamiento con <i>Aloe vera</i> redujo significativamente el porcentaje de área hemorrágica con respecto al grupo control. Respecto a la profundidad de lesión, no existen diferencias significativas entre los valores promedios del grupo sucralfato y el grupo <i>Aloe vera</i> [50].

Cuba 2006.	Gel de <i>Aloe vera</i> (L). N.L. <i>Burm.</i> y harina de Sagú como soporte sólido de medio de cultivo para plantas medicinales	Estudiar el comportamiento del gel de <i>Aloe vera</i> y harina de sagú, como soporte sólido del medio de cultivo de plantas medicinales	Se demostró que es posible la sustitución total o parcial del agar empleado tradicionalmente, se logra un beneficio económico [51].
Venezuela 2003.	Estudios <i>In-vitro</i> de los mecanismos foto-oxidantes y antioxidantes de los principios activos del <i>Aloe vera</i> .	Determinar la fototoxicidad <i>in vitro</i> sobre eritrocitos humanos, y la capacidad antioxidante de los principios activos del <i>Aloe vera</i> : emodina aloe-emodina y rheina.	La capacidad de desactivar radicales libres fue evidenciado para la emodina y rheina, siendo similar a las de la vitamina E y C. Mientras que la capacidad antioxidante del <i>áloe</i> -emodina fue mucho menor que las anteriores [52].
Cuba 2002.	Obtención y caracterización preliminar de un extracto de <i>Aloe vera</i> L. con actividad antiviral.	Caracterizar y determinar la efectividad de un extracto de <i>Aloe vera</i> L. frente al virus <i>Herpes simplex</i> tipo I	Se concluyó que el extracto, presenta actividad antiviral <i>in vitro</i> con una toxicidad media de (3,8± 0,3) mg/mL y dosis efectiva de (0,8 ±0,05) mg/mL según las condiciones ensayadas [53].
Venezuela 2001.	Efecto de un enjuague bucal compuesto de <i>Aloe vera</i> en la placa bacteriana e inflamación gingival.	Identificar y comparar los índices de placa e inflamación gingival antes y después del uso continuo de un enjuague bucal elaborado con gel de <i>Aloe vera</i> al 50%.	Luego de 30 días de uso del enjuague se observó una disminución significativa en los índices de placa bacteriana e inflamación gingival demostrando su acción bactericida y antiinflamatoria [54].

#### 4.1.8 Establecimiento del cultivo de *Aloe vera*.

##### 4.1.8.1 Condiciones edafoclimáticas del *Aloe vera*.

El *Aloe vera* crece libremente en climas que van de tropicales y subtropicales a desérticos. Aunque puede establecerse y sobrevivir en suelos pobres, se desarrolla mejor en los suelos secos, arenosos y cálcicos, de un pH ligeramente alcalino, con buen drenaje y preferiblemente sin heladas, pues se ha comprobado que las bajas temperaturas producen cambios de color en la planta y generan algún grado de disminución en la producción final del gel [6].

En la tabla 6 se describen las condiciones edafoclimáticas en las que esta planta prolifera mejor.

**Tabla 6. Condiciones edafoclimáticas del *Aloe vera* [6].**

PARAMETRO	CONDICIÓN
Clima	seco
Precipitación	(400 - 2500) mm/año
Humedad relativa	(65 – 85) %
Temperatura	(18 – 40) °C
Altitud	(20 - 2500) msnm
Suelos	Franco-arenoso-árido-cálcico
Topografía	Suelos planos

#### **4.1.8.2 Plantación del *Aloe vera*.**

El *Aloe vera* requiere ser plantada a plena exposición solar pues necesita alta luminosidad para su desarrollo (aunque la luz directa hace que las hojas se tornen marrones), preferiblemente se debe seleccionar lugares libres de heladas, suelos profundos, ricos en materia orgánica y con buen drenaje [17], [18]. El *Aloe vera* se planta a una profundidad de (20 hasta 50) cm y el distanciamiento de la siembra se recomienda de 70 cm entre plantas y 1 metro entre surcos (Ver figura 4), esto con el fin de facilitar las labores de deshierbe y para que las pencas tengan un buen desarrollo [6].



**Figura 4. Plantación de *Aloe Vera*.**

Fuente: Del autor mediante visita a cultivos de *Aloe vera*. Belén de Umbría, Risaralda.

#### **4.1.8.3 Fertilización y riegos.**

Aunque la planta no es muy exigente en nutrientes es conveniente al trasplantarse incorporar de (2-3) Kg de materia orgánica por metro cuadrado en la preparación del terreno previo a la plantación, debido a que incrementa la capacidad de retención de humedad del suelo. En la actualidad se puede utilizar diversos abonos como el estiércol bien descompuesto o cenizas, bagazo o cáscara de hoja de *Aloe* y otros a base de nitrógeno y fósforo [6], [17], [30]. En Colombia, se usan abonos como el maní forrajero; que ofrece propiedades como el nitrógeno al suelo y sirve como abono permanente, reduciendo gastos de mantenimiento en muchas ocasiones [6].

Es también apropiado efectuar riegos espaciados, en ausencia de precipitaciones, aunque cuidando que el agua no se acumule, dada la susceptibilidad de estas plantas a su exceso. Estudios realizados en Venezuela han permitido constatar que un nivel elevado de fertilidad acompañado de un nivel bajo de humedad, determinaron la mayor acumulación de biomasa, mientras que el rendimiento de látex y gel seco fue elevado cuando las plantas recibieron una combinación de baja frecuencia de riego y alta fertilidad o frecuente riego sin aplicación de fertilizante [17].

#### **4.1.8.4 Control de malezas.**

En el control de malezas es importante el deshierbe alrededor de cada planta lo que permitirá que se aproveche el agua que hay en el sitio. Se debe evitar el uso de herbicidas, ya que podrían dañar las propiedades curativas del *Aloe* [55], [56].

#### **4.1.8.5 Prevención de plagas y enfermedades.**

La aparición de enfermedades bacterianas y fungosas, inciden directamente en la cantidad y calidad del producto, causando un impacto socioeconómico desfavorable [57]. Los daños provocados en la producción son los siguientes:

- Cuando atacan a la penca, ésta pierde valor comercial, ya que se forman manchas.
- El tejido se licua, se seca y finalmente se parte la penca, razón por la cual no es seleccionada para la extracción del ácibar o gel.
- Si la raíz es invadida por los patógenos, se afecta la planta completa, causándole marchitez al no permitir el paso de nutrientes y puede causar hasta la muerte de la planta.

- Reducción del rendimiento por hectárea y aumento de los costos de producción.

Para lograr identificar otros problemas en cuanto al cuidado de la planta vale la pena tener en cuenta los siguientes síntomas [17]:

- Cuando las hojas se encuentran dobladas, significa que hay exceso de agua, se recomienda realizar riegos más esporádicos o en menos cantidad.
- Si las hojas se tornan de color marrón, significa exceso de luz solar, se recomienda realizar un filtro de luz donde la planta quede igual de iluminada, pero que no reciba los rayos solares directamente.
- Si la planta tiene hojas más horizontales que verticales, es por exceso de retoños, se recomienda trasplantarlos para que estos se desarrollen por separado en mejores condiciones.
- Si se observan hojas delgadas, rizadas y plegadas hacia el interior, esto significa falta de agua y es recomendable regar con más frecuencia o mayor cantidad.
- La aparición de hojas podridas en la base, se debe al exceso de agua o drenaje insuficiente.
- La aparición de hojas con manchas oscuras, es el producto de agua de riego excesivamente fluorada, es recomendable hacer una análisis a las aguas de riego.

En la figura 5 se ilustra tanto la marchitez de las hojas como la pudrición de la raíz y en la tabla 7 se describen las enfermedades causadas por patógenos en la producción de sábila.



**Figura 5. Infestación en *Aloe vera*.**

Fuente: [sian.inia.gob.ve/FonaiapDivulga/zabila](http://sian.inia.gob.ve/FonaiapDivulga/zabila)

**Tabla 7. Daños causados por patógenos en el *Aloe vera*.**

TIPO DE INFESTACIÓN		AGENTE CAUSAL	SINTOMAS	TRATAMIENTO
BACTERIANA	Bacteriosis	<i>Erwinia sp.</i>	Se caracteriza por presentar necrosis seca en las hojas, que forman grandes parches irregulares a lo largo de la lámina foliar. El pseudotallo manifiesta manchas necróticas, pero en un grado menos avanzado con un halo acuoso en la etapa inicial [57].	Se combate con azufre, en una concentración de 4g/L de agua, aplicándose semanalmente hasta la desaparición de la enfermedad [6].
	Marchitez Bacteriana	<i>Oidium</i> ("mal blanco"); <i>Bacterium Aloes</i> Pass.	Da la apariencia de un moho blancuzco que se difunde por las hojas. Marchitez de las puntas de las hojas [18].	
FÚNGICA	Marchitez o fusariosis	<i>Fusarium sp</i> ; <i>Phytophthora sp</i> ; y <i>Sclerotiumsolani</i> .	Causan una curvatura hacia abajo. Provocan daños en el cuello de las plantas y en el sistema radical, ocasionando que las mismas se decapiten, sequen y mueran. Dan una coloración que va desde el rojizo hasta el café [17].	Para la marchitez bacteriana y la pudrición de la raíz se recomiendan prácticas preventivas que eviten la humedad como mantener aireado el suelo y la erradicación de plantas enfermas, tratamiento del suelo con calor (aguas calientes y/o
		<i>Colletotrichum sp</i> , <i>Cladosporium sp</i> y <i>Curvularia sp</i> .	Producen manchas en la superficie y en los bordes, así como endurecimiento de las puntas de las hojas [17].	

	<b>Pudrición del tallo y de la raíz</b>	<i>Phytiumaltimum</i> Trow;	Se manifiesta como un amarillento de las hojas, empezando por la zona apical [55].	solarizadas), y resiembra con hijos previamente seleccionados y podados [17], [18].
		<i>Rhizoctonia sp,</i>	Lesiones oscuras (necróticas) en la base del tallo, lo que interrumpe el flujo de la savia en la parte afectada, causando la muerte de la planta [55].	
<b>PARASITARIA</b>		Cochinillas y sus larvas	Se albergan en la grietas de las rosetas atacando después las raíces por debajo del suelo	Infecciones moderadas pueden ser fácilmente controladas con aplicaciones semanales de Dióxido de Cobre, tal como una mezcla de Bordeaux o una solución al 10 % de Formalina y jabón líquido [6].
<b>INSECTOS</b>		Hormigas arrieras, caracoles y babosas.	Se comen los retoños y las partes sensibles que quedan descubiertas cuando se desprenden las hojas maduras [56].	Para este tipo de ataques, se recomienda aplicar una mezcla homogénea de molusquicida orgánico que consiste de: 70% aserrín, 10% ceniza, 10% sal y 10% tierra de diatomea [6].

#### 4.1.8.6 Reproducción.

El *Aloe vera* se propaga principalmente a través de los numerosos hijuelos que crecen a su alrededor, los cuales pueden ser trasplantados con facilidad, estos hijuelos deben ser plantados directamente en el terreno cuando alcancen una altura de unos 10 o 20 centímetros [40].

En Colombia se usa la propagación por hijuelos, los cuales pueden ser recolectados de las poblaciones silvestres o provenientes de cultivo de explotación [55].

#### 4.1.8.7 Ciclo productivo y recolección.

La recolección de hojas comienza a partir de los 18 meses de plantadas, la cosecha se puede efectuar durante todo el año, cortando siempre las hojas inferiores. La operación se efectúa de forma manual. Las plantas se pueden cosechar cada 6 a 8 semanas quitando de 3 a 4 hojas por planta. Por lo que su ciclo productivo puede variar de 4 a 10 años dependiendo del cuidado y su cosecha. El ciclo productivo del *Aloe vera* termina cuando las pencas pierden calidad y volumen [18].

#### 4.1.9 Producción y comercialización del *Aloe vera*.

En el año 2004 el International Aloe Science Council [IASC] (Ver figura 6), realizó las estadísticas para calcular la producción mundial de *Aloe vera* y aunque no logra abarcar la totalidad de la industria mundial, si ofrece una percepción de este sector para los últimos años [6].



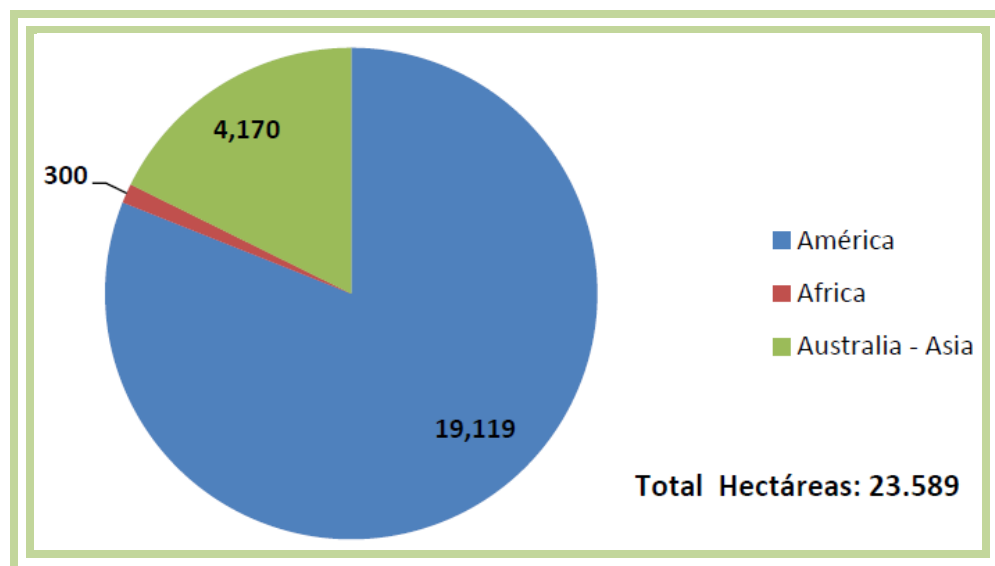
**Figura 6. Sello de certificación IASC.**

Fuente: [iasc.org](http://iasc.org)

#### 4.1.9.1 *Aloe vera* en el mundo.

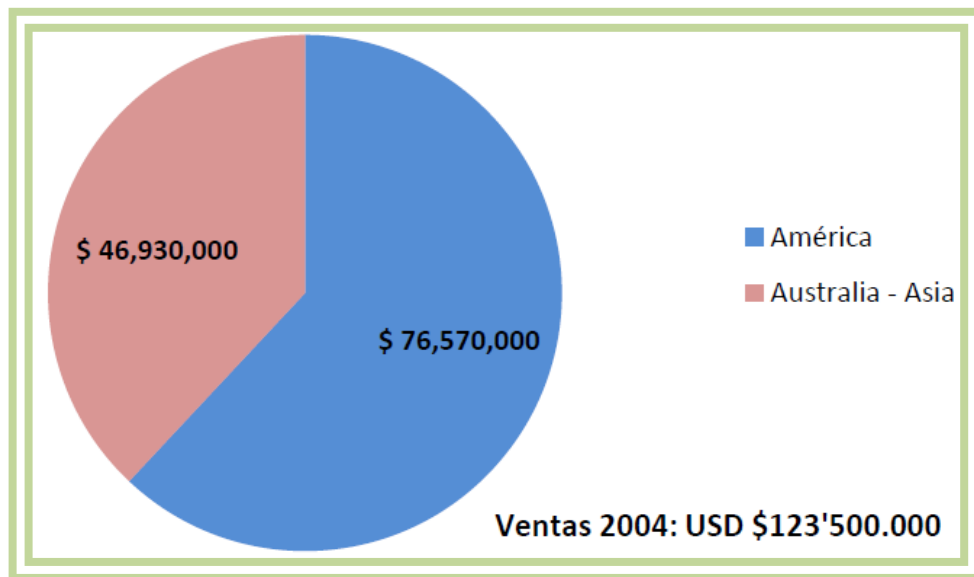
A nivel mundial existe un evidente predominio en cuanto a hectáreas cultivadas por parte del continente americano, pues este logra el 81% de participación en esta actividad, dejando muy por detrás a la región comprendida por Australia y Asia; quienes en conjunto obtienen una participación del 18% de las hectáreas cultivadas en el mundo. En el continente asiático cabe resaltar el protagonismo que ha adquirido China, pues aportó el 47% de la siembra, es decir 2.000 hectáreas. Tailandia también se hace fuerte con una participación del 36%, mientras que India, Malasia y Australia conforman el 17% restante en esta parte del mundo. Y una pobre participación del continente africano con tan solo 300 hectáreas cultivadas (Ver figura 7) [6].

Si bien la cantidad de hectáreas cultivadas por continente o país ofrece una idea general de la importancia que el *Aloe vera* ha tomado a nivel mundial; es a través de cifras monetarias que se identifica aquel o aquellos países que han sabido aprovechar el potencial de la planta para transformarla y agregar valor en distintos eslabones de la cadena productiva. En la figura 8 se ilustra el mercado internacional de este cultivo, con una gran demanda principalmente en Hong Kong, Estados Unidos, Japón y Europa (en especial países como Alemania, Holanda, Francia e Italia), donde se comercializa la sábila con industrialización en gel o liofilizada [6].



**Figura 7. Cultivos de *Aloe vera* en el mundo.**

Fuente: Datos tomados de IASC.org. Censo 2004

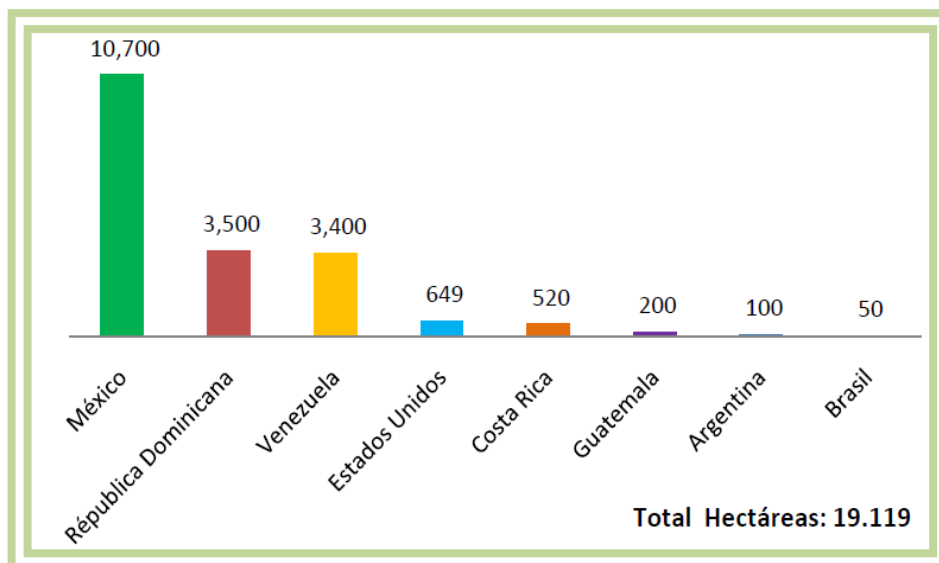


**Figura 8. Mercado internacional de *Aloe vera*.**

Fuente: Datos tomados de IASC.org. Censo 2004

#### 4.1.9.2 *Aloe vera* en América.

En la figura 9 se puede observar que México aporta el 56% de las hectáreas cultivadas en la región y se posiciona también como el mayor cultivador de sábila en el mundo. República Dominicana y Venezuela aportan superficies cultivadas muy similares para el año estudiado, y obtienen a nivel mundial el segundo y tercer puesto en hectáreas cultivadas respectivamente [6].

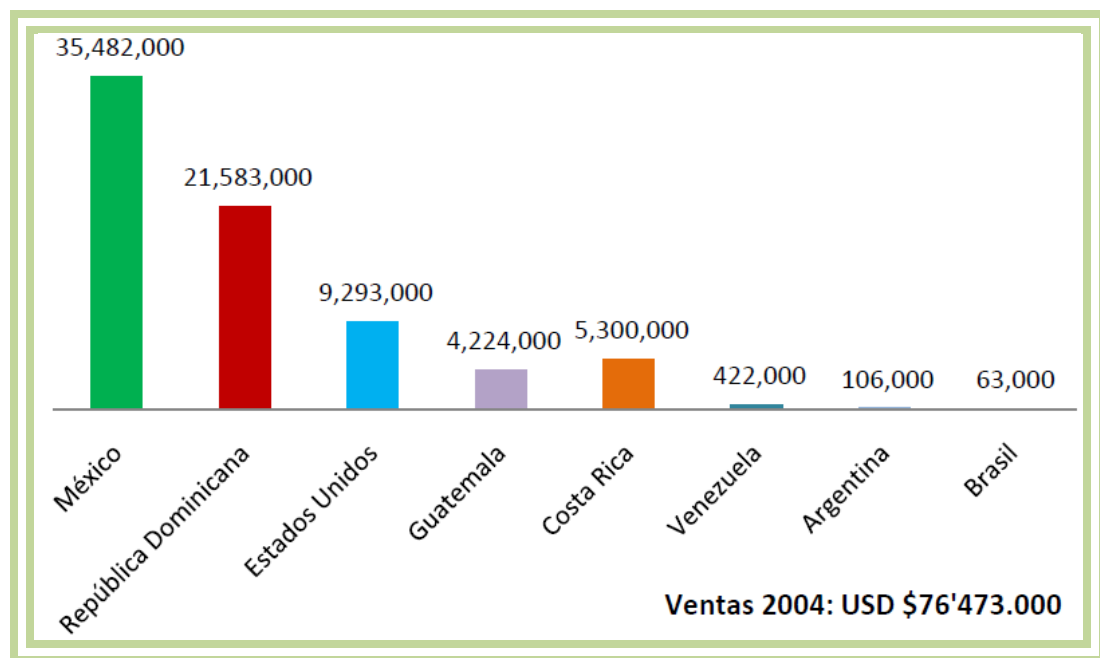


**Figura 9. Cultivos de *Aloe vera* en América.**

Fuente: Datos tomados de IASC.org. Censo 2004

La situación de América en cuanto a ventas de gel de *Aloe vera*, varía según la participación del mercado en la región (Ver figura 10), pues aunque México y República Dominicana siguen manteniendo los primeros lugares, su aporte al mercado ya no es tan significativo como en el rubro de cultivo por hectáreas. Estados Unidos, por el contrario, demuestra su enfoque por generar valor agregado en productos derivados de la planta de *Aloe vera* y se posiciona en el tercer lugar de participación en ventas de gel de *Aloe* en la región [6].

En el ámbito B2B (Business to Business) destacan por su exitoso desarrollo y actual volumen de operación unas cuantas empresas que han enfocado su estrategia de negocios en la producción de concentrados (líquidos o en polvo) de gel para uso como insumo de la industria cosmética, la farmacéutica y la nutracéutica. Entre otros, se puede mencionar en este ámbito a Terry Labs (uno de los pioneros en el área), Concentrated Aloe Corporation, Caraloe, Aloe Star, Aloecorp, etc. Todas estas empresas administran sus propias plantaciones, la mayoría de las cuales excede las 400 hectáreas para asegurar la continuidad del flujo y la calidad de la materia prima requerida [6].



**Figura 10. Mercado de *Aloe vera* en América.**

Fuente: Datos tomados de IASC.org. Censo 2004

#### 4.1.9.3 *Aloe vera* en Colombia.

La cadena productiva de la sábila en el orden nacional es una de las más jóvenes y consolidadas, sin embargo ha tenido un desarrollo significativo y se ha constituido como una alternativa de rentabilidad para los campesinos. Si bien Antioquia y Magdalena son los departamentos pioneros en avances de certificación, producción, industrialización, gestión financiera y comercialización de este producto, otros territorios como el eje cafetero que apenas está ingresando en el comercio de la sábila, han encontrado una alternativa rentable (Ver tabla 8) [6].

En Risaralda es muy reciente este cultivo a pesar de la oferta ambiental, los pisos térmicos y los climas propicios para ello. Especialmente los municipios de Guática, Belén de Umbría, Mistrató, Quinchía y Santuario producen una sábila de excelente calidad destacándose dentro de éstos las plantas en Guática que alcanzan los 70 centímetros de largo, 13 centímetros de ancho y un peso de 1.000 gramos por hoja por sus características de crecimiento precoz equivalente a mayor rentabilidad [17].

**Tabla 8. Distribución general de cultivos de penca de sábila en Colombia en hectáreas [17].**

DEPARTAMENTO	Ha	%	DEPARTAMENTO	Ha	%
Atlántico	150,50	37,04	Eje cafetero	7,91	1,95
Magdalena	96,20	23,68	Cesar	7,00	1,72
Cundinamarca	22,10	5,44	Putumayo	4,00	0,98
Boyacá	7,30	1,80	Nariño	4,00	0,98
Antioquia	26,00	6,40	Meta	2,00	0,49
Tolima	4,80	1,18	Casanare	2,00	0,49
Santander	36,00	8,86	Sucre	4,00	0,98
Valle del Cauca y Cauca	16,50	4,06	Bolívar	6,00	1,48
Guajira	10,00	2,46	<b>TOTAL</b>	<b>406,31</b>	<b>100</b>

Contribuyendo a la caracterización de las calidades y cualidades de las diferentes pencas que se producen en Risaralda, el grupo de Oleoquímica de la Universidad Tecnológica de Pereira, está interesado en aportar conocimiento técnico y científico a productores y transformadores, de tal manera que puedan tener un manejo adecuado de los cultivos, para llegar a ofrecer productos regionales competitivos a base de *Aloe vera*, que cumplan con los estándares de calidad, generando así mayores oportunidades en el mercado nacional e internacional.

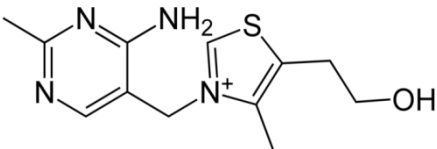
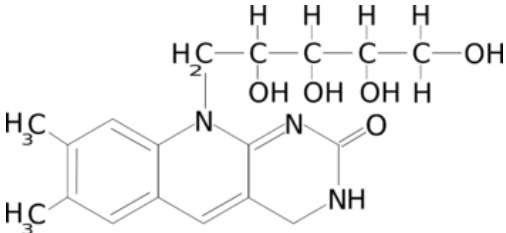
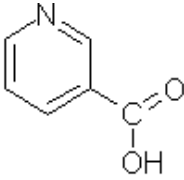
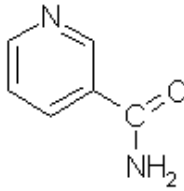
## 4.2 VITAMINAS DEL *Aloe vera*.

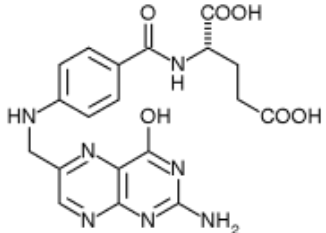
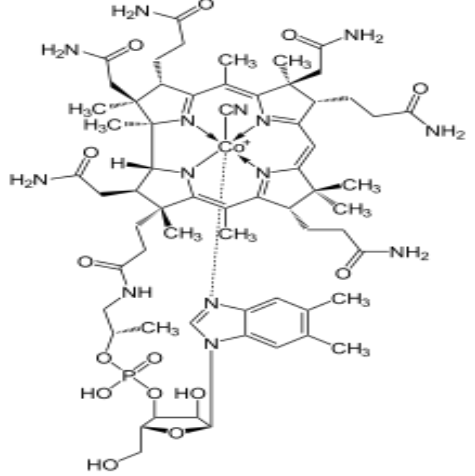
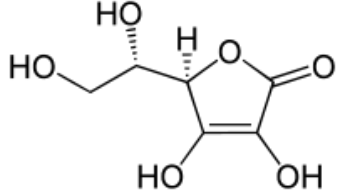
Las vitaminas han sido definidas como sustancias orgánicas presentes en diminutas cantidades en los alimentos naturales. Aunque tienen estructuras químicas, fuentes, requerimientos y mecanismos de acción diferentes, se pueden clasificar de acuerdo a su solubilidad en dos grandes grupos [58]:

- Vitaminas hidrosolubles: complejo vitamínico B y vitamina C.
- Vitaminas liposolubles: vitamina A, vitamina D, vitamina E y vitamina K.

El *Aloe vera* contiene algunas vitaminas hidrosolubles (Ver tabla 9) como: tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), ácido fólico (B9) y ácido ascórbico (vitamina C); y entre las liposolubles las vitaminas A y E. Algunas investigaciones sugieren que también presenta trazas de vitamina (B12) [4].

**Tabla 9. Vitaminas hidrosolubles del *Aloe vera* [4].**

Vitamina	Composición	Función	Estructura*
B1	Tiamina	Coenzima que interviene en las reacciones de transferencia de grupos aldehídos de dos carbonos.	
B2	Riboflavina	Constituyente de los coenzimas FMN y FAD que intervienen en el metabolismo energético como transportadores de H <sup>+</sup> y electrones.	
B3	Niacina	Forma parte de los coenzimas NAD y NADP en las transferencias de H <sup>+</sup> y electrones en el metabolismo energético.	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Ácido Nicotínico</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Nicotinamida</p> </div> </div>

B9	Ácido fólico	Coenzima que interviene en el metabolismo de los ácidos nucleicos.	
B12	Cobalamina	Forma parte de un coenzima necesario en el metabolismo de proteínas y de ácidos nucleicos.	
C	Ácido ascórbico	Antioxidante.	

Fuente: Vitamins [58].

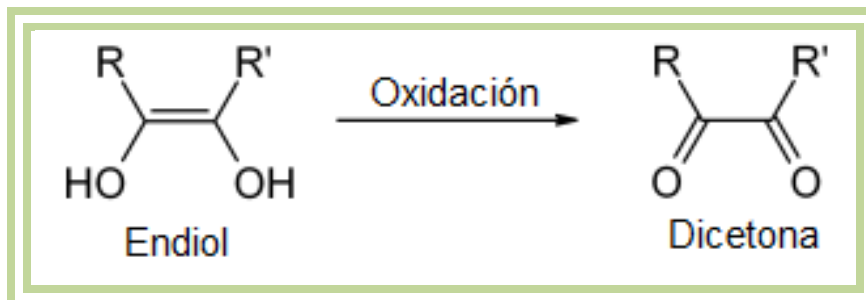
Algunos estudios señalan una concentración de la vitamina C en 101,3 mg / 100 g de material de *Aloe vera* aproximadamente [18], [73]. Por otra parte, se ha encontrado que la concentración de la vitamina C varía mucho entre los tipos de frutas y vegetales (Ver tabla 11) [59].

#### 4.2.1 Generalidades del Ácido ascórbico.

##### 4.2.1.1 Estructura.

El ácido ascórbico está relacionado con los azúcares de C6. Siendo el (R)-3,4-dihidroxi-5-((S)-1,2-dihidroxi-etil) furano-2(5H)-ona (nombre IUPAC), contiene varios elementos estructurales que contribuyen a su comportamiento químico: la estructura de la lactona y dos grupos hidroxilos enólicos, así como un grupo alcohol primario y secundario (Ver figura 12). La estructura endiol motiva sus

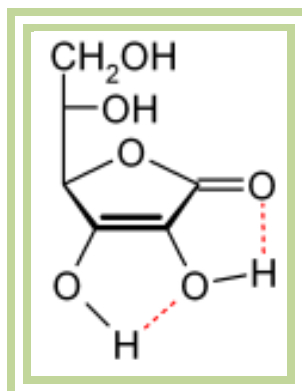
cualidades antioxidantes, ya que los endiols pueden ser oxidados fácilmente a dicetonas. Por eso, los endiols con grupos carbonilo vecinos se llaman también reductonas (Ver figura 11) [58], [60].



**Figura 11. Oxidación endiol a dicetona.**

Fuente: acidoascorbico.com

El ácido ascórbico forma dos enlaces de puentes de hidrógeno intramoleculares (mostrados en rojo en la figura 12) que contribuyen de manera decisiva a la estabilidad, y con eso a las cualidades químicas de la estructura endiol [60], [61].



**Figura 12. Estructura química del ácido ascórbico (estabilidad).**

Fuente: acidoascorbico.com

#### 4.2.1.2 Isomería.

El ácido ascórbico se comporta como un ácido carboxílico vinílico, en donde el doble enlace ("vinilo") transmite pares de electrones entre el hidroxilo y el carbonilo. Hay dos estructuras de resonancia para la forma desprotonada, que se diferencia en la posición del doble enlace. Otro modo de ver el ácido ascórbico es considerarlo como un enol. La forma desprotonada es un enolato, que por lo general es fuertemente básico. Sin embargo, el doble enlace adyacente estabiliza la forma desprotonada (Ver figura 13) [58].

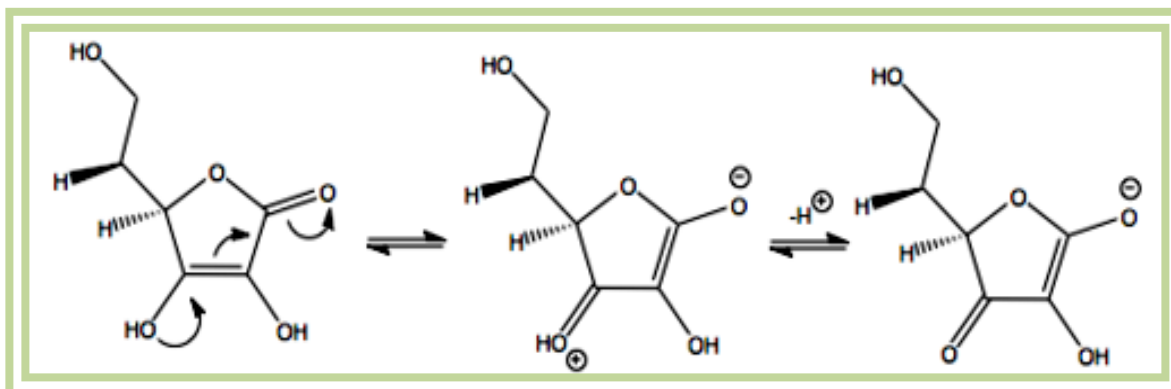


Figura 13. Movimiento de los pares de electrones en la desprotonación del ácido ascórbico.

Fuente: acidoascorbico.com

- **Tautomerismo:** el ácido ascórbico se interconvierte rápidamente en dos tautómeros de dicetona inestables por la transferencia de protón, aunque es más estable en la forma de enol. El protón del enol se pierde, y se adquiere de nuevo por los electrones a partir del doble enlace, para producir una dicetona. Esta es una reacción enol. Hay dos formas posibles: 1,2-dicetona y 1,3-dicetona (Ver figura 14) [58], [61].

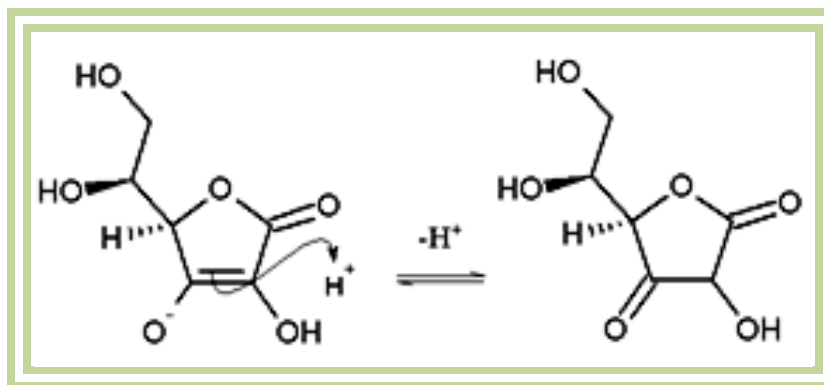


Figura 14. Ataque nucleofílico del enol ascórbico sobre el protón para dar 1,3-dicetona.

Fuente: acidoascorbico.com

- **Estereoquímica:** el ácido ascórbico existe en cuatro formas estereoisómeras diferentes que muestran actividad óptica (Ver figura 14). Las moléculas L- y D- de ácido ascórbico son enantiómeros entre sí, de igual forma, las moléculas L- y D- del isoascórbico. El ácido L-ascórbico y el D-isoascórbico son epímeros, ya que se distinguen sólo en la configuración de uno de los átomos de carbono (Ver figura 15). Sin embargo la forma natural de la vitamina es el

isómero L que posee propiedades nutricionales; el isómero óptico del carbono 4 D- tiene alrededor de 10% de la actividad del isómero L pero sin fines vitamínicos, al igual que el isómero óptico del carbono 5, el ácido iso-ascórbico [60].

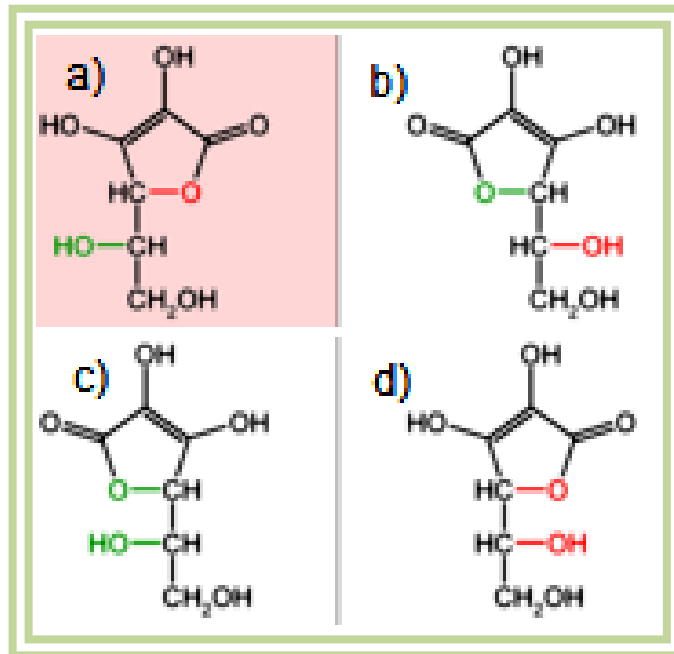


Figura 15. Estereoisómeros del ácido ascórbico.

a) Ácido L-ascórbico, b) Ácido D-ascórbico, c) Ácido L-isoascórbico, d) Ácido D-isoascórbico.

Fuente: acidoascorbico.com

#### 4.2.1.3 Abreviación.

Se tendrán en cuenta las siguientes abreviaciones:

- ácido ascórbico (AA),
- monoanión ascorbato (AH<sup>-</sup>),
- radical anión ascorbato (AH<sup>•-</sup>),
- ácido dehidroascórbico (ADA),
- ácido 2,3-dicetogulónico (DCG),
- metales (Me),
- cetotautómero (AH<sub>2</sub>- Ceto),
- anión ceto (AH- Ceto).

#### 4.2.1.4 Propiedades de la vitamina C.

A. Físicas. En la tabla 10 se resumen las propiedades físicas del AA.

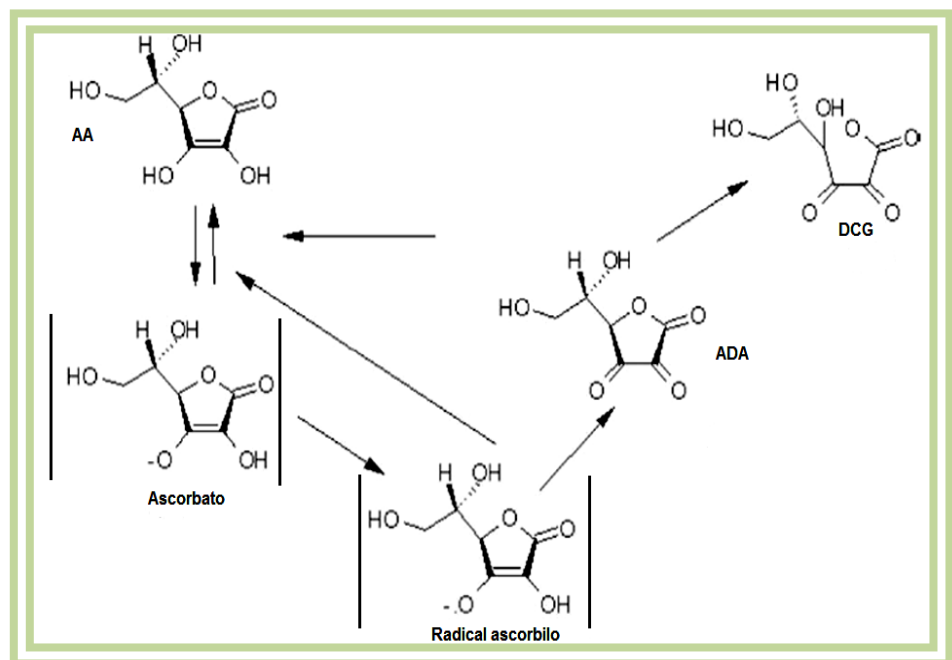
Tabla 10. Propiedades Físicas de la vitamina C [59].

PROPIEDAD	DESCRIPCIÓN
Apariencia	Sólido cristalino, blanco, inodoro, con sabor ácido fuerte
Fórmula /gmol masa	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> / 176,13
m.p. (°C)	190-192
Densidad, gml <sup>-1</sup>	1,65
pH	3 (5 gml <sup>-1</sup> ), 2 (50gml <sup>-1</sup> )
pK <sub>1</sub>	4,17
pK <sub>2</sub>	11,57
Potencial redox	Primera etapa: E <sub>1</sub> O + 0,166V
Solubilidad (gml <sup>-1</sup> )	
Agua	0,33
95% etanol	0,033
Glicerol	0,01
Grasas y aceites	Insoluble
Propiedades espectrales ultravioleta (UV)	
pH 2:	E <sub>max</sub> (1%,1cm),695 a 245 nm (sin disociar)
pH 6,4:	E <sub>max</sub> (1%,1cm),940 a 265 nm (forma monodisociada)

#### B. Químicas:

- **Acidez:** el AA posee propiedades ácidas y fuertemente reductoras. Tales propiedades se deben a su estructura endiol y a la posibilidad de ionizar el hidroxilo situado sobre el carbono 3, formando un anión que queda estabilizado por resonancia (Ver figura 13). Eventualmente, puede disociarse el hidroxilo del carbono 2, formando un dianión, aunque no adquiere la misma estabilidad que la del carbono 3 [60]. La deslocalización de los electrones -pi ( $\pi$ ) en los C2-C3 del sistema conjugado endiol estabiliza la molécula y hace que el hidrógeno del hidroxilo C3 sea muy ácido y se disocie con un pKa de 4,13. Por lo tanto, a un pH fisiológico, el AA existe como un anión monovalente (L-ascorbato). La disociación del segundo hidroxilo se lleva a un pH de 11,6 [59], [60].

- **Oxidación:** debido a su estructura química el AA es muy sensible a la degradación. El AA se oxida rápidamente a ácido dehidroascórbico (ADA), debido a la presencia de dos grupos hidroxilo en su estructura. Numerosos factores influyen en los mecanismos degradativos, entre ellos, la exposición al aumento de las temperaturas, el pH, la concentración de oxígeno, la acción enzimática, los catalizadores metálicos, la concentración inicial del ácido y la relación AA – ADA [60], [61]. El AA es estable cuando se seca, pero las soluciones se oxidan fácilmente, especialmente en presencia de pequeñas cantidades de cobre, hierro y álcali. La degradación del AA se lleva a cabo mediante procesos oxidativos que resultan de la transferencia de dos electrones. Primeramente se origina el monoanión ascorbato (AH<sup>-</sup>), el cual, con la pérdida adicional de un segundo electrón, forma el ADA, altamente inestable y susceptible a la hidrólisis del anillo lactona, que se hidroliza con gran facilidad para producir ácido 2,3-dicetogulónico (DCG) que no tiene ninguna función biológica y la reacción ya no es reversible [59], [60], [61]. Posteriormente se degrada por decarboxilación, con la consiguiente pérdida del valor nutricional del AA (Ver figura 16).



**Figura 16. Productos de degradación del ácido ascórbico.**

Fuente: Nováková, L y et al [61].

Hay tres vías de degradación del AA, la vía oxidativa catalizada, la vía oxidativa no catalizada y la vía bajo condiciones anaeróbicas:

- I. La *vía oxidativa catalizada* (Ver figura 17), está influenciada por la presencia de oxígeno e iones metálicos como hierro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) que actúan acelerando la velocidad de la reacción. El AA se degrada vía su monoanión ( $\text{AH}^-$ ), produciendo ADA. La velocidad de esta reacción depende de la concentración del catalizador metálico en presencia de oxígeno. Si la presión parcial de oxígeno disminuye, la reacción se estabiliza y posiblemente exista una oxidación directa por radicales hidroperóxidos ( $\text{HO}_2$ ) o peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Esta vía de degradación aeróbica implica la formación de un complejo metal-anión que se combina con el oxígeno para dar un complejo metal-oxígeno-ligando, el cual se descompone rápidamente para dar el radical anión ascorbato ( $\text{AH}\cdot$ ), el anión metálico original y  $\text{HO}_2$ . Así el  $\text{AH}\cdot$  reacciona ahora con el oxígeno y produce ADA [60].

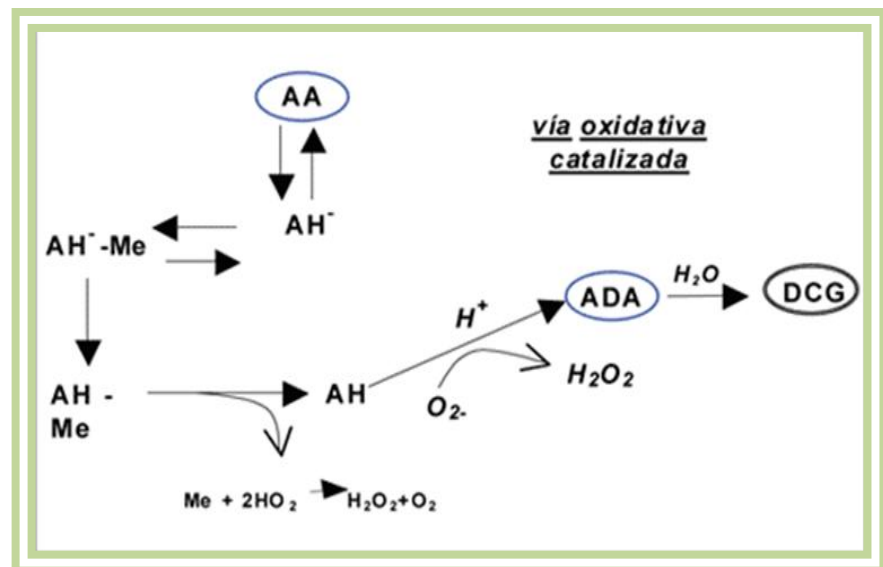
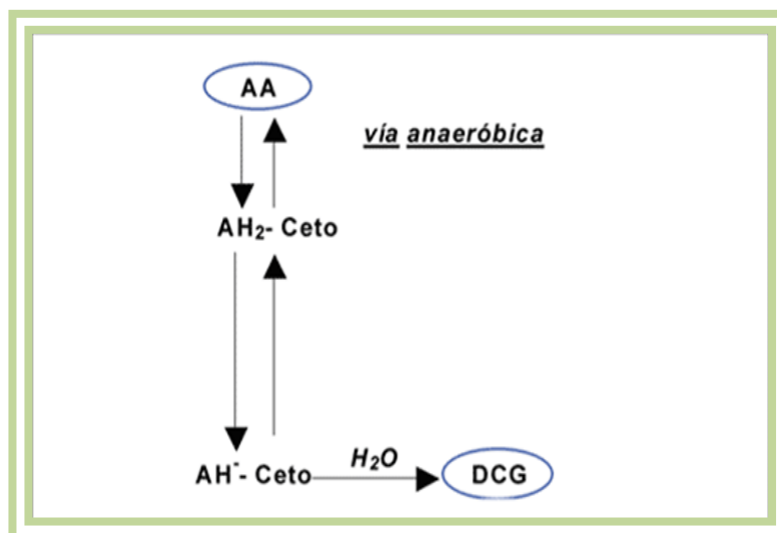


Figura 17. Primer via de degradación oxidativa del ácido ascórbico.

Fuente: SERRA, H. y CAFARO, T [60].





**Figura 19. Tercera vía de degradación oxidativa del ácido ascórbico.**

Fuente: SERRA, H. y CAFARO, T [60].

Independientemente de la vía degradativa, la apertura del anillo lactona, formación de DCG, elimina irreversiblemente la actividad de la vitamina C generando distintos productos: a) intermediarios polimerizados, b) ácidos carboxílicos insaturados de 5-6 carbonos, y c) productos de fragmentación de algunos pocos carbonos (<5 C) (Ver figura 16) [60]. Se conocen diversos derivados naturales del AA. El ascorbato-2-sulfato fue inicialmente descubierto en los quistes de *Artemia*, luego resultó estar presente en los tejidos blandos y como metabolito urinario del AA en animales. El ascorbato-2-sulfato también es capaz de aliviar los signos de escorbuto. La enzima ascorbato-2-sulfohidrolasa ha sido purificada y caracterizada. El ácido ascórbico-2-O- $\beta$ -glucuronido y el 2-O- $\alpha$ -glucósido han sido encontrados en humanos y en conejillos de india respectivamente, y varios enlace C5 glucósidos de 6-deoxyascorbato han sido identificados en hongos. La posible existencia y función de los derivados de este tipo en tejidos vegetales han recibido muy poca atención. Los derivados sintéticos ascorbato-2-fosfato y ascorbato-6-palmitato tienen propiedades antioxidantes *in vitro* y son usados para la conservación de alimentos, pero se absorben mal [59]. Los productos terminales de la degradación del AA adquieren importancia debido a su participación en el pardeamiento no enzimático o Reacción de Maillard. Esta reacción química ocurre entre azúcares no reductores, compuestos dicarbonílicos, o productos de

degradación del AA con proteínas. La interacción entre grupos aldehídos y aminos genera bases de Schiff inestables que se transforman en los compuestos de Amadori, los cuales sufren luego una serie de reacciones a través de los intermediarios dicarbonílicos para formar los llamados productos finales de glicación avanzada (AGEs) [60].

#### 4.2.1.5 Alimentos ricos en vitamina C.

En los alimentos, la vitamina C está presente sobre todo en la fruta, la verdura y el té verde. En los vegetales, la síntesis de vitamina C se efectúa en todas las células de la planta (Ver anexo 1). Los cítricos son excepcionalmente ricos en vitamina C. Los contenidos de AA indicados en la tabla 11 son valores medios que pueden variar considerablemente entre los tipos de vegetales y cultivos. Los valores reales dependen mucho de las siguientes variables: tipo de planta, tipo de suelo, clima, permanencia en el campo desde la cosecha, condiciones del campo y preparación [59], [61].

**Tabla 11. Alimentos y contenido de vitamina C [59].**

<b>FUENTE</b>	<b>Contenido de ácido ascórbico en mg por cada 100 g</b>
Camu - Camu	2000
Acerola (una pequeña cereza de México)	1000 - 2000
Escaramujo	1250
Rosa canina o cinorrodon	750 - 1600
Espino cervical de mar (bayas marítimas)	750
Amla o "grosella india"	720
Guayaba	243
Grosella negra	200
Perejil	170
Col verde	105- 150
Nabo	139
Rumex	124
Pimiento rojo, estragón, col verde	120
Brécol	90- 115
Hinojo, guindilla	100
Capudre (serbal de cazadores)	98
Kiwi	80
Col de Bruselas o lombarda	90- 150

Limón	65
Fresa, naranja, coliflor, berro, perifollo	60
Espinaca, canónigo	50
Col roja	50
Repollo	45
Cereza	10
Patata	15
Arándano	22
Ananas	20
Chucrut	20
Aguacate	13
Manzana	12
Plátano	10 -12
Melocotón	10
Pera	5

#### 4.2.1.6 Usos y producción de la vitamina C.

La producción mundial anual de AA es de 80000 toneladas, de las que un 50% se utilizan en las industrias farmacéuticas y parafarmacéuticas, un 25% en la industria agroalimentaria como conservante (E300, E301, E302), un 15% en la fabricación de bebidas, y el resto para nutrición de animales. El ácido ascórbico y sus sales de sodio, potasio y calcio suelen usarse como aditivos antioxidantes de los alimentos. Estos compuestos son solubles en agua y, por tanto, no pueden proteger a las grasas de la oxidación. Para este último fin pueden usarse como antioxidantes los ésteres de ácido ascórbico solubles en grasa, con ácidos grasos de cadena larga (palmitato de ascorbilo o estereato de ascorbilo). El ochenta por ciento del suministro mundial de ácido ascórbico se produce en China. Actualmente la mayor parte de la vitamina C se fabrica con la ayuda de microorganismos modificados genéticamente (vitamina C GMO), ya que es un proceso más económico [60], [61]. Los números de aditivo E que se usan en Europa son:

- E300: ácido ascórbico.
- E301: ascorbato de sodio.
- E302: ascorbato de calcio.
- E303: ascorbato de potasio.
- E304: ácidos grasos ésteres de ácido ascórbico (palmitato de ascorbilo y estereato de ascorbilo).

Otro uso de la vitamina C es como aditivo para la calidad del agua potable cuando el agua ha sido tratada con yodo, neutralizando el sabor desagradable del yodo, En la fabricación de plástico, el ácido ascórbico puede usarse para ensamblar cadenas moleculares más rápidamente y con menos residuos que con los métodos de síntesis tradicionales (53).

En la tabla 12 se resumen algunas investigaciones del contenido de vitamina C del *Aloe vera*.

**Tabla 12. Algunos estudios sobre *Aloe vera* relacionados con su contenido de ácido ascórbico.**

PAÍS	ESTUDIO	OBJETIVO	RESULTADOS
Chile 2011.	El efecto de alta presión en las propiedades funcionales y las características de calidad del gel de <i>Aloe vera</i> .	Evaluar los efectos del tratamiento de alta presión hidrostática a la presión de tres niveles (300, 400 y 500 MPa) sobre las características funcionales y la calidad de gel de <i>Aloe vera</i> como la vitamina C y E, aloína, los minerales, el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante.	Se encontró que hay una disminución en el contenido total fenólico y de vitamina C y E a altas presiones (500MPa) [37].
Chile 2008.	Influencia de la temperatura sobre la cinética de secado, las propiedades físico-químicas, y capacidad antioxidante del gel de <i>Aloe vera</i> ( <i>Aloe barbadensis</i> Miller).	Determinar los efectos de la temperatura sobre la cinética de secado y las variaciones en las propiedades fisicoquímicas y la capacidad antioxidantes del gel de <i>Aloe</i> .	Se determinó que un secado a temperatura de (80 y 90) °C dio lugar a una variación significativa en pérdida de las propiedades fisicoquímicas y propiedades nutritivas del gel, además, la capacidad antioxidante del gel se redujo [62].
Estados Unidos 2005.	Estudio del efecto de las preparaciones de <i>Aloe</i> en la biodisponibilidad humana de vitamina C y E.	Evaluar la influencia de las preparaciones de gel de <i>Aloe</i> en la biodisponibilidad humana de las vitaminas C y E.	Se demostró que las vitaminas C y E retrasan la aparición de cataratas y degeneración muscular relacionada a la edad. El análisis de las vitaminas C y E se hizo por cromatografía líquida en plasma [63].
Estados Unidos 1998.	Estudio de la vitamina C y <i>Aloe vera</i> como protectores de hepatocarcinogénesis química en ratas.	Analizar el contenido de vitamina C y el gel de <i>Aloe</i> y evaluar la acción anticancerígena en ratas.	Se encontró que una reducción en la gravedad de la carcinogénesis, indica un efecto protector de la vitamina C y del gel de <i>Aloe vera</i> en la suplementación [64].

#### 4.2.1.7 Métodos de análisis de la vitamina C.

La concentración de una solución de ácido ascórbico puede ser determinada de varias formas, incluyendo métodos electroquímicos, espectrofotométricos, espectrofluorométricos y cromatográficos. Sin embargo, los métodos de cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) tienen algunas ventajas con respecto a la especificidad, sensibilidad y fácil operación [61]. A pesar de que los detectores UV generalmente se incluyen en los sistemas de CLAE y que son más simples y rápidos que otros, tan sólo algunos métodos se han validado para ser utilizados en la determinación de la vitamina C en alimentos [65]. El ácido ascórbico (AA) puede ser fácilmente detectado por radiación ultravioleta en longitudes de onda entre (245 y 254) nm. La mayoría de los métodos que usan detección UV determinan AA sin ácido dehidroascórbico (ADA), debido a las pobres propiedades de absorción UV del ADA [61].

La titulación generalmente es realizada con un agente que se oxida [65]:

- *DCPIP*: es un agente muy utilizado es el tinte 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP). El tinte azul se vierte en la solución de ácido ascórbico hasta que un color rosado débil persista durante 15 segundos.
- *Yodo*: otro método implica usar el yodo y un indicador de almidón, en donde el yodo reacciona con el ácido ascórbico, y, cuando todo el ácido ascórbico ha reaccionado, el yodo queda entonces en exceso, formando un complejo azul oscuro con el indicador de almidón. Esto indica el punto final de la titulación. Como alternativa, el ácido ascórbico puede reaccionar con el yodo en exceso, seguido de una titulación con tiosulfato de sodio usando almidón como indicador.
- *Yodato y yodo*: el método requiere componer y estandarizar la solución de yodo. Una forma de hacer esto es generar el yodo en presencia del ácido ascórbico por la reacción del yodato y del ión yoduro en la solución ácida.
- *N-Bromosuccinimida (NBS)*: es un agente de oxidación mucho menos común. En esta titulación, la NBS oxida el ácido ascórbico (en presencia de yoduro potásico y almidón). Cuando la NBS está en exceso (es decir, la reacción está completa) libera el yodo del yoduro potásico, que forma entonces un complejo azul/negro con el almidón, indicando el punto del final de la titulación.

## 4.3 FUNDAMENTO TEÓRICO DE LA TÉCNICA INSTRUMENTAL UTILIZADA.

### 4.3.1 Cromatografía Generalidades.

Según define la IUPAC, "La cromatografía es un método, usado primariamente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra se mueve. La *fase estacionaria*, puede ser un sólido un líquido retenido sobre un sólido o un gel. La *fase estacionaria* puede estar extendida como una capa o distribuida como una película, etc. La *fase móvil* puede ser líquida o gaseosa". Según las adaptaciones que surgieron en la década de los 60's, se hizo conveniente relacionar la cromatografía con un método separativo y aceptar la definición de Guiddings: "un método de migración de zonas". La idea de la cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE), también en sus inicios fue modificada por los cromatografistas cuando se dieron cuenta de que la presión sólo constituía una herramienta que forzaba a la fase móvil a travesar la columna, sin constituirse por sí misma en una variable del sistema [66].

#### 4.3.1.1 Cromatografía líquida (CL).

La cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) es una técnica analítica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica (*fase estacionaria*). En CLAE la *fase móvil* no sólo no es inerte sino que su masa es sensiblemente superior, por lo que es necesario encontrar dispositivos que diferencien el soluto en solución de la *fase móvil*. Los más difundidos son los detectores de ultravioleta (UV) y en menor proporción los de fluorescencia, el de índice de refracción y el electroquímico [66].

Características más importantes en CLAE [67]:

- *Aplicaciones principales*: técnica de separación para los materiales menos volátiles e iónicos; análisis cuantitativo de multicomponentes.
- *Fenómeno molecular*: reparto entre una solución líquida y un substrato.
- *Ventajas en el análisis cualitativo*: separa materiales para su examen por medio de otras técnicas.
- *Ventajas en el análisis cuantitativo*: aplicación amplia a los materiales menos volátiles, análisis de multicomponentes.
- *Muestra promedio deseable*: 10 mg.

- *Limitaciones del método:* se tarda en desarrollar el método.
- *Limitaciones para la muestra:* ninguna

#### 4.3.1.2 Instrumentación para CLAE.

El cromatógrafo líquido (Ver figura 20), está constituido por [66]:

- *Un reservorio de solvente:* que alimenta al sistema con la fase móvil.
- *El inyector:* sistema que permite la introducción de la muestra.
- *La bomba:* sistema para forzar el paso de la muestra y la fase móvil a través de la columna.
- *El detector:* sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna.
- *Un sistema de registro de los datos provenientes del detector:* La señal del detector es siempre analógica y puede ser utilizada tal cual por un registrador gráfico o por un integrador, o digitalizada, para que pueda ser interpretada y procesada por un computador.

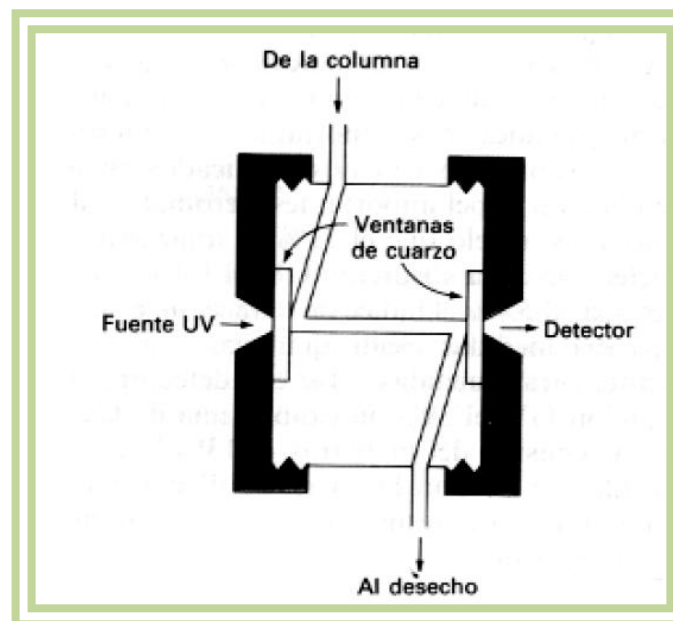


**Figura 20. Equipo para cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).**

Fuente: Del autor, tomada en el laboratorio de la Escuela de química de la Universidad Tecnológica de Pereira.

- **Tipos de eluciones en CLAE:** una separación que utiliza un solo disolvente de composición constante se denomina una *elución isocrática*. Con frecuencia, la eficiencia de la separación se aumenta notablemente por una *elución con gradiente*. En este caso se utilizan dos (y a veces más) disolventes con una polaridad significativamente distinta. Una vez comienza la elución, se varía la relación de los disolventes de forma programada, a veces continuamente y a veces mediante una serie de etapas escalonadas. En CLAE se varía la composición de la fase móvil (contenido porcentual del componente “fuerte de la mezcla”), comenzando la elución con un solvente débil y aumentando progresivamente la proporción del componente fuerte. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y acetonitrilo. El agua puede contener tampones, sales, o compuestos ácidos, que ayudan a la separación [66].
  
- **Columnas para cromatografía de líquidos:** se construyen con tubo de acero inoxidable de diámetro interno uniforme. Cientos de columnas empaquetadas que difieren en tamaño y relleno se comercializan por distintos fabricantes y su coste oscila (alrededor de 1'100.000 pesos) [67].
  - **Columnas analíticas:** se han empezado a fabricar columnas de alta resolución más rápidas, las cuales pueden tener diámetros internos que oscilan entre (1 y 4.6) mm y se rellenan con partículas de (3 o 5)  $\mu\text{m}$ . A menudo su longitud es de (3 a 7.5) cm. Estas columnas tienen hasta 100 000 platos/metro y presentan la ventaja de la rapidez y del mínimo consumo de disolvente. La última propiedad es de considerable importancia, puesto que los disolventes de alta pureza que se requieren en cromatografía de líquidos son muy caros [67].
  - **Tipos de rellenos de la columna:** los típicos rellenos de partículas porosas de cromatografía de líquidos están formados por micropartículas porosas con diámetros entre (3 y 10)  $\mu\text{m}$  y con la menor dispersión posible para un tamaño determinado. Las partículas son de sílice, alúmina o resinas de intercambio iónico, aunque la sílice es el material más común. Las partículas de sílice se sintetizan aglomerando partículas de sílice de tamaños inferiores al micrón en unas condiciones tales que se forman partículas mayores con diámetros muy uniformes. Las partículas que resultan se recubren muchas veces con películas orgánicas, que se unen química o físicamente a la superficie [67].

- **Detectores en cromatografía de líquidos:** son de dos tipos básicos. *Los detectores basados en una propiedad de la disolución* responden a una propiedad de la fase móvil, tal como el índice de refracción, la constante dieléctrica, o la densidad, que se modifica por la presencia de los analitos. Por contraste, *los detectores basados en una propiedad del soluto* responden a alguna de las propiedades del soluto, como la absorbancia UV, fluorescencia, o intensidad de difusión, que no son propias de la fase móvil [67].
- **Detectores de absorbancia ultravioleta con filtros:** los detectores de absorción UV (Ver figura 21) más simples son los fotómetros de filtros con una lámpara de mercurio como fuente. Lo más común en estos casos es aislar la línea intensa a 254 nm por medio de filtros; en algunos equipos también se pueden utilizar las líneas a (250, 313, 334 y 365) nm empleando otros filtros. Este tipo de detector se utiliza de forma restringida para aquellos solutos que absorben a alguna de estas longitudes de onda. Algunos grupos funcionales orgánicos y diversas especies inorgánicas exhiben una banda ancha de absorción a una o más de esas longitudes de onda [67].



**Figura 21. Celda de detector ultravioleta en CLAE.**

Fuente: Tema 4 Cromatografía de líquidos de alta resolución [67].

#### 4.3.1.3 Tipos de separación por CLAE.

Los criterios principales para la determinación de AA y ADA por CL son:

- **Cromatografía en Fase reversa (FR):** la difusión de la FR se debe a un factor clave: la silicagel (como también alúmina), es un material fuertemente higroscópico. La fase móvil es más polar que la fase estacionaria. La fase móvil es agua con un componente menos polar. Se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar, y una fase estacionaria apolar. El efecto hidrofóbico disminuye con la adición de disolvente apolar a la fase móvil [66]. La cromatografía en FR puede clasificarse, según su forma operativa en:
  - ✓ FR Regular (Cromatografía de Partición Simple).
  - ✓ Cromatografía de Apareamiento Iónico.
  - ✓ Complejación con Iones Metálicos.
  - ✓ FR en Medio No Acuoso.
  - ✓ **Supresión Iónica (Control de la Ionización):** en general, los solutos ionizables dan picos con baja retención y fuerte asimetría. En FR solo se retendrá favorablemente la especie no iónica y lo hará mal la iónica, que resulta muy polar. Es decir, la retención de solutos no ionizables depende fuertemente de la posición que adopte el equilibrio entre ambas formas. Así, los factores que modifican ese equilibrio, ya sean pH o fuerza iónica, modificarán la retención. Si el analito se encuentra disociado, el equilibrio debe desplazarse hacia la forma no ionizada para lograr la retención. Un pH entre 2 y 4 es en general suficiente para impedir la ionización. El control adecuado del pH en función de los solutos (y de su pKa) permite controlar y ajustar la separación [66].

El AA y ADA pertenecen al grupo de moléculas polares muy pequeñas que son difíciles de retener en un sistema convencional cromatográfico de FR y de separar del volumen muerto. Eso es importante, especialmente en un ensayo de bio-análisis, en el que los compuestos de interferencia de las matrices biológicas se eluyen junto con el volumen muerto, o al principio del cromatograma. Las fases móviles son a menudo muy complejas, con más de dos componentes que contienen varios reactivos modificadores [66].

- **Cromatografía de Intercambio Iónico:** la fase estacionaria contiene grupos funcionales iónicos y retiene el soluto, de características iónicas pero de signo opuesto, intercambiándolo por un proceso reversible con iones de la fase móvil. Actualmente, sólo los iones inorgánicos, disociados en solución, independientemente del pH del medio, son tratados casi con exclusividad por este tipo de cromatografía. En cuanto a los materiales de relleno los intercambiadores iónicos empleados pueden clasificarse en *polímeros orgánicos* (copolímero estireno-divinilbenceno (EDVB)), *intercambiadores de fase ligada*, *óxidos inorgánicos*, *intercambiadores peliculares*. Básicamente deben emplearse micropartículas porosas, de resistencia mecánica adecuada a altas presiones empleadas y en las cuales la cinética del proceso de intercambio sea rápida [66].

La variedad disponible de los intercambiadores iónicos comercialmente corresponde a:

- intercambiadores *catiónicos* que contienen grupos ionogénicos fuertemente o débilmente básicos llamados SCX o WCX (por strong o weak catión exchanger (-SO<sub>3</sub>H, -COOH, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)).
- intercambiadores *aniónicos* que contienen un grupo ionogénico fuertemente o débilmente ácido frecuentemente llamados SAX o WAX, (por strong o weak catión exchanger (-NR<sub>3</sub><sup>+</sup>, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, grupos dietilaminoetilo DEAE)).

A menudo fue utilizada en los primeros métodos de determinación de AA por cromatografía. Como el AA es un ácido orgánico débil, puede ser también retenido en una fase estacionaria de intercambio de aniones tipo SAX. Recientemente, el enfoque de intercambio iónico fue aplicado con un grupo amino (NH<sub>2</sub>) como fase estacionaria, donde el grupo amino figuraba como WAX. El tampón inorgánico o ácido a un pH bajo se ha utilizado como fase móvil [66].

El intercambio iónico no se hizo muy popular en el análisis de AA y ADA debido a la preferencia actual del analista, que se debe en parte a la mayor estabilidad de los rellenos en comparación con los de la cromatografía de intercambio iónico de base sílica, a la simplicidad y probablemente al continuo desarrollo de la experiencia cromatográfica en fase reversa [61], [66].

- **Cromatografía Par Iónico:** también se utiliza ampliamente en análisis de AA y ADA. El emparejamiento de iones reactivos, junto con buffers inorgánicos, se utiliza a menudo como aditivos en el análisis de AA y ADA. Sin embargo, el uso de buffers inorgánicos causa muchos problemas. Las sales inorgánicas pueden acumularse en los elementos de línea de flujo, tales como el check-in de salida y válvulas. Esto puede provocar un mal funcionamiento de estas válvulas.

El cambio de tampón acuoso a un eluyente con alto contenido de solvente orgánico se debe hacer con cuidado y poco a poco (después de lavar el sistema con agua) con el fin de evitar la precipitación de buffer. En la cromatografía convencional, el emparejamiento de iones reactivos por lo general disminuye el tiempo de vida de la columna, por lo que la optimización debe hacerse con cuidado y sólo puede ser utilizado a bajas concentraciones. También tienden a provocar inestabilidad en la separación cromatográfica o aumenta gradualmente la presión con cada inyección posterior de la muestra, también hay peligro de precipitación con otros componentes de la fase móvil. Para concluir, la cromatografía de par iónico no es ideal para los actuales análisis de laboratorio [61].

- **Cromatografía de Exclusión Iónica:** se separan sustancias en base a su tamaño efectivo en solución. En esta modalidad cromatográfica los solutos de mayor peso molecular se “retrasan” en una columna como consecuencia de su permeación en un gel cuyos poros están llenos con solvente. Es decir, que se trabaja en una columna cromatográfica operando en el volumen muerto. Los materiales de relleno pueden ser *geles blandos* (dextrano-acrilamida, poliacrilamida, agarosa), *geles semirígidos* (poliestireno, copolímero de poliéter hidroxilado, poli-2-hidroxiethylmetacrilato, poliestireno sulfonado hidroxilado), y *geles rígidos* (sílica porosa, vidrios porosos) [66].

Algunos de los métodos más recientes para la determinación de AA y el ADA se basan en exclusión iónica. Los solutos débilmente ionizados (por ejemplo, ácidos orgánicos, como AA y ADA) eluyen en algún punto intermedio, debido a las fuerzas electrostáticas y de penetración parcial en los poros donde se producen las interacciones hidrofóbicas. El tamaño de exclusión también afecta la retención de las moléculas más grandes cuando son excluidas del sistema de poros [61].

## 4.4 PARÁMETROS ESTADÍSTICOS.

### 4.4.1 Linealidad.

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta. El **rango lineal**, se define como el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de analito para el cual el método ha sido probado y dentro del cual se puede efectuar el cálculo por interpolación en una curva estándar. Para evaluar la linealidad existen unos criterios mínimos aplicables a cualquier procedimiento [68]:

- ✓ Dentro del rango establecido se recomienda estudiar al menos 5 niveles de concentración. Estadísticamente lo correcto sería analizar las muestras de forma aleatoria, no obstante, se establece como criterio práctico analizarlas en sentido creciente de concentración para minimizar posibles errores en la memoria en del equipo.
- ✓ Para realizar los análisis se recomienda hacer pesadas independientes, ya que así se elimina el posible error sistemático que se podría arrastrar partiendo de una sola pesada y realizando diluciones. No obstante, para evaluar la linealidad en las impurezas se suelen utilizar sucesivas diluciones ya que normalmente se trabaja en niveles de concentración muy bajos y esto dificultaría las pesadas.
- ✓ Con los resultados del estudio de la linealidad se prepara una tabla relacionando las concentraciones  $x$  y la respuesta  $y$ . La relación entre ambas variables se expresa matemáticamente como una recta de regresión del tipo,

$$y = bx + a \quad (1)$$

Obtenida por un método de ajuste. En la recta de regresión (1),  $x$  es la concentración,  $y$  la respuesta,  $b$  el valor de la pendiente y,  $a$  el termino independiente.

- ✓ Si la recta no pasa cerca del origen de coordenadas significa que el método a evaluar está afectado por un error sistemático por defecto o por exceso en el intervalo estudiado. Si existen diferencias apreciables entre los valores experimentales y los puntos de la recta significa que la linealidad no es buena.

- ✓ La pendiente  $b$  se encuentra relacionada con la sensibilidad del método de forma que a mayor pendiente mayor sensibilidad (Respuesta del método frente a los cambios de la concentración del analito). El término independiente  $a$ , u ordenada en el origen, es la intersección de la recta con el eje de las ordenadas y es indicativo del error sistemático, no difiriendo estadísticamente de cero en caso de no existir sesgo.
- ✓ El coeficiente de correlación  $R$  indica el grado de relación entre la variable  $x$  (Concentración), y la variable  $y$  (Respuesta). Su valor máximo es 1, si  $R$  es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Un valor nulo indica ausencia de relación lineal entre variables.
- ✓ El valor recomendable para el coeficiente de correlación es  $\geq 0.999$ , aunque en el caso de impurezas se admite  $\geq 0.990$ .

#### 4.4.2 Sensibilidad.

La sensibilidad corresponde a la mínima cantidad que puede producir un resultado significativo, se encuentra definida por los **límites de detección (LD) y cuantificación (LC)** [65].

El LD es la concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco,  $y_B$ , más tres veces la desviación estándar del blanco,  $s_B$ :

$$LD = y_B + 3s_B \quad (2)$$

Una suposición básica del método de los mínimos cuadrados no ponderados es que cada punto en la representación gráfica (incluido el punto que representa el blanco o fondo) tiene una variación distribuida normalmente (sólo en la dirección de  $y$ ) con una desviación estándar estimada por  $s_{y/x}$ . Es por tanto, adecuado utilizar  $s_{y/x}$  en lugar de  $s_B$  en la estimación del límite de detección. El valor de  $a$ , la ordenada en el origen calculada, se puede utilizar como una estimación de  $y_B$  [65].

El LC es considerado como el límite más bajo para mediciones cuantitativas precisas, está dado por:

$$LC = y_B + 10s_B \quad (3)$$

#### 4.4.3 Exactitud.

La exactitud describe si el resultado experimental es el correcto. Estrictamente hablando, el único tipo de medida que puede ser completamente exacto es aquel que consiste en el recuento de objetos. Todos los demás tipos de medidas contienen errores y aportan solo una aproximación del valor verdadero.

La exactitud es un término relativo, en el sentido de que un método es exacto o inexacto dependiendo en gran medida de las necesidades del científico y de las dificultades del problema analítico [68].

Matemáticamente, suele expresarse mediante el **porcentaje de recuperación** del analito presente o agregado a una muestra de control de calidad. Evalúa la eficiencia de extracción, proceso de preparación o interferencias que pueden existir al aplicar el método de ensayo [66]. El porcentaje de recuperación % R se calcula de la siguiente manera:

$$R = \frac{\text{Muestra Contaminada}(mg) - \text{Muestra Sin Contaminar}(mg)}{\text{fortificación}(mg)} * 100 \quad (4)$$

#### 4.4.4 Precisión.

La precisión está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea. Habitualmente se utilizan tres términos para describir la precisión de un conjunto de datos de replicados que incluyen la desviación estándar ( $\sigma$ ), la varianza ( $s$ ) y el coeficiente de variación (%CV) [66].

La precisión debe medirse en condiciones de:

- ✓ **Reproducibilidad:** se define como la proximidad entre los resultados de mediciones de un mismo parámetro, realizadas bajo distintas condiciones de medición [68].
- ✓ **Repetibilidad:** proximidad entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo parámetro, realizadas bajo las mismas condiciones de medición (Aplicación de un mismo procedimiento, a un mismo objeto, por el mismo operador, en intervalos cortos de tiempo, con el mismo equipamiento instrumental, en el mismo lugar) [68].

#### 4.4.5 Comparación entre medias (ANOVA de un factor).

Se debe juzgar si una diferencia en las medias de los conjuntos de análisis idénticos es real y representa la evidencia de que las muestras son diferentes, o si la discrepancia simplemente es consecuencia de errores aleatorios en los conjuntos. El análisis de varianza ANOVA proporciona el método que ayuda a elegir la mejor forma de representar la curva en todos los casos donde se mantenga la hipótesis de que los errores ocurren sólo en la dirección de  $y$  [69].

ANOVA se utiliza para separar las dos fuentes de variación, la primera es la variación *debida a la regresión*, es decir, debida a la relación entre la señal del instrumento, y la concentración del analito. La segunda es el error experimental aleatorio en los valores de  $y$ , que se denomina la *variación sobre la regresión*. Como es habitual el número total de grados de libertad es uno menos que el número de medidas, ya que los residuos suman cero. Para un gráfico de línea recta se tiene que determinar sólo un coeficiente para un término que también contenga  $x$ , ya que el número de grados de libertad debido a la regresión es 1. Por tanto, hay  $\gamma(n-2)$  grados de libertad para la variación residual. Se debe determinar los valores medios cuadráticos (CM), y el contraste F se aplica a los dos cuadrados medios [69].

ANOVA genera valores del error estándar ( $s_{y/x}$ ); los valores de  $R^2$ , el coeficiente de determinación, cuando se mejora el ajuste de mínimos cuadrados de una curva (o línea recta) a los puntos de los datos, el valor de  $R^2$  se aproximará a 1 (o el 100%); para los valores de  $R^2$  corregido utiliza cuadrados medios (CM) en lugar de sumas de cuadrados [69].

##### 4.4.5.1 Pruebas específicas para establecer diferencias significativas.

La técnica de análisis de varianza también tiene condiciones, una de ellas es la Normalidad de las concentraciones para lo cual se debe emplear el *test de Shapiro Wilk*. La otra condición es la Homogeneidad de varianzas, que se puede interpretar gráficamente y estadísticamente con el *test de Levene*.

Otra prueba es el *contraste de Tukey* que junta los datos de las muestras con identificación de cada uno, los ordena, aplica la ordenación alterna por pares para generar suma de rangos y teniendo en cuenta los tamaños muestrales, proporciona un estadístico de contraste, es decir, compara todas las combinaciones posibles [69].

## 5. MARCO DE REFERENCIA.

Según la revisión bibliográfica realizada, a nivel nacional e internacional, aún no se ha documentado algún estudio comparativo en cuanto al contenido de ácido ascórbico del mucílago de *Aloe vera* por lugar de cultivo.

En la tabla 13 se listan algunos estudios relacionados con el contenido de vitamina C en plantas diferentes al *Aloe vera* y las diferencias atribuidas al lugar de cultivo.

Por otra parte, en la tabla 14 se citan algunos estudios realizados tanto en Colombia como en otros países que muestran diferencias en la composición química del mucílago de *Aloe vera* por lugar de cultivo.

**Tabla 13. Estudios comparativos del contenido de vitamina C en plantas diferentes al *Aloe vera*.**

PAÍS	ESTUDIO	RESULTADOS	MÉTODO DE ANÁLISIS
Brasil 2003	Verificación y comparación del contenido de carotenoides y de ácido ascórbico en diferentes especies de manzana-marañón ( <i>Anacardium Occidentale L.</i> ).	Se estudió la variedad de fruta (roja y amarilla) y se encontró que los niveles de concentración de la vitamina C son significativamente más altos para los frutos amarillos en las regiones del Noreste y Sureste de Brasil. En cambio el contenido de carotenoides sólo es mayor en los frutos rojos alargados del Noreste. Las diferencias encontradas dependen principalmente de las diferentes condiciones ambientales y geográficas donde se desarrolla el cultivo [70].	Caracterización de las muestras con técnicas espectrofotométricas, medición de pH y °Brix. Se utilizó CLAE con detector UV columna C18 y TLC en sílice.
Estados Unidos y	Revisión de cómo las condiciones de pre-cosecha, cosecha y post-cosecha influyen	Se encontró que hay variaciones en el contenido de vitamina C según la influencia de factores como el genotipo, las condiciones climáticas, las prácticas culturales, los métodos de cosecha y maduración y los procedimientos de	Métodos de escaldado, pasteurización y presurización, degradación

<p>Corea. 2000</p>	<p>sobre el contenido de vitamina C de los cultivos Hortícolas (frutas y vegetales).</p>	<p>manipulación etc. Se concluyó que cuanto más alta es la intensidad de luz durante el crecimiento de las plantas mayor es el contenido de vitamina C en los cultivos. Así mismo se halló que la retención de la vitamina C en los cultivos es baja a causa de hematomas y otras lesiones mecánicas y por el excesivo recorte en las plantas etc [71].</p>	<p>enzimática, espectrofluorométricos, espectrofotométricos y CLAE.</p>
<p>Bélgica 2000</p>	<p>El papel del ácido ascórbico en el metabolismo de células vegetales y animales, los últimos estudios sobre biosíntesis, la compartimentación en tejidos, y catabolismo.</p>	<p>Se encontró que la concentración de vitamina C varía mucho entre los tipos de frutas y vegetales según el lugar de cultivo. Se determinaron las concentraciones en fuentes de alimentos comunes y los efectos de procesamiento o de almacenamiento antes de su consumo. También se estudiaron los factores que determinan la biodisponibilidad de ácido ascórbico como la luz, temperatura, presencia de contaminantes atmosféricos, sales, nivel de estrés, metales y herbicidas, prácticas culturales en la cosechas etc. Y se concluyó que es necesario profundizar el modo como se puede mejorar los cultivos a través de investigaciones futuras [59].</p>	<p>Extracción, procedimientos espectrofotométricos, CLAE (índice de refracción, fluorescencia y UV).</p>

**Tabla 14. Estudios comparativos del contenido de metabolitos en *Aloe vera*.**

PAÍS	ESTUDIO	RESULTADOS	MÉTODO DE ANÁLISIS
Irán 2012	Estudios de la diversidad genética del <i>Aloe vera</i> en diferentes puntos de Irán evaluando la horticultura y los marcadores RAPD.	Se encontró que los factores ambientales y genéticos son eficaces en la observación de las variaciones del análisis RAPD junto con el análisis hortícola [72].	Técnicas moleculares RAPD, PCR en gel de agarosa.
Colombia 2011	Estudio bromatológico y microbiológico al mucílago de <i>Aloe vera</i> y fertilidad de los suelos de cultivos de los municipios de Guática y Mistrató del departamento de Risaralda	Se determinó que los suelos de las fincas Santa Ana (Guática) y La Magdalena (Mistrató) tenían altos contenidos de Calcio y algunos micronutrientes como: Fe, Mn, Zn, Cu, S. En el mucílago se presentó niveles bajos de N para ambas zonas y K, en el mismo orden, también se observó bajos contenidos de cenizas y hierro, alto contenido de Zn en comparación con datos teóricos reportados. Se observó la ausencia de microorganismos patógenos. De los resultados obtenidos se concluyó que el cultivo con mejores características fisicoquímicas fue Mistrató [17].	Consistieron en determinar parámetros como: humedad, cenizas, metales y minerales en el mucílago, además se determinó materia orgánica, pH, Potasio (K), Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Fosforo (P), Hierro (Fe), Manganeseo (Mn), Zinc (Zn), Cobre (Cu) en el suelo y análisis microbiológicos según determinaciones en el laboratorio del grupo de Oleoquímica y en el laboratorio de suelos de la Universidad Tecnológica de Pereira.
Sur de África 2010	Características físicas y químicas del gel de <i>Aloe</i> .	Se encontró que las dimensiones de la hoja y el rendimiento del gel son variables entre las plantas de la misma población, así como de una población a otra, esto se atribuye a las diferentes condiciones climáticas (especialmente la lluvia y la humedad que a su vez determinan el contenido de agua de las hojas) [73].	Determinación de pH, pruebas de conductividad, CLAE.

Colombia 2010	Estudio bromatológico, microbiológico, foliar y de fertilidad de los suelos en los cultivos de <i>Aloe vera</i> <i>Barbadensis</i> <i>Miller</i> en tres fincas del departamento de Risaralda.	Según los resultados obtenidos, todos los suelos estudiados en esta investigación, son aptos para el cultivo de <i>Aloe vera</i> . El estudio bromatológico realizado al mucilago de <i>Aloe vera</i> , proveniente de las tres fincas presenta resultados favorables en los contenidos de proteína, materia seca y humedad. El estudio foliar realizado a las hojas de <i>Aloe vera</i> , demuestran que son ricas en metales y minerales. El estudio Microbiológico realizado al mucilago de <i>Aloe vera</i> , ratifica que este no posee ningún tipo de microorganismo patógeno que pueda afectar al ser humano por ingestión. De los terrenos estudiados se puede afirmar que la finca Campo Alegre posee el suelo más adecuado para el cultivo de <i>Aloe vera</i> [18].	El análisis comprendió las determinaciones de humedad, materia orgánica, proteína, pH, minerales como: Potasio (K), Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Fosforo (P) y metales como: Hierro (Fe), Manganeseo (Mn), Zinc (Zn), Cobre (Cu) y Boro (B). Análisis fisicoquímicos, microbiológicos según determinaciones en el laboratorio del grupo de Oleoquímica y en el laboratorio de suelos de la Universidad Tecnológica de Pereira.
Colombia 2009	Estudio de antraquinonas presentes en extractos de mucílago y hojas de <i>Aloe vera</i> de plantas cultivadas en la región cafetera.	Se encontró que las antraquinonas presentes en las hojas cultivadas en la región de Montenegro Quindío, son más abundantes en el látex. Mientras que en las hojas cultivadas en Combia Risaralda éstas se encuentran repartidas entre el látex y el mucílago [11].	Métodos espectrofotométricos, extracción con ultrasonido, métodos gravimétricos.
Colombia 2007	Obtención de algunos parámetros de referencia del suelo y del mucílago del <i>Aloe vera</i> cultivado en el corregimiento de Combia Risaralda y en el municipio de Montenegro Quindío.	Se encontró una diferencia significativa en el contenido de cenizas entre el cultivo de Montenegro Quindío y los cultivos de Combia Risaralda, presentándose en estos últimos un porcentaje más bajo. Los demás estudios del análisis bromatológico practicados en el gel de <i>Aloe vera</i> no reportaron mayores diferencias en sus resultados. Los datos obtenidos del análisis bromatológico y de fertilidad del suelo, no delimitaron	Involucró las determinaciones de humedad, cenizas, proteína, extracto etéreo y fibra cruda; y para establecer los nutrientes disponibles en el suelo, se hizo el análisis de fertilidad (pH, materia orgánica, fósforo, aluminio, nitrógeno, Mg, K y Ca), se realizaron todas las determinaciones por triplicado y siguiendo las metodologías establecidas en el laboratorio de Análisis de

		las regiones del Quindío y Combia para el adecuado cultivo del <i>Aloe vera</i> ; cumpliendo estas dos regiones con los requerimientos de la planta [7].	Suelos de la Universidad Tecnológica de Pereira.
Japón 2003	Revisión de las relaciones entre los componentes del <i>Aloe vera</i> y sus efectos biológicos.	Algunos estudios han identificado a la manosa como el azúcar más importante presente en el gel de <i>Aloe vera</i> , mientras que otros han reportado la ausencia de este azúcar, encontrando a su vez a las sustancias pécticas como el mayor componente. Las discrepancias señaladas se deben principalmente a los diferentes lugares geográficos en donde se desarrolla la planta de <i>Aloe vera</i> [75].	Separación de componentes por centrifugación. Identificación mediante microscopia de azúcares y cuantificación RMN.
Israel 1995	Un cultivo potencial de <i>Aloe vera</i> bajo condiciones de disminución de temperatura en invierno y en los suelos de basalto.	Se estudió la variación de las condiciones de temperatura y se encontró que el <i>Aloe vera</i> puede crecer en dos tipos de suelo del desierto de Israel presentando características similares en cuanto al tamaño, número de hojas, pH y actividad antifúngica [76].	Métodos de extracción, liofilización, determinación de pH, control microbiológico.
Estados Unidos 1971	Estudio químico del jugo de <i>Aloe vera</i>	Se halló que los minerales u oligoelementos constituyentes en la planta, depende extensamente de la calidad de los terrenos de cultivo [77].	Análisis fisicoquímicos, microbiológicos y nutricionales. Técnicas espectrofotométricas, °Brix, pH y conductividad.

### 5.1 Antecedentes de los cultivos de *Aloe vera* visitados en los diferentes municipios del departamento de Risaralda.

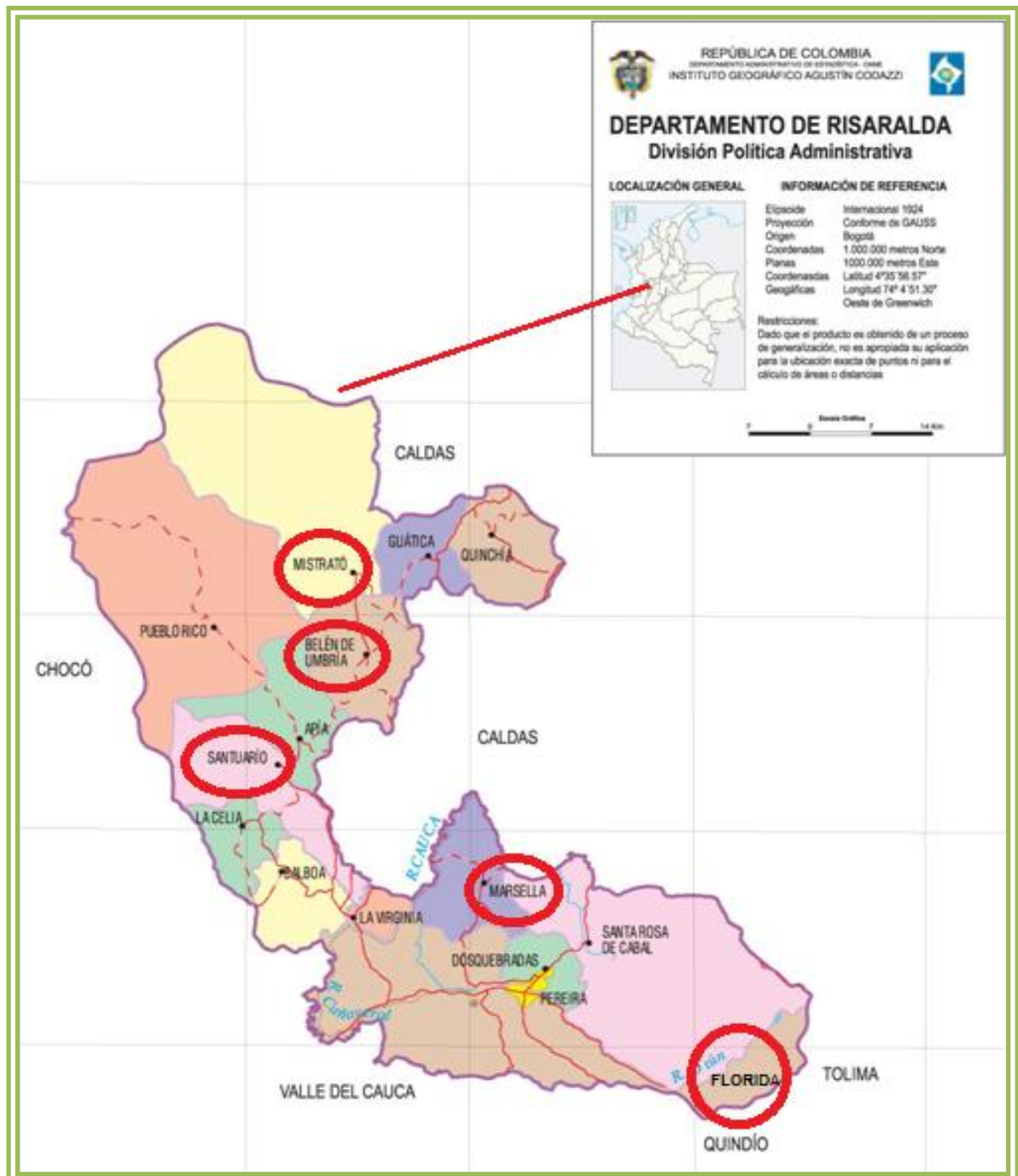
En la figura 22 se señalan las zonas de estudio del cultivo de *Aloe vera* del departamento de Risaralda.

- *Municipio Belén de Umbría*: las muestras de estudio se obtuvieron de la finca La Esperanza, localizada a una latitud norte 5° 11' 57.4" N, longitud oeste de 75° 51' 1.5" O, una altitud entre (1831 y 1869) msnm, con una temperatura promedio de 17 °C. La zona de cultivo presenta una

topografía irregular plana y otra inclinada, los suelos de esta zona presentan una textura franco-limosa. El cultivo de *Aloe vera* es de 1500 plantas, con un promedio de 2 años de crecimiento aproximadamente, además contiene cultivos de café en los alrededores (Ver figura 23).

- *Corregimiento La Florida (Pereira Risaralda)*: las muestras de estudio fueron obtenidas de la finca La Palma, ubicada a una latitud norte 04° 45' 32.0" N, una longitud oeste 75° 37' 34.0" O, una altitud de 1749 msnm, tiene un clima templado, y una extensión entre (700 a 800) m<sup>2</sup> aproximadamente y tiene una zona de invernadero (Ver figura 24).
- *Municipio Marsella*: las muestras de estudio se obtuvieron de la finca La Aurora, ubicada al noroeste del departamento de Risaralda a una latitud norte 4° 9' 43.51" N, longitud oeste de 75° 7' 39.91" O, una altitud entre (1609 y 1633) msnm, con una temperatura promedio de 20°C, tiene un clima templado, una humedad relativa entre (70-75)%, una precipitación de 2000 mm/año y una extensión de 1000 m<sup>2</sup> con un cultivo de 800 plantas aproximadamente, y un promedio de 3 años de crecimiento (Ver figura 25) [18].
- *Municipio Mistrató*: las muestras de estudio fueron obtenidas de la finca La Magdalena, ubicada en la vereda La María a 1637 msnm. La zona de cultivo presenta una topografía irregular plana y otra inclinada hacia el Río Risaralda como se observa en la figura 26. Cuenta con un área de cultivo de *Aloe vera* de 15000 m<sup>2</sup>. Este cultivo presentaba plantas intermedias de frijol, cebolla, tomate, blanquillos, plantas aromáticas como; caléndula, romero, cidrón y manzanilla [17].
- *Municipio Santuario*: las muestras de estudio se obtuvieron de la finca Pite Tierra, localizada en la vereda Alta Esperanza en la región centro occidental del departamento de Risaralda a una latitud norte 5° 1' 04.09" N, longitud oeste de 75° 9' 91.08" O, una altitud entre (2070 y 2066,54) msnm, con una temperatura promedio de 20 °C, tiene un clima templado, una humedad relativa entre (75-85)%, una precipitación de 1800 mm/año y una extensión de 800 m<sup>2</sup> aproximadamente, contiene cultivos de plátano y *Aloe vera* principalmente. Su suelo es inclinado de tipo arcilloso (30% limo, 60% arcilla, 10% arena) de color negro en la superficie y de color marrón en su interior, es un suelo muy compacto. El cultivo tiene unas 300 plantas de

*Aloe vera* aproximadamente, y un promedio de 2 años y medio de crecimiento (Ver figura 27) [18].



**Figura 22. Zonas de estudio del cultivo de *Aloe vera*.**

Fuente: <http://www.risaralda.gov.co/sitio/main/index.php/conozcamos-a-risaralda>



**Figura 23. Cultivo de *Aloe vera* del municipio de Belén de Umbría Risaralda.**  
Fuente: Tomada en muestreo de la finca La Esperanza por el grupo Oleoquímica UTP.



**Figura 24. Cultivo de *Aloe vera* del corregimiento La Florida Risaralda.**  
Fuente: Tomada en muestreo de la finca La Palma por el grupo Oleoquímica UTP.



**Figura 25. Cultivo de *Aloe vera* del municipio de Marsella Risaralda.**  
Fuente: Tomada en muestreo de la finca La Aurora por el grupo Oleoquímica UTP.



**Figura 26. Cultivo de *Aloe vera* del municipio de Mistrató Risaralda.**  
Fuente: Tomada en muestreo de la finca La Magdalena por el grupo Oleoquímica UTP.



**Figura 27. Cultivo de *Aloe vera* del municipio de Santuario Risaralda.**

Fuente: Tomada en muestreo de la finca Pite Tierra por el grupo Oleoquímica UTP.

Según los estudios realizados por el Grupo de Oleoquímica de la Universidad Tecnológica de Pereira (Ver anexo 5), las posibles causas de las diferencias reportadas en el análisis bromatológico entre los cultivos de *Aloe vera*, a partir de las hojas de coloración verde o marrón con características físicas diferentes pueden deberse a las zonas de cultivo, fertilización y suministro de nutrientes, riego, control de malezas, aspectos ecológicos (altitud, clima, condiciones edáficas, propagación, mantenimiento de la plántula), exposición al sol y enfermedades de los cultivos. Por otra parte, los estudios de fertilidad del suelo de las zonas de muestreo demuestran que todos los suelos son aptos para el cultivo de *Aloe vera*. En general, los suelos estudiados son ricos en materia orgánica (6,16% hasta 23%), indicando que tienen una buena porosidad [17] [18].

## **6. METODOLOGÍA.**

### **6.1 Muestra de análisis.**

#### **6.1.1 Descripción de las muestras.**

El mucílago de *Aloe vera* fue obtenido de plantas cultivadas en los diferentes municipios del departamento de Risaralda (Belén de Umbría, La Florida, Marsella, Mistrató y Santuario) (Ver figura 22 y 29).

#### **6.1.2 Muestreo.**

Se realizaron los muestreos de las diferentes zonas de cultivo de *Aloe vera* del departamento de Risaralda durante visitas en los meses de Agosto del 2011 a Enero del 2012. Se tomaron hojas de plantas adultas, grandes y de la parte externa, con una edad aproximada de 2 años, haciendo un recorrido en forma de zig-zag ó diagonal, según la topografía y el tamaño del terreno. Se recolectaron las hojas en bolsas negras de polietileno y se trasladaron hasta el laboratorio de Oleoquímica de la Universidad Tecnológica de Pereira en el menor tiempo posible [17]. Antes de introducir las hojas a 4°C en la nevera, éstas se dejaron a temperatura ambiente y luego se lavaron con agua y jabón para alimentos (jabón TEGO 51) para eliminar la contaminación con agentes extraños que puedan interferir en los análisis. Posteriormente se desinfectó con alcohol la zona de trabajo y se separó el mucílago de *Aloe vera*, empleando un cuchillo plástico, registrando el valor de la masa medida.

### **6.2 Extracción del ácido ascórbico del mucílago de *Aloe vera*.**

Se tomaron triplicados de la muestra por cada zona de estudio, empleando una cantidad de muestra de 16g de gel de *Aloe vera* en base húmeda; se añadió un volumen de 50mL del solvente extractor. Luego se realizó una extracción sólido-líquido en baño de hielo mediante agitación magnética por espacio de 30 minutos. Al término de los cuales se centrifugó a 6000 r.p.m durante 15 min. Posteriormente se realizó la separación de la fase acuosa y se aforó en un balón a 100mL (Ver figura 28 y anexo 2).



**Figura 28. Extracción de ácido ascórbico del mucílago de *Aloe vera*.**  
Fuente: Del Autor.

### 6.3 Métodos de análisis del contenido de vitamina C del mucílago de *Aloe vera* por CLAE.

#### 6.3.1 Análisis cualitativo.

Se hizo por comparación con el tiempo de retención (tr) por CLAE y se evaluaron dos sistemas de separación, dos columnas y dos fases móviles, empleando el estándar de ácido ascórbico para su identificación bajo las condiciones descritas en la tabla 15. A partir de los resultados obtenidos se seleccionó el mejor método de separación para el análisis cuantitativo.

**Tabla 15. Análisis del contenido de ácido ascórbico del mucílago de *Aloe vera* por CLAE.**

CONDICIONES DE ANÁLISIS		
<b>Equipo</b>	Cromatógrafo líquido HITACHI LaChrom; bomba L-2130; horno L-2300; detector UV-Vis L-2420	
<b>Software</b>	EZChrom Elite® data system	
<b>Columna</b>	Pinnacle DB C <sub>18</sub> (3 µm x 100mm x 3,2mm)	Purospher® Star RP-18 endcapped (3 µm) (55 mm)
	Temperatura 25°C	
<b>Fase móvil</b>	<b>I.</b> Tampón fosfato 50mM pH 2, 5	<b>II.</b> Solución agua (5% H <sub>2</sub> O) – ácido sulfúrico (95% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) pH 2,7
	Bajo condiciones isocráticas.	
<b>Sistemas de separación</b>	<b>I.</b> Ácido ortofosfórico 1%.	<b>II.</b> Agua (H <sub>2</sub> O) – ácido sulfúrico (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) pH 2,7
<b>Flujo</b>	0,3 mL / min; 1080 psi	
<b>Volumen de inyección</b>	20µL	
<b>Longitud de onda λ (nm).</b>	248 nm	
<b>Estándar</b>	L- Ácido ascórbico 99,9% (SIGMA)	

### 6.3.2 Análisis cuantitativo.

Se hizo por CLAE en las mismas condiciones que el análisis cualitativo y se realizó por el método de estándar externo, realizando una curva (área de picos versus concentración de patrones), con cinco puntos y por triplicado (Ver tabla 15 y 16). Todos los patrones se aforaron con solución de extracción, y se protegieron de la luz con papel aluminio, y se refrigeraron a 4 °C antes de la inyección en el cromatografo líquido.

- *Fortificación de la muestra:* se preparó un patrón de concentración conocida de 2 mg/L, a partir del estándar de ácido ascórbico, y se añadió un volumen de 50 mL de esta solución a la cantidad de muestra medida teniendo en cuenta el volumen final de aforo (100mL). De este modo se calculó la concentración final del patrón (1mg/L) con el que se contaminó antes de la inyección de la muestra y así determinar el porcentaje de recuperación del método.

Se debe tener en consideración que las pérdidas que se pudieran presentar durante el procedimiento, también contribuyen considerablemente a variar las cantidades de analito en la muestra que finalmente medirá el equipo.

**Tabla 16. Concentraciones de los patrones utilizadas para la Curva de calibración.**

Concentración de AA (mg/L)
(Solución madre)1000
2
1
0,5
0,25
0,125

### 6.3.3 Análisis estadístico.

Para el tratamiento de datos se utilizó el paquete estadístico IBM SPSS® statistics 20.0. A partir de los resultados del análisis cuantitativo se determinó:

- *Rango de Linealidad:* cada patrón de AA se inyectó por duplicado al cromatografo líquido. Se evaluó la linealidad de la curva de cuantificación

mediante pruebas de significancia estadística (falta de ajuste).

- *Sensibilidad:* para el parámetro de sensibilidad se evaluó el límite de detección y de cuantificación. Experimentalmente, se utilizaron los límites de confianza de la regresión, empleando cinco soluciones patrón de AA de (0,125; 0,25; 0,5; 1,0 y 2,0) mg/L.
- *Exactitud:* una solución patrón de 1,0 mg/L de AA se tomó como referencia para determinar la exactitud del método de cuantificación, realizando inyecciones por triplicado de dicho patrón en el cromatógrafo líquido.
- *Precisión:*
  - ✓ *Repetibilidad:* con una solución de 1,0 mg/L de AA y teniendo en cuenta que el analito es una vitamina sensible a la degradación por cambios de temperatura y radiación, se preparó cada día un patrón fresco, el cual se sometió al análisis en las mismas condiciones de operación (siempre el mismo operador, equipo, laboratorio y en pequeños intervalos de tiempo).
  - ✓ *Reproducibilidad:* la concordancia entre dos resultados individuales obtenidos con el mismo método sobre una solución patrón de AA de 1,0 mg/L fue sometida al ensayo, pero en condiciones diferentes (días diferentes).
- *Comparación entre medias:* las diferencias entre medias se analizaron mediante ANOVA de un factor. Además se incluyeron las pruebas específicas de *Shapiro Wilk*, *Levene* y *el contraste de Tukey* para establecer diferencias significativas entre las muestras.

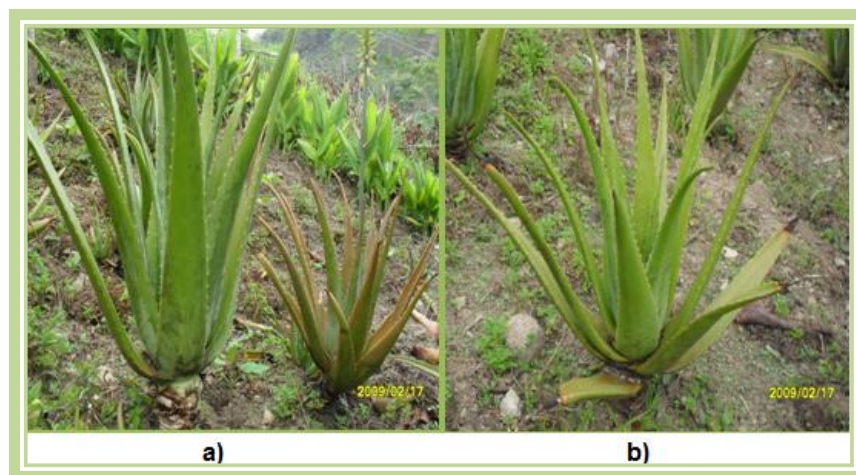
## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 7.1 Descripción de la muestra.

En la mayoría de los cultivos se observaron hojas carnosas, de buen tamaño y aspecto saludable, de color verde intenso brillante y de consistencia firme. Sin embargo, otras hojas presentaban manchas de coloración marrón, puntas y bordes quemados por causa de la incidencia directa del sol, mientras que otras presentaron una apariencia quemada por el frío (Ver figura 29).

El tamaño de las hojas varió considerablemente de un municipio a otro; Mistrató presentó mayor tamaño y peso siendo este último de 521.67g, seguida de Belén de Umbría, Santuario, La Florida y por último Marsella con un peso promedio de 371.47g.

El cultivo de Mistrató estaba en constante monitoreo retirándole las malezas, también tenía cultivos intermedios como frijol que fija nitrógeno, plantas aromáticas que actúan como repelente y/o insecticida contra pulgones, nematodos entre otros, lo cual le permitió un mejor desarrollo físico de las plantas [17].



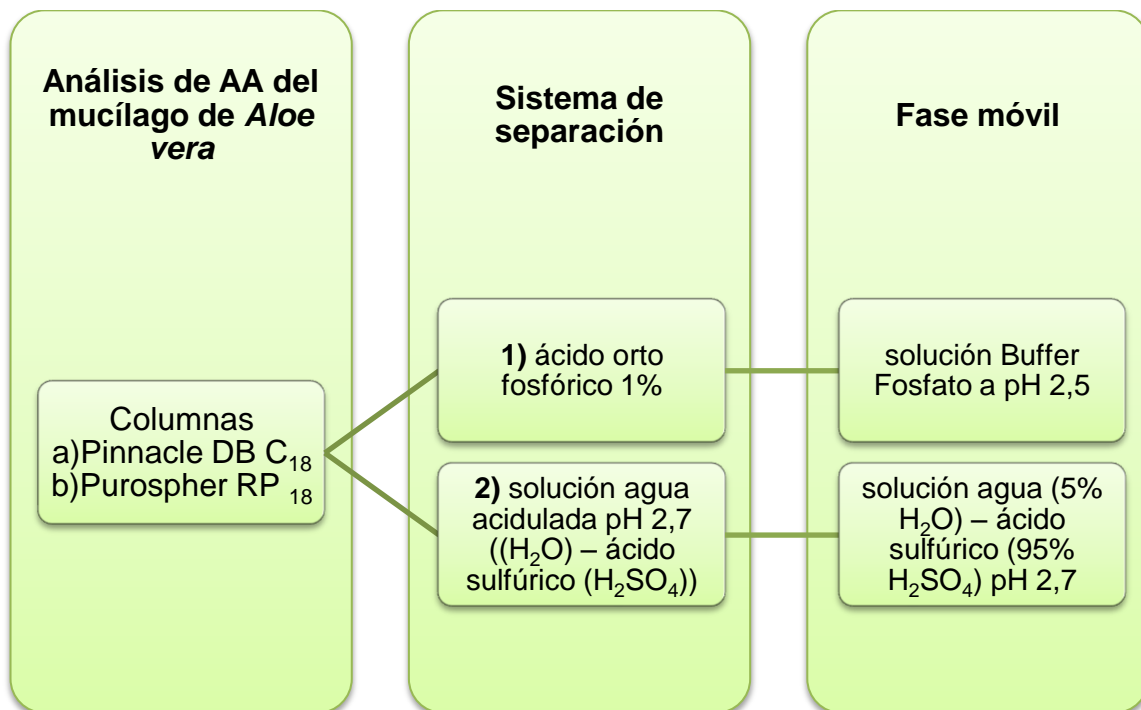
**Figura 29. Aspecto de las hojas de *Aloe vera***

**a) hojas quemadas por el sol; b) hojas quemadas por el frío.**

Fuente: Tomada en muestreo del cultivo de Santuario Risaralda por Gabriel Pulgarín [18].

## 7.2 Método de extracción del contenido de ácido ascórbico del mucílago de *Aloe vera*.

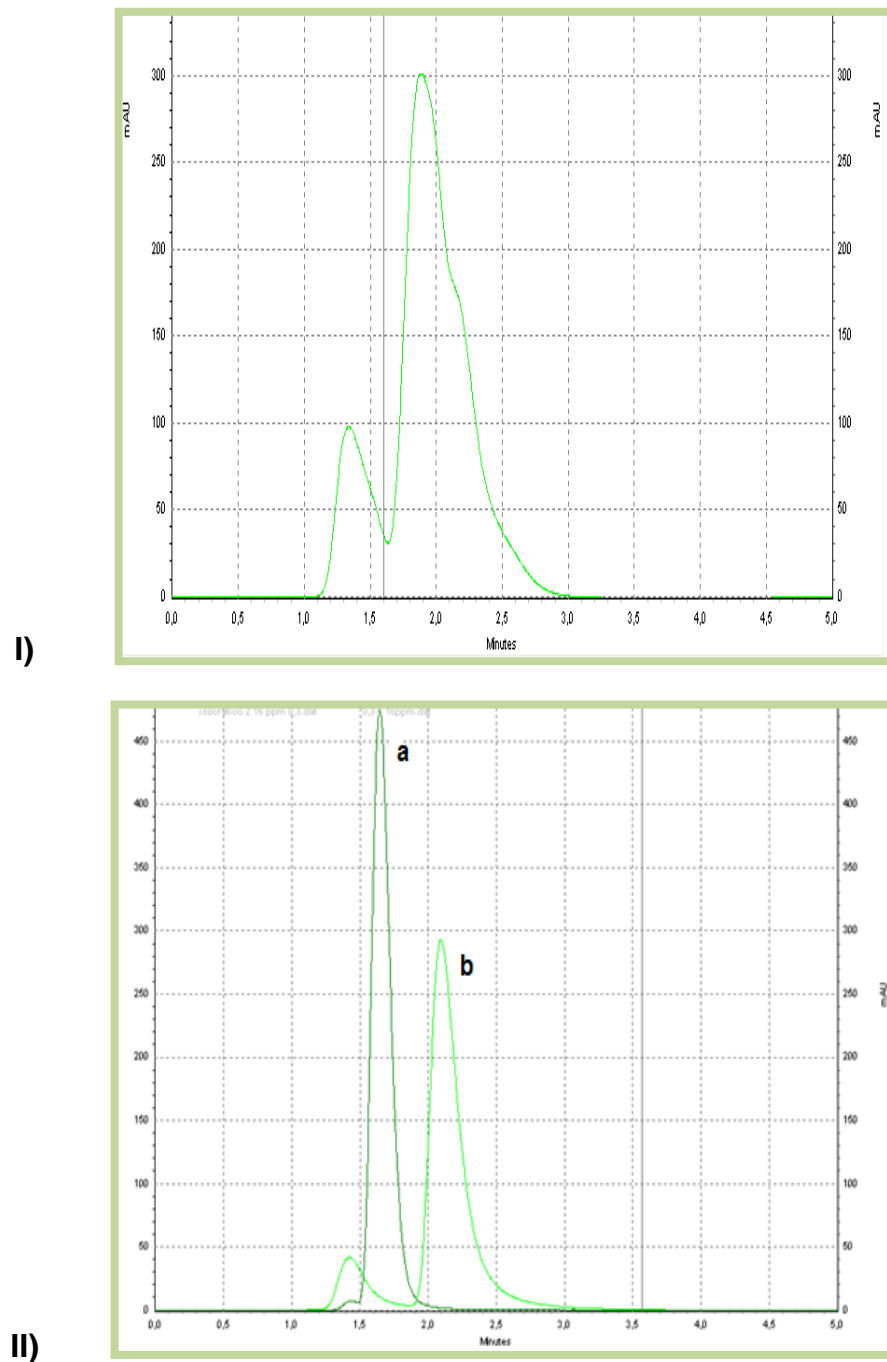
Se implementó dos metodologías reportadas en la bibliografía para el proceso de extracción de la vitamina C [1], [2], y se evaluaron dos sistemas de separación, dos fases móviles y dos columnas para seleccionar las mejores condiciones de análisis (Ver tabla 15 y figura 30).



**Figura 30. Esquema análisis del ácido ascórbico del mucílago de *Aloe vera*.**

Fuente: Del autor

En la figura 31 se puede observar que la resolución del cromatograma obtenido mediante el primer sistema de separación presentó un hombro en el pico del AA y un tiempo de retención ( $t_r$ ) igual a 2,0 min, lo cual implica una posible degradación del AA a productos intermedios. Mientras que utilizando la segunda metodología de extracción del AA del gel de *Aloe vera* el cromatograma presentó una mejor resolución con un solo pico sin hombro y un  $t_r$  igual a (1,6 -1,8) min. Además, se observa que empleando la columna Pinnacle DB C<sub>18</sub> se obtuvo buena intensidad de la señal y una resolución más definida del pico de AA en comparación con la otra columna.



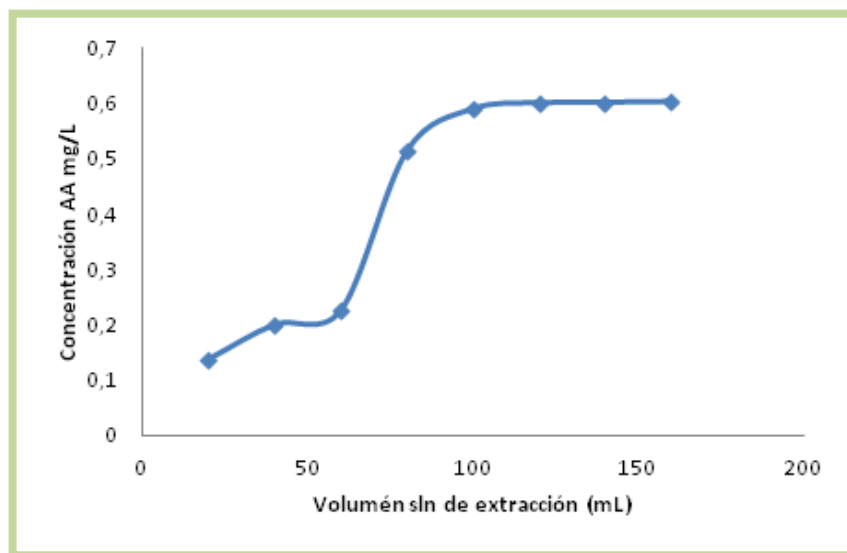
**Figura 31. Cromatogramas I) primer sistema de separación; II) segundo sistema de separación.**

**Columnas a) Pinnacle DB C18 b) Purospher RP 18**

Fuente: Del autor.

Por esta razón se trabajó con la segunda metodología de extracción utilizando reactivos y condiciones que evitan al máximo su deterioro y protegiendo al AA de la oxidación por el aire y la luz (Ver figura 28). Además de estos cuidados, tanto los patrones como las muestras se protegieron de la luz con papel aluminio y el análisis se realizó el mismo día.

Se determinó la cantidad ideal de solución de extracción respecto a la cantidad de muestra (relación masa-volumen); para ello, se realizó una curva entre la concentración (mg/L) de AA extraído y el volumen (mL) de solución de extracción adicionada. Como puede observarse en la figura 32, a partir de 100 mL de solución de extracción, el contenido de AA comenzó a permanecer constante para un tamaño de muestra de 32,208 g; por tal razón, se utilizó la mitad de muestra (16,1 g) y 50,0 mL de solución de extracción para los análisis .



**Figura 32. Extracción de ácido ascórbico del gel de *Aloe vera* con diferentes volúmenes de Agua (H<sub>2</sub>O)- ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pH 2,7.**

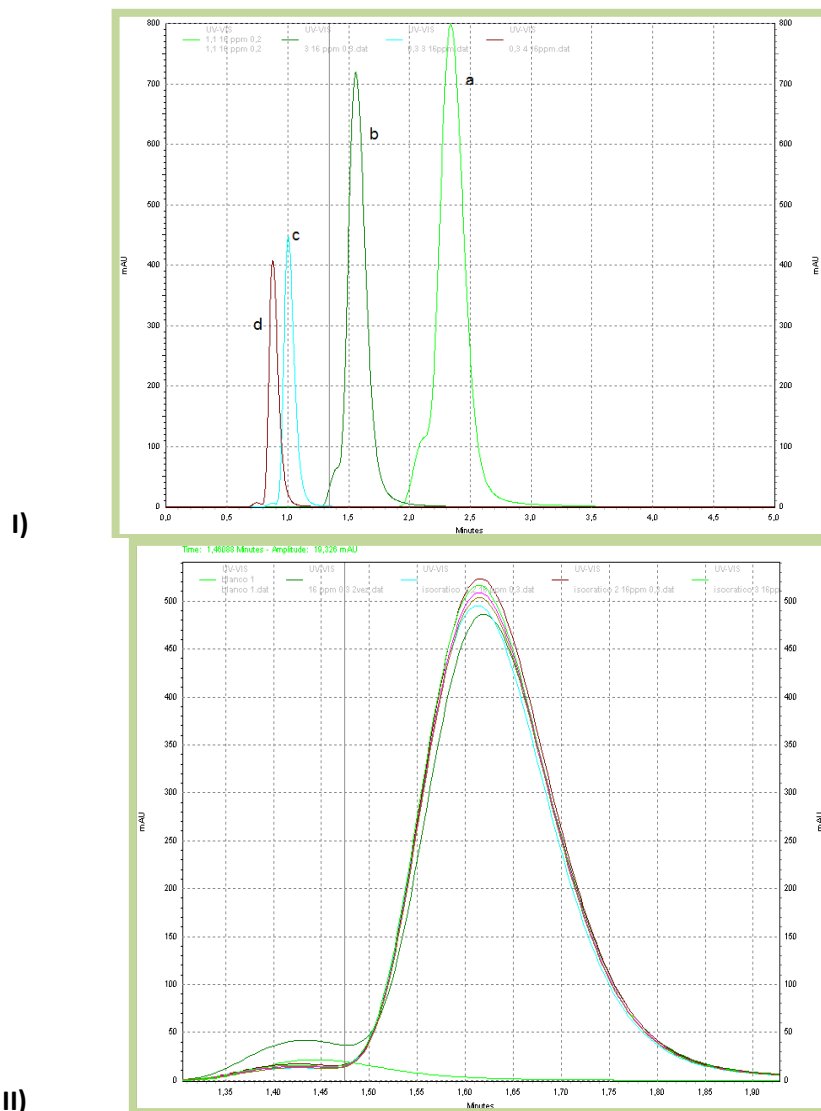
Fuente: Del autor.

### **7.3 Métodos de análisis del contenido de ácido ascórbico del mucílago de *Aloe vera*.**

#### **7.3.1 Análisis cualitativo.**

A partir de la metodología seleccionada anteriormente y empleando la columna Pinnacle DB C<sub>18</sub>, como mejor sistema de separación, se obtuvieron cromatogramas de picos gaussianos con tiempo de retención corto (que favorece la rapidez en la medida), con buena resolución y con ancho de banda menor de

0,5 min, en comparación con la otra metodología descartada, la cual favoreció los fenómenos dispersivos de la franja cromatográfica en la columna. Con una solución patrón de AA de 16 mg/L en agua acidulada y teniendo en cuentas los diferentes reportes [1], [2], [78], se hizo un barrido de onda del detector entre (200 a 320) nm, para obtener la mayor sensibilidad y resolución en la señal cromatográfica. Para ello se ensayaron diferentes flujos, pH, y mezclas (Ver tabla 15 y figuras 30 y 33).

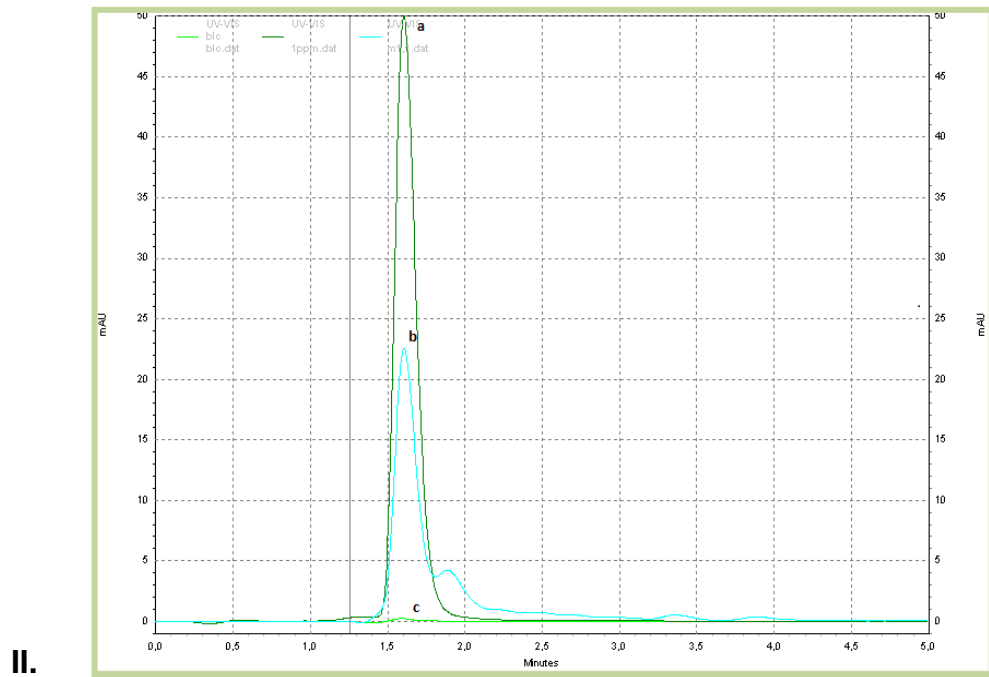
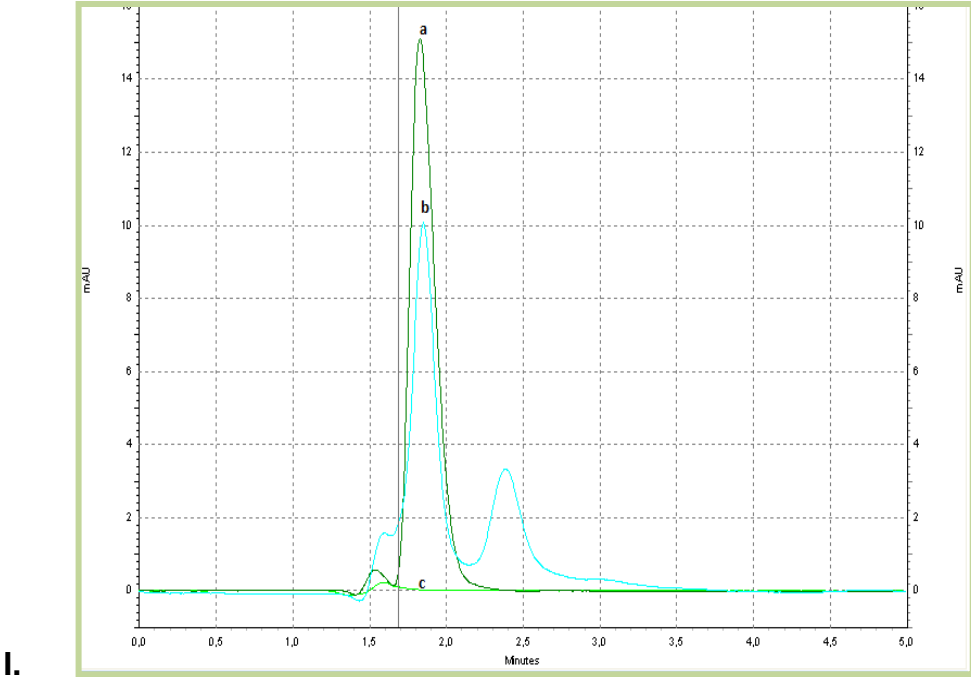


**Figura 33. Cromatogramas de solución patrón de AA de 16 mg/L en agua acidulada en Columna Pinnacle DB C18; Fase móvil: agua 5% - Ac.Sulfúrico 95% pH 2,7.**

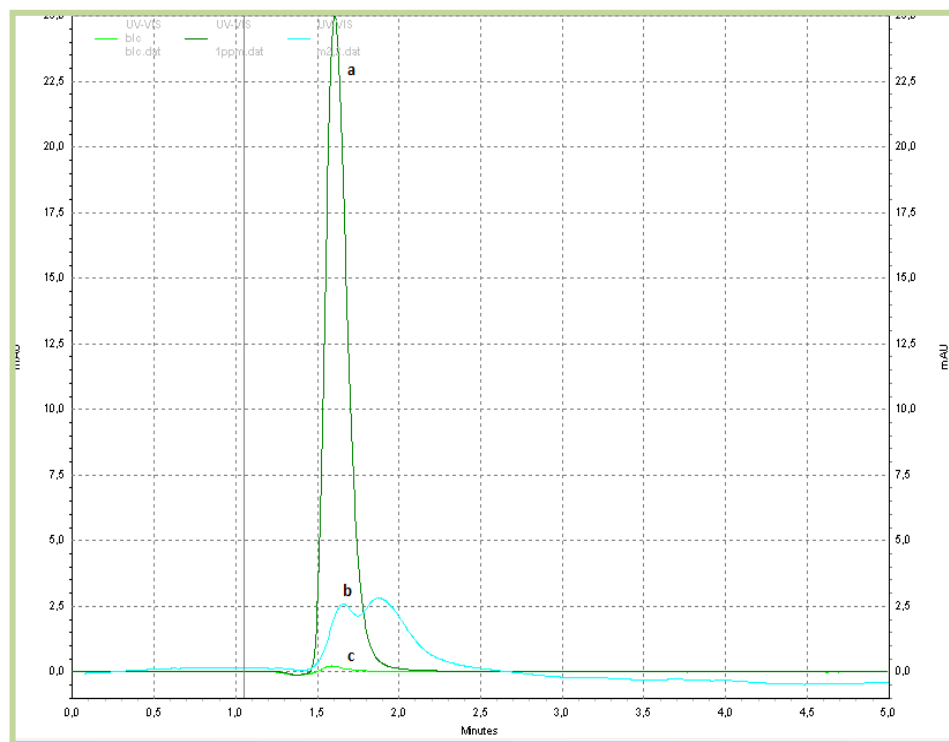
- I) Flujos a) 0,2 mL/min; b) 0,3 mL/min; c) 0,5 mL/min; d) 0,6mL/min  
 II) Zoom de Mezclas.

Fuente: Del autor.

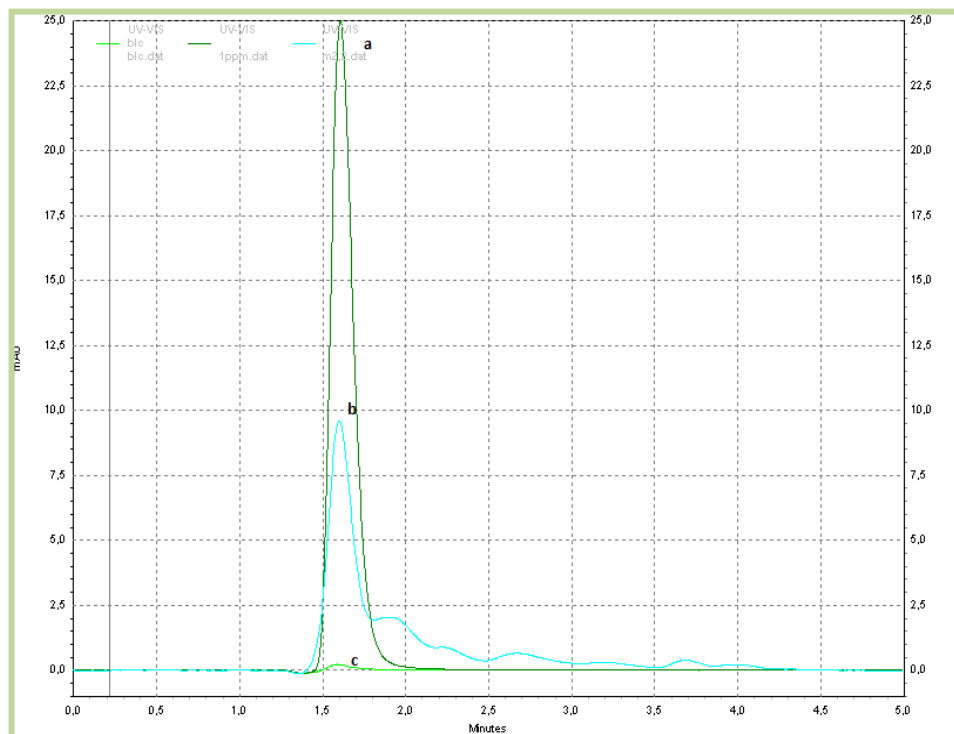
En la figura 34, se muestran los cromatogramas obtenidos para cada zona de cultivo de *Aloe vera*.



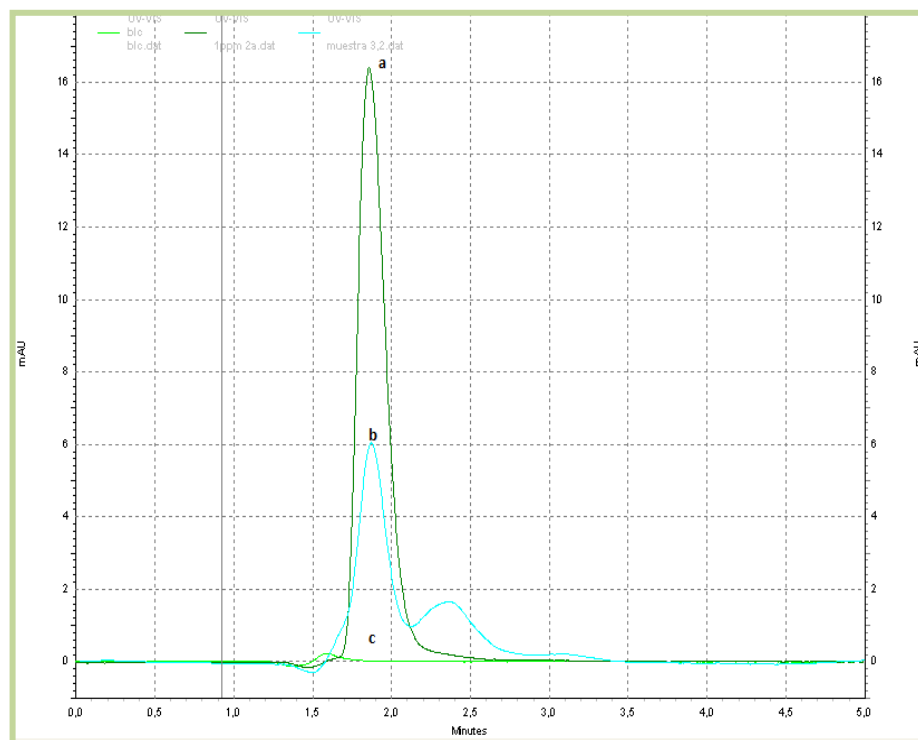
III.



IV.



V.



**Figura 34. Cromatogramas muestras de *Aloe vera* I. Belén; II. La Florida; III. Marsella; IV. Mistrató; V. Santuario. a) Patrón 1mg/L; b) Muestra; c) Blanco.**

### 7.3.2 Análisis cuantitativo.

Se determinó el contenido de AA del gel de *Aloe vera* con base en el método anteriormente implementado. Todas las muestras se analizaron por triplicado y en iguales condiciones. Una vez que el equipo alcanzó las condiciones indicadas se procedió a inyectar los patrones de menor a mayor concentración y luego las muestras (Ver tabla 15 y figura 30).

#### 7.3.2.1 Estimación de la concentración de ácido ascórbico en las muestras del mucilago de *Aloe vera* de las plantas procedentes de los cultivos del departamento de Risaralda.

En la tabla 17 se reportan los datos de las concentraciones (mg/L) halladas por triplicado para las zonas de estudio. Los datos corresponden al valor promedio de cada replica por muestra.

**Tabla 17. Concentración (mg/L) de AA en gel de *Aloe vera* por zona de cultivo**

REPLICAS* (mg/L)	ZONAS DE CULTIVO				
	BELEN	LA FLORIDA	MARSELLA	MISTRATO	SANTUARIO
1	0,6533	0,5085	0,2368	0,3317	0,3367
2	0,9250	0,6230	0,2362	0,5722	0,3923
3	0,4790	0,3702	0,1413	0,3116	0,4936
Tr (min)	1,8	1,6	1,6	1,6	1,8

\* Los valores corresponden al cálculo de la integración del área del pico cromatográfico mediante el software: EZChrom Elite Data system.

En la tabla 18, se reporta el valor expresado en base húmeda del contenido de AA del mucílago de *Aloe vera*, de plantas cultivadas en diferentes municipios de Risaralda (Ver anexo 3).

**Tabla 18. Contenido de AA/ Kg hoja de *Aloe vera***

Lugar de cultivo	N	Media	AA (mg/kg hoja)	Desviación estándar
BELEN	3	0,6858	4,259	0,2248
LAFORIDA	3	0,5006	3,109	0,1266
MARSELLA	3	0,2048	1,272	0,0550
MISTRATO	3	0,4052	2,517	0,1450
SANTUARIO	3	0,4075	2,531	0,0796

Como se observa, hay diferencias significativas de concentración de AA del gel de *Aloe vera* por lugar de cultivo, siendo Marsella la zona de menor concentración en comparación con Belén que tiene más del doble, presentando la más alta concentración de AA. Las demás zonas presentaron valores de concentración de AA muy similares entre sí.

### 7.3.3 Análisis estadístico.

#### 7.3.3.1 Rango de Linealidad.

Se evaluó la linealidad de la curva de cuantificación con las soluciones patrón de AA, con un criterio de linealidad de  $R \geq 0,990$ ,  $R^2 \geq 0,980$  y Coeficiente de variación  $CV \leq 5,00 \%$ . Los valores entre las pendientes de la curva de calibración por el método de estándar externo, no presentaron diferencias significativas a un

nivel de confianza del 95 %, por lo tanto se cuantificó empleando el modelo de regresión lineal con los datos sin promediar. En la tabla 19 se muestran las mediciones de los patrones. En las tablas 20 y 21 se muestran la recta de mejor ajuste, el ámbito de linealidad y el coeficiente de correlación para la curva del AA. Se utilizó la ecuación (1), el valor obtenido de R fue 0,999, la ordenada en el origen (a) = -46011,0 con límites de confianza superior e inferior de +9717,139 y -101739,139, b= 844080,774 con un intervalo de confianza al 95% de 790095,869 a 898065,679 (Ver anexo 4). El valor de F obtenido es muy grande (2475,971), ya que hay una relación lineal obvia entre x y, de manera que el valor medio cuadrático (CM) de la regresión es mucho más grande que el CM residual. Se obtuvo una recta ascendente, y como la correlación (prueba de Pearson) ha sido de valor 1 y 0,999, indica una correlación positiva muy fuerte.

**Tabla 19. Datos cromatográficos para diferentes concentraciones (mg/L) de AA.**

Conc. (mg/L)	0,125	0,25	0,5	1	2
Area	57598	174848	346413	828481	1633058
	58750	179284	351451	835999	1636058
	60922	177066	348932	832240	1634558
%CV	2,8565	1,2526	0,7219	0,4517	0,0918

**Tabla 20. Estadísticos descriptivos.**

	Media	Desviación estándar	N
AREA	608151,60	643914,845	5
CONCENTRACIÓN (mg/L)	0,77500	0,762398	5
Correlaciones			
		AREA	CONCENTRACIÓN (mg/L)
Correlación de Pearson	AREA	1,000	0,999
	CONCENTRACIÓN (mg/L)	0,999	1,000
Sig. (unilateral)	AREA	.	0,000
	CONCENTRACIÓN (mg/L)	0,000	.
N	AREA	5	5
	CONCENTRACIÓN (mg/L)	5	5

**Tabla 21. Resumen del modelo de regresión lineal.**

R		0,999 <sup>b</sup>				
R cuadrado		0,999				
R cuadrado corregida		0,998				
Error estándar de la estimación ( $S_{y/x}$ )		25865,611				
Estadísticos de cambio	Cambio en R cuadrado	0,999				
	Cambio en F	2475,971				
	gl1	1				
	gl2	3				
	Sig. Cambio en F	0,000				
<b>ANOVA<sup>a</sup></b>						
Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	1656498221569,393	1	1656498221569,393	2475,971	0,000 <sup>b</sup>
	Residual	2007089439,807	3	669029813,269		
	Total	1658505311009,200	4			

Coeficientes <sup>a</sup>			
Modelo 1		Ordenada en el origen	Xvariable 1
Coeficientes no estandarizados	B	-46011,000	844080,774
	Error típ.	17511,101	16963,336
Coeficientes tipificados	Beta		0,999
t		-2,628	49,759
Sig.		0,078	0,000
Intervalo de confianza de 95,0% para B	Límite inferior	-101739,139	790095,869
	Límite superior	9717,139	898065,679
a. Variable dependiente: AREA			
b. Variables predictoras: (Constante), CONCENTRACIÓN (mg/L)			

### 7.3.3.2 Sensibilidad.

Los resultados obtenidos se evaluaron a partir de la recta de regresión y se utilizó las ecuaciones (2) y (3), con los valores de  $y_B$  ( $=a$ ) y  $s_B$  ( $=s_{y/x}$ ) calculados previamente (Ver anexo 3 y 4). En la tabla 22 se muestran los valores del LD y LC.

De acuerdo con este parámetro, es posible indicar que la técnica de cuantificación por CLAE para el AA mediante curva de calibración, presentó buena sensibilidad a un nivel de confianza del 95%.

**Tabla 22. Valor calculado de los límites de detección y cuantificación.**

PARAMETRO	VALOR (mg/L)
LD	0,092
LC	0,306

### 7.3.3.3 Exactitud.

La exactitud del método fue comprobada por triplicado, calculando el porcentaje de recuperación (Ver anexo 3). La tabla 23 muestra los resultados junto con el coeficiente de variación ( $CV \leq 5\%$ ).

Los resultados obtenidos se encuentran dentro de los límites establecidos en la literatura para métodos cromatográficos (entre 80 a 120) % [65].

**Tabla 23. Porcentaje de recuperación de las muestras**

N	Tr (min)	$\bar{X}_{\text{Conc.M}}$ (mg/L)	% CV	$\bar{X}_{\text{Conc.M} + 1}$ (mg/L)	% CV	%R
1	1,8	0,6533	0,4398	1,8490	0,9090	119,58
2	1,8	0,9250	0,0948	1,8630	0,8539	93,82
3	1,8	0,4790	1,0832	1,3550	1,3634	87,56

En la tabla 24, se observan los porcentajes de error relativo en la determinación de una solución referencia de 1,0 mg/L de AA. Los valores de % CV son inferiores al 5%, indicando que el método de cuantificación por curva de calibración para el AA, presentó buena exactitud.

**Tabla 24. Determinación de la concentración de una solución referencia de 1,0 mg/L de ácido ascórbico por curva de calibración.**

REPLICAS (mAU)	DÍAS				
	1	2	3	4	5
1	12,65	12,64	13,31	15,13	15,17
2	12,51	12,6	13,28	15,07	15,15
3	12,45	12,57	13,3	15	15,1
$\bar{x}$	12,54	12,60	13,30	15,07	15,14
<b>S</b>	0,1026	0,0351	0,0153	0,0651	0,0361
<b>%CV</b>	0,8187	0,2786	0,1149	0,4318	0,2381

#### 7.3.3.4 Precisión.

En la tabla 25, se observa la repetibilidad del método de cuantificación del AA, empleando una solución de referencia de 1,0 mg/L. El error es inferior al 3,0 %, Los valores de CV indican que el método de cuantificación por CLAE presenta buena repetibilidad.

**Tabla 25. Repetibilidad de un patrón de 1,0 mg/L de ácido ascórbico medido durante cinco días consecutivos.**

REPLICAS (mg/L)	DÍAS				
	1	2	3	4	5
1	0,990	0,982	1,027	1,012	1,032
2	0,978	0,977	1,012	0,991	1,013
3	0,947	0,959	0,993	0,941	0,987
$\bar{x}$	0,97	0,97	1,01	0,98	1,01
<b>S</b>	0,0222	0,0121	0,0170	0,0365	0,0226
<b>%CV</b>	2,2836	1,2437	1,6859	3,7168	2,2352
<b>Error</b>	2,83	2,73	1,07	1,87	1,07

En cuanto a la reproducibilidad del método se emplearon tiempos diferentes de análisis, (cada 30 días durante 3 meses). La tabla 26, indica que existe buena reproducibilidad del método de cuantificación de AA en el tiempo; hay que tener en cuenta que el patrón fue preparado inmediatamente antes de realizar las medidas,

puesto que su estabilidad es mínima. Los valores de % CV son inferiores al 5%, indicando que el método de cuantificación es reproducible en el tiempo.

**Tabla 26. Reproducibilidad del método de cuantificación de un patrón de 1mg/L de AA medido una vez al mes.**

REPLICAS (mAU)	MES		
	1	2	3
1	13,41	14,45	15,31
2	13,37	14,32	15,24
3	13,28	14,19	15,15
$\bar{x}$	13,35	14,32	15,23
S	0,0666	0,1300	0,0802
<b>%CV</b>	0,4986	0,9078	0,5265

### 7.3.3.5 Comparación entre medias.

Para el análisis de las muestras se llevó a cabo una comparación múltiple de medias, calculando estadísticamente la relación numérica entre las variables mediante ANOVA de un factor.

Como se explicó anteriormente, hay dos posibles fuentes de variación: la debida al error aleatorio en la medida de la concentración, dada por la varianza en la medida, y la debida a las variaciones reales en la concentración del AA en las diferentes muestras por lugar de cultivo, dada por la varianza muestral.

La salida ANOVA proporcionada por el paquete estadístico IBM SPSS® statistics 20.0 para los datos en la tabla 17 se muestra a continuación:

Como son muestras menores de 50 datos se utilizó el *test de Shapiro Wilk*. Se observó que en general, los Sig (p-valor ó valor de p) en la tabla 27 han salido mayores que el nivel de significancia 5%, por lo tanto se concluye que las muestras de concentraciones se distribuyen en forma normal en cada zona de cultivo, cumpliendo con el primer requisito de la Normalidad de las concentraciones del análisis de varianza de un factor.

**Tabla 27. Condición 1: Prueba de Normalidad.**

	Lugar de cultivo	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	p-valor
Concentración AA (mg/L)	BELEN	0,984	3	<b>0,760</b>
	LA FLORIDA	0,997	3	<b>0,896</b>
	MARSELLA	0,755	3	<b>0,010</b>
	MISTRATO	0,807	3	<b>0,132</b>
	SANTUARIO	0,972	3	<b>0,682</b>

La otra condición es la Homogeneidad de varianzas, se interpretó gráficamente (figura 35), cada grupo tiene su promedio, dos desviaciones hacia la derecha y dos desviaciones hacia la izquierda del promedio. Se aprecia que la zona de cultivo donde la concentración del AA fue menor corresponde a Marsella, en comparación con Belén donde la concentración fue mayor, y para las demás zonas de cultivo son medias muy similares. En general se concluye que gráficamente si hay homogeneidad para las muestras. También se realizó el *test de Levene* para comprobar estadísticamente tal homogeneidad (tabla 28). El valor p hallado, es mayor que el nivel de significancia de 0,05 por lo tanto se concluye que las cinco muestras tienen varianzas homogéneas. Cumpliendo de este modo con el segundo requisito para llevar a cabo ANOVA de un factor.

**Tabla 28. Condición 2: Prueba de homogeneidad de varianzas.**

Estadístico de Levene	gl1	gl2	P-valor
1,524	4	10	<b>0,268</b>

Con ANOVA de un factor se calculó el valor del contraste F, en la tabla 29 los resultados muestran que el cuadrado medio entre muestras (0,091) es mayor que el cuadrado medio dentro de muestras (0,019), y el resultado del contraste F muestra que esta diferencia es significativa.

Se observa que el valor calculado de Sig ( $p_{\text{valor}}$  ó valor de  $p= 0,021$ ) es menor a 0,05 es decir, es un valor que está por debajo del nivel de significancia del 5%.

**Tabla 29. Descriptivos ANOVA de un factor.**

Lugar de cultivo	N	Media	Desv estándar	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
BELEN	3	0,6858	0,2248	0,1298	0,1274	1,2441	0,4790	0,9250
LAFLOIDA	3	0,5006	0,1266	0,0731	0,1861	0,8150	0,3702	0,6230
MARSELLA	3	0,2048	0,0550	0,0317	0,0682	0,3413	0,1413	0,2368
MISTRATO	3	0,4052	0,1450	0,0837	0,0450	0,7654	0,3116	0,5722
SANTUARIO	3	0,4075	0,0796	0,0459	0,2099	0,6052	0,3367	0,4936
Total	15	0,4408	0,1998	0,0516	0,3301	0,5514	0,1413	0,9250
Fuente de variación	Suma de cuadrados		gl	Media cuadrática	F	p-valor		
Entre-muestras	0,365		4	<b>0,091</b>	4,708	<b>0,021</b>		
Dentro-muestras	0,194		10	<b>0,019</b>				
Total	0,559		14					

Entonces para interpretar entre qué zonas de cultivo las diferencias son significativas realmente, se llevó a cabo la prueba post test del contraste de *Tukey* (tablas 30-31). SPSS da la oportunidad de comparar en particular determinadas zonas de cultivo con respecto a las demás. Los valores de Sig encontrados (0,012) son menores del nivel de significancia de 0,05.

Entonces, de acuerdo a todo lo anterior se *rechaza* la hipótesis nula ( $H_0$ ): Las medias muestrales no difieren significativamente.

$$H_0: \mu_{BELEN} = \mu_{FLORIDA} = \mu_{MARSELLA} = \mu_{MISTRATO} = \mu_{SANTUARIO}$$

Por lo tanto, se concluye que si hay diferencias significativas de concentración de AA del gel de *Aloe vera* por lugar de cultivo: siendo Marsella la zona de menor concentración en comparación con Belén que tiene la más alta concentración de AA. Las demás zonas de cultivo de *Aloe vera* presentan concentraciones similares del contenido de AA (Ver tabla 18 y figura 35).

**Tabla 30. Comparaciones Múltiples.**

Variable dependiente: Concentración AA (mg/L) HSD de Tukey						
(I) Lugar de cultivo	(J) Lugar de cultivo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
BELEN	LAFLOIDA	0,1852000	0,1136775	0,513	-0,188922	0,559322
	MARSELLA	<b>0,481000*</b>	0,1136775	<b>0,012</b>	0,106878	0,855122
	MISTRATO	0,2806000	0,1136775	0,174	-0,093522	0,654722
	SANTUARIO	0,2782333	0,1136775	0,180	-0,095889	0,652355
LAFLOIDA	BELEN	-0,1852000	0,1136775	0,513	-0,559322	0,188922
	MARSELLA	0,2958000	0,1136775	0,143	-0,078322	0,669922
	MISTRATO	0,0954000	0,1136775	0,912	-0,278722	0,469522
	SANTUARIO	0,0930333	0,1136775	0,919	-0,281089	0,467155
MARSELLA	BELEN	<b>-0,481000*</b>	0,1136775	<b>0,012</b>	-0,855122	-0,106878
	LAFLOIDA	-0,2958000	0,1136775	0,143	-0,669922	0,078322
	MISTRATO	-0,2004000	0,1136775	0,443	-0,574522	0,173722
	SANTUARIO	-0,2027667	0,1136775	0,432	-0,576889	0,171355
MISTRATO	BELEN	-0,2806000	0,1136775	0,174	-0,654722	0,093522
	LAFLOIDA	-0,0954000	0,1136775	0,912	-0,469522	0,278722
	MARSELLA	0,2004000	0,1136775	0,443	-0,173722	0,574522
	SANTUARIO	-0,0023667	0,1136775	1,000	-0,376489	0,371755
SANTUARIO	BELEN	-0,2782333	0,1136775	0,180	-0,652355	0,095889
	LAFLOIDA	-0,0930333	0,1136775	0,919	-0,467155	0,281089
	MARSELLA	0,2027667	0,1136775	0,432	-0,171355	0,576889
	MISTRATO	0,0023667	0,1136775	1,000	-0,371755	0,376489

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

En la tabla 31 se da a conocer las comparaciones según la homogeneidad de los subconjuntos obtenidos. Los valores de Sig son menores al 5% (0,007; 0,008; 0,002). Rechazando la hipótesis nula de la no diferencia significativa. Se hicieron tres contrastes:

1. Subconjunto 1 versus muestras Belén
2. Subconjunto 2 versus muestras Marsella
3. Muestra Belén versus muestra Marsella

Aceptando entonces, que hay diferencia entre las muestras de Belén y Marsella y encontrando similitud en los datos de las demás zonas.

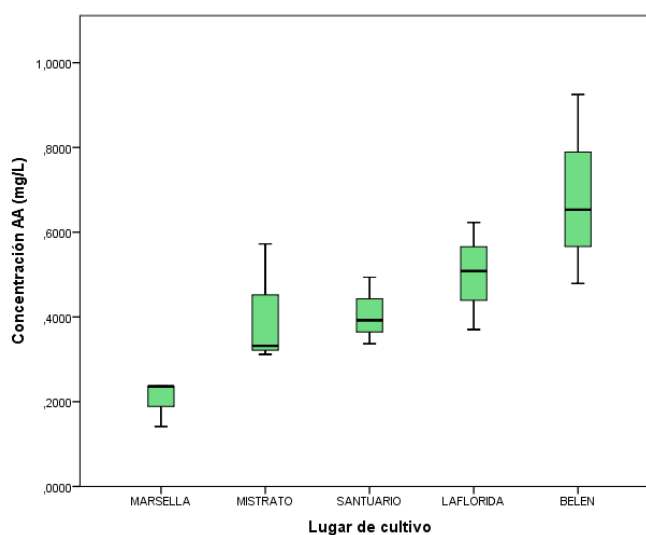
**Tabla 31. Subconjuntos homogéneos por zona de cultivo y Pruebas de contraste**

HSD de Tukey			
Lugar de cultivo	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
MARSELLA	3	0,204767	
MISTRATO	3	0,405167	0,405167
SANTUARIO	3	0,407533	0,407533
LAFLORIDA	3	0,500567	0,500567
BELEN	3		0,685767
Sig.		0,143	0,174

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

Prueba de contraste de los subconjuntos	Contraste	Valor del contraste	Error típico	t	gl	Sig. (bilateral)
Asumiendo igualdad de varianzas	1	-0,306258	0,0898700	-3,408	10	0,007
	2	0,294992	0,0898700	3,282	10	0,008
	3	0,481000	0,1136775	4,231	10	0,002



**Figura 35. Comparación múltiple de Medias obtenidas en cinco muestras de *Aloe* para el contenido de AA.**

Fuente: Del autor.

## 7.4 DISCUSIÓN GENERAL.

Se emplearon muestras de *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller), estas plantas fueron recolectadas manualmente en las fincas: La Esperanza (Belen de Umbría), La Palma (La Florida), La Aurora (Marsella), La Magdalena (Mistrató), Pite Tierra (Santuario). Todas pertenecientes al departamento de Risaralda Colombia.

Se recolectaron las hojas de mayor tamaño, de una coloración verde y marrón, con características físicas diferentes. Con el objetivo de tener mayor cantidad de mucílago y un muestreo representativo. Teniendo en cuenta la variabilidad en el número de plantas en cada cultivo, la topografía y las condiciones edafoclimáticas del lugar de cultivo (Ver antecedentes geográficos numeral 5.1)

Las zonas de estudio se ubican a diferentes altitudes entre (1609 – 2070) msnm. Encontrándose entre las alturas favorables para el cultivo de *Aloe vera*, que comprende un rango aproximado entre (400-2500) msnm, con un rango óptimo de (900-1600) msnm [7].

Se analizó la variabilidad de los resultados obtenidos por zona de estudio empleando las pruebas de ANOVA de un factor y de *Tukey*. Se encontró que existen diferencias significativas de concentración de AA del gel de *Aloe vera* por lugar de cultivo (Ver tablas 29 – 31 y ver figura 35).

Se determinó que el valor del mayor y menor contenido de vitamina C en base húmeda de *Aloe vera* fue de 4,259 mg ( $\pm$  0,2248) / kg de muestra y de 1,272 mg ( $\pm$  0,0550) / kg de muestra, que corresponden a los cultivos de Belén de Umbría y Marsella respectivamente (Ver tabla 18).

Se destaca Marsella, la zona de menor concentración de AA de que en comparación con Belén de Umbría que tiene más del doble en concentración, presentando el mayor contenido de vitamina C con respecto a las demás fincas (Ver tabla 18).

El resto de los municipios como La Florida, Mistrató y Santuario presentaron contenidos de AA muy similares entre sí, debido a que se obtuvieron valores entre (3,109 y 2,517) mg de AA/ kg de muestra húmeda (Ver tabla 18).

Algunos estudios [73] señalan una concentración de la vitamina C en 101,3 mg / 100 g de material de *Aloe* aproximadamente.

Al comparar los resultados obtenidos en este trabajo con otros autores [17 y 18] se puede afirmar que existe una relación entre las diferencias en la composición química del mucilago de *Aloe vera*, con los datos obtenidos para Marsella y Belén de Umbría. Estas diferencias se pueden atribuir al contenido de nutrientes en el suelo. La finca La Aurora en Marsella, presenta un tipo de textura del suelo franco arcillosa, por lo que se considera pobre al almacenar pocos elementos nutrientes y posee un nivel bajo de fósforo (P= 1ppm) y potasio (K =0,17 meq/100g), desfavoreciendo el crecimiento y el ciclo normal de producción del cultivo. Por otra parte, el suelo de La finca La Esperanza en Belén de Umbría tiene una textura franco-limosa, ósea que retiene bien el agua y los abonos. Siendo mucho más apta para el cultivo de sábila, con un nivel de P = 2 ppm y K = 0,48 meq/100g (Ver anexo 5).

Según los estudios realizados por el grupo de Oleoquímica de la Universidad Tecnológica de Pereira en estas mismas zonas de cultivo [17 y 18], se encontró una gran diferencia en cuanto al contenido de Materia Orgánica (M.O) para Marsella y Belén de Umbría de (6,16 y 16)% respectivamente; estos contenidos de M.O ayudan a mantener en forma los nutrientes esenciales como N, P y S para el crecimiento de la planta, como se observó en la zona de Belén de Umbría que tuvo un alto contenido de Nitrógeno 0,6 %. Mientras que Marsella obtuvo el más bajo (0,23%) (Ver anexo 5), por lo cual se presume que la planta contiene una gran cantidad de agua y que los minerales y metales que están contenidos dentro de sus derivados antraquinónicos como la aloína (barbaloína), diferentes derivados antracénicos, ácidos orgánicos, vitaminas A, C y B, aminoácidos, polisacáridos y glicoproteínas [78], se encuentran en pocas cantidades.

Las diferencias encontradas en cuanto al contenido de AA se deben a factores tales como variedad, cultivar, estado de maduración, clima o ubicación geográfica, parte analizada, manipulación post- cosecha y almacenamiento [71]. Por lo que se considera importante realizar un análisis multivariado con los diferentes parámetros de estudio de cada municipio, su análisis de suelo y bromatológico para establecer mejor la correlación entre las diferentes variables.

Los resultados de las variaciones del contenido de AA del mucilago de *Aloe vera* contribuyen al desarrollo e implementación del soporte técnico científico para productores y procesadores, por medio del Grupo de Oleoquímica de la

Universidad Tecnológica de Pereira, fortaleciendo la cadena productiva del *Aloe vera* en Risaralda.

Actualmente el mercado nacional e internacional ha visto el surgimiento de productos comerciales del gel de *Aloe vera* como valor agregado (en la industria cosmética, alimenticia y farmacéutica), generando una gran demanda de éste en todas sus presentaciones.

## 8. CONCLUSIONES.

- ✓ Se realizó el análisis del contenido de ácido ascórbico (AA), arrojando que existen diferencias significativas de concentración de la vitamina C del mucilago de *Aloe vera* de plantas cultivadas en los municipios del departamento de Risaralda (Belén de Umbría, La Florida, Marsella, Mistrató y Santuario).
- ✓ Se implementó una adecuada metodología de análisis cualitativo y cuantitativo mediante CLAE con detector UV-Vis para la vitamina C del gel de *Aloe vera* a partir de la literatura disponible.
- ✓ El contenido de vitamina C evaluado del mucílago de *Aloe vera* de plantas cultivadas en diferentes municipios de Risaralda, presenta diferencia estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95%. Siendo Marsella la zona de menor concentración de ácido ascórbico (1,272 mg AA / kg de muestra húmeda) en comparación con Belén que tiene la más alta (4,259 mg AA / kg de muestra húmeda). Las demás zonas de cultivo presentan concentraciones de AA muy similares oscilando entre (3,109 y 2,517) mg de AA/ kg de muestra húmeda.
- ✓ Teniendo en cuenta los valores estadísticos obtenidos, se concluye que, la metodología de cuantificación del ácido ascórbico por CLAE, bajo las condiciones de análisis cromatográfico señaladas, presentó buena linealidad ( $R= 0,998$ ), precisión (repetibilidad (Error < 3%) y reproducibilidad (CV < 5%)), exactitud (%R = 87,56 - 119,58) y sensibilidad (LD= 0,092mg/L; LC= 0,306 mg/L) a un nivel de confianza del 95%.

## 9. RECOMENDACIONES.

- ✓ Se recomienda ampliar el estudio a un mayor número de fincas y se propone hacer un análisis multivariado para caracterizarlas.
- ✓ Se recomienda trabajar en condiciones de laboratorio controladas, para evaluar el contenido de AA, evitando cambios no deseados de temperatura, incidencia de la radiación lumínica y humedad puesto estos factores pueden alterar las lecturas e introducir errores en los resultados.
- ✓ Se recomienda estandarizar la metodología de extracción del analito del mucílago de *Aloe vera*, determinando la cantidad ideal de solución de extracción respecto a la cantidad de muestra (relación masa - volumen). Teniendo en cuenta las modificaciones incluidas en este estudio como el uso de una solución de agua acidulada a pH = 2,7, una extracción sólido-líquido en baño de hielo por 30 min, centrifugar a 6000 r.p.m durante 15 min y proteger tanto las muestras como los patrones de la luz con papel aluminio realizando el análisis el mismo día.
- ✓ Se recomienda evaluar la curva de calibración con el método estándar interno, para determinar las probables interferencias debidas al efecto de la matriz.
- ✓ Se recomienda estudiar la purificación y liofilización del mucílago, con el fin de generar un producto, que se pueda comercializar dentro de la apuesta productiva regional: cadena de mercados verdes y biocomercio, cumpliendo con las reglamentaciones exigidas por el INVIMA.

## BIBLIOGRAFIA.

- [1]. ODRIOZOLA S., Isabel.; HERNANDEZ J., Teresa. and MARTÍN B., Olga. *Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits*. En: *Food Chemistry*. 2007; Vol. 105, pp 1151-1158, ISSN-0308-8146.
- [2]. SÁNCHEZ, M. C.; CÁMARA, M.; DÍEZ, C. and TORIJA, M. E. *Comparision of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans (Phaseolus vulgaris L.)*. En: *European Food Research and Technology*. 2000; Vol. 210, pp 220-225.
- [3]. INTERNATIONAL ALOE SCIENCE COUNCIL - "IASC Presents a Scientific Primer on Aloe". [on line]. En: [http://www.iasc.org/pdfs/IASC\\_Aloe\\_vera\\_A\\_Scientific\\_Primer.pdf](http://www.iasc.org/pdfs/IASC_Aloe_vera_A_Scientific_Primer.pdf). 2009.
- [4]. VEGA, G.A.; AMPUERO, N.; DÍAZ, L. y LEMUS, R. *El aloe vera (Aloe barbadensis miller), como componente de alimentos funcionales*. En: *Rev. Chil. Nutr.* 2005; Vol. 32, pp 208-214, ISSN 0717-7518.
- [5]. HURTADO, Jesus María. *Colombia en el contexto mundial de la produccion de Aloe vera*. [online]. En: <http://madr.espacioblog.com/post/2006/03/25/colombia-el-contexto-mundial-la-produccion-aloe-vera>. 2007.
- [6]. FIGUEREDO, Cristian Andrés y MORALES, Juan Camilo. *Plan integral para la comercialización de Aloe vera en Colombia*. Trabajo de Grado, Facultad de Administración, Universidad del Rosario, Bogotá D.C., 2010.
- [7]. VARON, J.; ALVAREZ, K.; TORRES, J.; LOPÉZ, Y. y GUERRERO, G. *Obtención de algunos parámetros de referencia del suelo y del mucílago del Aloe vera cultivado en el corregimiento de Combia Risaralda y en el municipio de Montenegro Quindío*. En: *Scientia et Technica*, año XIII. mayo 2007; Vol. 33, pp 218-222.
- [8]. VARON, J. y ALVAREZ, K. *Obtención de algunos parámetros de referencia del suelo y del mucílago del Aloe vera cultivado en el corregimiento de Combia municipio de Pereira Risaralda*. Trabajo de Grado, Tecnología Química, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira Colombia, 2007.
- [9]. JUAREGUI, A. *Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de plantas que crecen en Cuba*. Trabajo de grado, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, La Habana -Cuba, 1991.
- [10]. ATHERTON, P. *Aloe vera: magic or medicine?* En: *Nursing standard*. 1998; Vol. 12, p 49.

- [11]. SÁNCHEZ, Viviana y SANTA, Jhon. *Estudio de antraquinonas presentes en extractos de mucílago y hojas de Aloe vera de plantas cultivadas en la región Cafetera*. Trabajo de grado, Tecnología Química, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, 2009.
- [12]. TORRE, J. y LOPÉZ, Y. *Determinación de nutrientes en el suelo del cultivo de Aloe vera y análisis bromatológico al mucílago procedentes de la hacienda Nápoles en el municipio de Montenegro Quindío*. Trabajo de grado, Tecnología Química, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira Colombia, 2007.
- [13]. EL PRESIDENTE DE LA REPÚBLICA DE COLOMBIA en ejercicio de las facultades constitucionales y legales, en especial las conferidas en el numeral 11 del artículo 189 de la Constitución Política, la ley 9° de 1979 y el artículo 245 de la ley 100 de 1983, DECRETA: DECRETO 2266 de 2004; DECRETO 3553 de 2004 y DECRETO 337 de 1998. INVIMA: mayo de 2008.
- [14]. ESHUN, K. and HE, Q. *Aloe Vera: a valuable ingredient for the food, pharmaceutical and cosmetic industries - a review*. En: Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2004; Vol. 44, pp 91-96.
- [15]. BERNAL, Y. y CORREA, J. *Especies vegetales promisorias*. En: Convenio Andrés Bello, Colombia 1994; Vol. 342.
- [16]. MOLERO P., Tamara y MATOS, Ángela. *Efectos de la inducción artificial de la poliploidía en plantas de Aloe vera (L.)* En: Boletín del centro de investigaciones biológicas. 2008; Vol. 42, pp 11-13.
- [17]. HERNÁNDEZ, Jhoana y GIRALDO, Juan. *Estudio bromatológico y microbiológico al mucílago de aloe vera y fertilidad de los suelos de cultivos de los municipios de Guática y Mistrató del departamento de Risaralda*. Trabajo de Grado, Tecnología Química, Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira Colombia. 2011.
- [18]. PULGARÍN, Gabriel. *Estudio bromatológico, microbiológico, foliar y de fertilidad de los suelos en los cultivos de Aloe vera barbadensis Miller en tres fincas del departamento de Risaralda*. Trabajo de Grado, Tecnología Química, Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira Colombia. 2010.
- [19]. AGARWALA, O.P. *Whole leaf Aloe gel vs. standard Aloe gel*. En: Drug & Cosmetic Industry. 1997; Vol. 160, pp 22-27.
- [20]. YIMEI, Jia; GUODONG, Zhao and JICHENG, Jia. *Preliminary evaluation: The effects of Aloe ferox Miller and Aloe arborescens Miller on wound healing*. En: Journal of Ethnopharmacology. 2008; Vol. 120, pp 181-189.
- [21]. LLAMAS, Kirsten Albrecht. *TROPICAL FLOWERING PLANTS: A guide to identification and cultivation*. Timber Press: Oregon EEUU, 2003; pp 125-127.

- [22]. GONZÁLEZ L., Ginés. *Los árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares*. 2ª ed.; Mundi-Prensa: Madrid, 2006; Vol. 2, pp 1438-1439.
- [23]. DEHIN, Robert. *El poder curativo del Aloe vera*. Ediciones Robinbook: Barcelona, 2001; p 333.
- [24]. GUILLOT O., Daniel; LAGUNA L., Emilio y ROSSELLÓ P., Josep Antoni. *La familia Aloaceae en la flora alóctona valenciana*. En: *Monografías de la revista Bouteloua*. Septiembre, 2009; Vol. 6, pp 1-58.
- [25]. ITIS (Integrated taxonomic information system).[on line]. En: [www.itis.gov](http://www.itis.gov). 2011.
- [26]. SILVA, H.; SAGARDIA, S.; SEGUEL, O.; TORRES, C.; FRANCK, N. and CARDEMIL, L. *Effect of water availability on growth and water use efficiency for biomass and gel production in Aloe vera (Aloe barbadensis M.)*. En: *Industrial Crops and Products*. January, 2010; Vol. 31, pp 20-27.
- [27]. *El cultivo de la sábila (Aloe barbadensis)*.[on line]. En: <http://www.cadenahortofruticola.org/admin/bibli/406sabila.pdf>. 2011; pp 1-7.
- [28]. MARTÍNEZ, María Julia; BADELL, José Betancourt y GONZÁLEZ, Nancy Alonso. *Ausencia de actividad antimicrobiana de un extracto acuoso liofilizado de Aloe vera*. En: *Revista cubana de plantas medicas*. La Habana, Cuba, 1996; Vol. 1.
- [29]. POSSO, Pedro Santiago. *LA SABILA*. pp 20,22,25-27,29-31.
- [30]. CALZADA R., A.M. y PEDROZA S., A. *Evaluación físico-química del gel y jugo de la hoja de Sábila (A.barbadensis) en diferentes prácticas de manejo*. En: *Revista Chapingo serie Zonas Áridas*. . Octubre, 2005; Vol. 4, ISSN 0186-3231.
- [31]. DIAZ J, A. y ÁVILA L., M. *Sondeo del mercado mundial de sábila (Aloe vera)*. En: *Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt*. Bogotá D.C., 2002.
- [32]. ESPINOZA A., Elba Carola y SANGINEZ M., Mercedes. *Eficacia del preparado químico a base de Aloe vera en pacientes con flebitis química del hospital Edgardo Rebagliati Martins*. Tesis de Especialización Segunda especialización en enfermería intensivista, Universidad Nacional Mayor de san marcos. Facultad de medicina humana Lima Perú, 2003
- [33]. BOZZI, A.; PERRIN, C.; AUSTIN, S. and ARCE V., F. *Quality and authenticity of commercial Aloe vera gel powders*. En: *Food Chemistry*. 2007; Vol. 103, pp 22-30.
- [34]. IMERY B., J. and CEQUEA R., H. *Cytogenic Evaluation of M1V2 Generation From Experimental Tetraploids In Aloe vera L.* En: *Revista Científica UDO Agrícola*. 2001; Vol. 1, pp 29-31.
- [35]. WILLIAMS, Lonnie; BURDOCK, George; SHIN, Eunju; KIM, Seunghyun; JO, T.H.; JONES, Kenneth and MATULKA, Ray. *Safety studies conducted on a proprietary high-purity aloe vera inner*

leaf fillet preparation Qmatrix. En: *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. June, 2010; Vol. 57, pp 90-98.

[36]. FERRARO, G M. *Revisión de la Aloe vera (Barbadensis Miller) en la dermatología actual*. En: *Revista Argentina Dermatológica*. 2009; Vol. 90, pp 218-223.

[37]. VEGA G., Antonio; MIRANDA, Margarita; ARANDA, Mario; HERNRIQUEZ, Karem; VERGARA, Judih; TABILO M, Gipsy and PEREZ W, Marío. *Effect of high hydrostatic pressure on functional properties and quality characteristics of Aloe vera gel (Aloe barbadensis Miller)*. En: *Food Chemistry* 2011; Vol. 129, pp 1060-1065, ISSN 0308-8146.

[38]. CONTI, Patricia. *El poder curativo del Aloe vera*. Pluma y papel. : Ediciones Goldfinger. Buenos Aires, 2006.

[39]. SAAVEDRA, Oswaldo y E. RONDON, Carlos. *Distribución de metales en el acíbar de hojas de sábila (Aloe vera (L). Burm.f)*. EN: *Avances en Química*. Mérida, 2008. Vol. 3, págs. 49-58.

[40]. TURNER, D.; YATES, K.M. and TIZARD. *Isolation and characterization of structural components of Aloe vera L. leaf pulp*. En: *International Immunopharmacology*. 2004; Vol. 4, pp 1745-1755.

[41]. GARCIA L, Arilia and et al. *Estudio toxicogenético de un polisacárido del gel de Aloe vera L*. En: *Revista cubana Plantas Médicas*. 2001; Vol. 2, pp 52-55.

[42]. TURNER, Carlton E. and et al. *Evaluation and comparison of commercially available Aloe vera L. products using size exclusion chromatography with refractive index and multi-angle laser light scattering detection*. En: *International Immunopharmacology*. 2004; Vol. 4, pp 1727-1737.

[43]. LOCATELLI, M.; TAMMARO, F.; MENGHINI, L.; CARLUCCI, G.; EPIFANO, F. and GENOVESE, S. *Anthraquinone profile and chemical fingerprint of Rhamnus saxatilis L. from Italy*. En: *Phytochemistry Letters*. November 2009; Vol. 2, pp 223-226.

[44]. A, Guliah; H.K., Sharmaa; B.C., Sarkara; D., Upadhyayb and A., Shitandic. *Changes in physico-chemical and functional properties during convective drying of aloe vera (Aloe barbadensis) leaves*. En: *Food and Bioproducts Processing*. October 2009.

[45]. SCHWEIZER, Marc. *Aloe vera la planta que cura*. APB: París France, 1994, ISBN 2-912978-02-5.

[46]. CARRILLO, Mónica y BUENFIL, Nacira. *Aloe vera : Agente Microbiano*. Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatan. Yucatán, 2011.

[47]. RESTREPO F., Jorge Iván. *Conservación de fresa (fragaria x ananassa duch cv. camarosa) mediante la aplicación de revestimientos comestibles de gel mucilaginoso de penca de sábila (aloe barbadensis miller)*. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, 2009.

- [48]. PRATO, Maria del Rosario; ÁVILA, Ramona; DONQUIS, Carmen; MEDINA, Edgar y REYES Rosa. *Antraquinonas en Aloe vera Barbadosensis de zonas semiáridas de Falcón, Venezuela, como inhibidores de la corrosión*. EN: *Multiciencias*. Falcón, 2008, Vol. 8, págs. 148-154.
- [49]. CONTRERAS P., Maria Elizabeth; DOMINGUEZ E., Rosa Maria; GONZÁLES B., Araceli. *Proceso de biotransformación láctica del jugo de Aloe vera*. EN: *Tecnología, ciencia y educación*. Mexico, 2007. Vol. 22, págs. 35-42.
- [50]. ARCE Ronald, MOLINA O. Janet, MORAN Fiorella et al. *Efecto protector del Aloe vera (sábila) en lesiones gástricas inducidas con etanol en ratas*. EN : CIMEL. Lima, 2007. Vol. 12, págs. 71-75. ISSN 1680-8398.
- [51]. RODRÍGUEZ Gonzáles Horacio, ECHEVARRIA Sosa Isabel. *Gel de Aloe vera (L.) N.L. Burm. y harina de sagú como soporte sólido de medio de cultivo para plantas medicinales*. EN: *Revista cubana de plantas medicas*. La Habana Cuba, 2006. Vol. 11.
- [52]. VARGAS Franklin, Díaz Yrene. *Estudios In-vitro de los mecanismos fotooxidantes y antioxidantes de los principios activos del Aloe vera*. EN : *Revista de la Facultad de Farmacia. Laboratorio de Fotoquímica, Centro de Química, Caracas Venezuela*. 2003. Vol. 45.
- [53]. RIVERO Martinez Reinaldo, RODRÍGUEZ Leyes Eduardo Antonio, MENDEZ Catillo Rosa, FERNANDEZ Romero José Abel, Del BARRIO Alonso Gloria, GONZÁLES Sanabria Maria Lidia. *Obtención y caracterización preliminar de un extracto de Aloe vera L. con actividad antiviral*. EN: *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. De la Habana, 2002. Vol. 7, págs. 32-38.
- [54]. VILLALOBOS Octavio José, SALAZAR Carmen Rosa. *Efecto de un enjuague bucal compuesto de Aloe vera en la Placa Bacteriana e Inflamación Gingival*. EN: *Acta Odontológica Venezolana*. Caracas 2001, Vol. 39, págs. 16-24. ISSN 0001-6365.
- [55]. DE LA CRUZ C., José Ángel. *Cultivo alternativo para las zonas áridas y semiáridas de México*. EN: *Comisión Nacional de las Zonas Áridas. Instituto Nacional de Ecología*. México, 1994.
- [56]. PEDROZA S., A. y DURAN B., Santos. *Efecto del acolchado plástico, fertilización nitrogenada y composta orgánica en el crecimiento y desarrollo de sábila Aloe barbadensis miller con riego por goteo automatizado*. EN: *Revista Chapingo Serie Zonas Aridas*. 2005; Vol. 4, pp 1-7.
- [57]. LUGO, Zunilde. *Zábila: Enfermedades y Control*. EN: *Revista de difusión de tecnología agrícola y pesquera del FONAIAP*. 1999, no.63, p.20-21.
- [58]. RUCKER, Robert B.; MORRIS, James and FASCETTI, Andrea J. *Vitamins*. EN: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6a ed.; cap 23, 2008; pp 695-730.
- [59]. DAVEY, M. W.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; SANMARTÍN, M.; KANELIS, A. and SMIRNOFF, N. *Plant L-ascorbic: Chemistry, function, metabolism, bioavailable and effects of*

processing. En: *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000; Vol. 80, pp 825-860, ISSN 0022-5142.

[60]. SERRA, Horacio Marcelo and CAFARO, Thamara Analía. *Ácido ascórbico: desde la química hasta su crucial función protectora en ojo*. En: *Acta bioquímica clínica latinoamericana*. [on line]. la Plata, 2007; Vol. 41, ISSN 1851-6114.

[61]. NOVÁKOVÁ, L.; SOLICH, P. and SOLICHOVÁ, D. *HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids*. En: *Trends in Analytical Chemistry*. 2008; Vol. 27, pp 942-958, ISSN 0165-9936.

[62]. MIRANDA, Margarita; MAUREIRA, Héctor; RODRIGUEZ, Katia and VEGA G., Antonio. *Influence of temperature on the drying kinetics, physicochemical properties, and antioxidant capacity of Aloe Vera (Aloe Barbadensis Miller) gel*. En: *Journal of Food Engineering* 2009; Vol. 91.

[63]. NADINIC, Jelena; VINSON, J. A.; AL KHARRAT, H. and ANDREOLI, L. *Effect of Aloe vera preparations on the human bioavailability of vitamins C and E*. En: *Phytomedicine*. 2005; Vol. 12, pp 760-765.

[64]. SHAMAAN, Nor Aripin; KADIR, Khalid Abdul; RAHMAT, Asmah and WAN N., Wan Zurinah. *Vitamin C and Aloe Vera Supplementation Protects From Chemical Hepatocarcinogenesis in the Rat*. En: *Nutrition*. 1998; Vol. 14, pp 846-852, ISSN 0899-9007.

[65]. LEDEZMA G, Marisol. Validación del método: *Determinación de vitamina C total por cromatografía líquida de alta resolución HPLC*. En: *Tecnología en marcha*. 2004; Vol. 17-4, ISSN 0379-3982.

[66]. QUATTROCCHI, Oscar; de ANDRIZZI, Sara; LABA Raúl. *Introducción a la HPLC*. Buenos Aires, 1992.

[67] *Tema 4 Cromatografía líquida de alta resolución*. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Alicante . pdf. [on line]

[68] AGUIRRE Ortega, L., et al., *Validación de métodos analíticos*, ed. A.E.F. Industria. España, 2001

[69] MILLER, James N. and MILLER, Jane C. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. 4a. ed.; PEARSON EDUCACION, S.A.: Madrid, 2002, ISBN-84-205-3514-1.

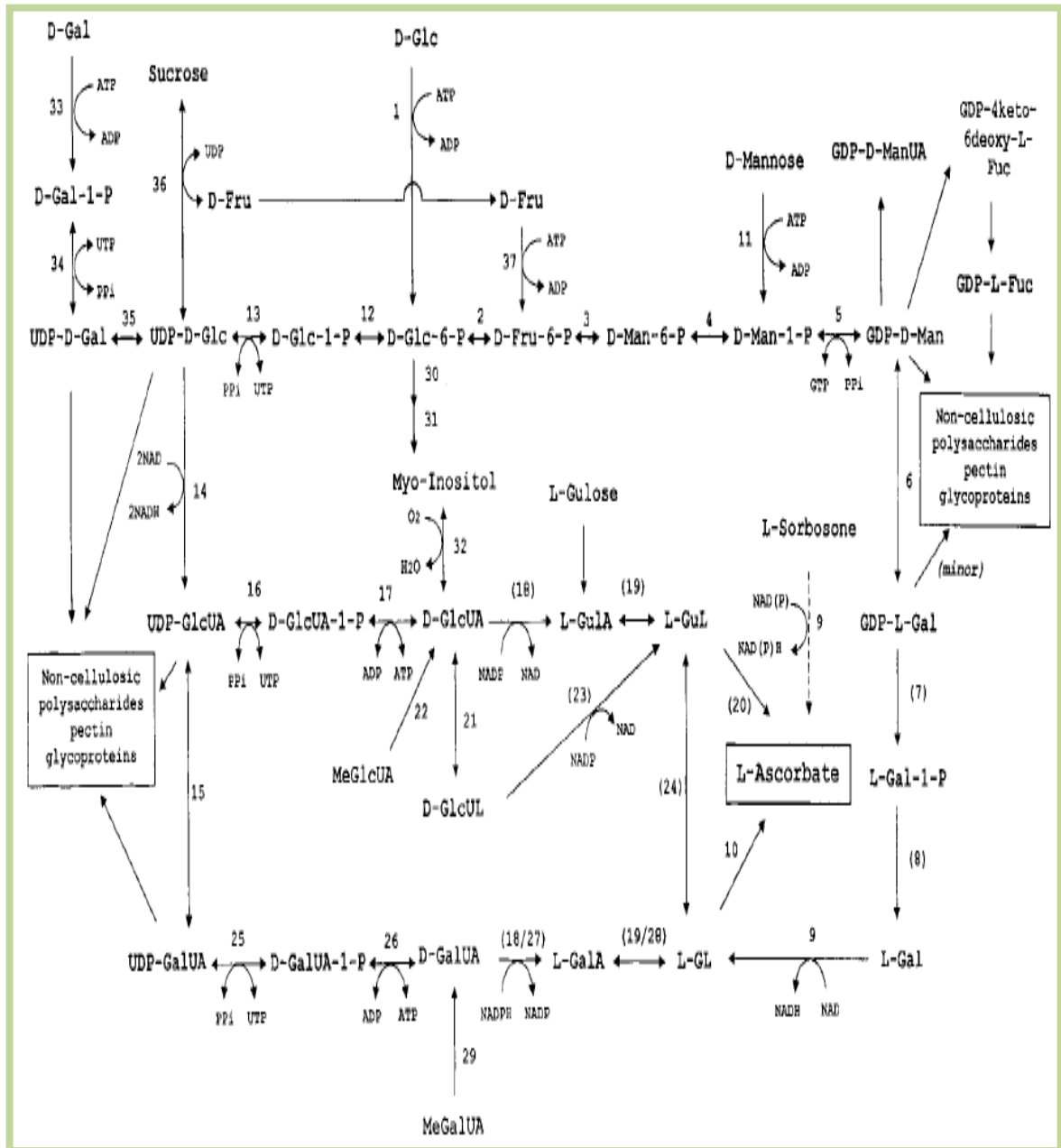
[70] ASSUNÇÃO, Raquel B. and MERCADANTE, Adriana Z. *Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (Anacardium occidentale L.): variety and geographic effects*. En: *Food Chemistry*. 2003; Vol. 81, pp 495-502, ISSN 0308-8146.

[71] LEE, Seung K. and KADER, Adel A. *Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops*. En: *Postharvest Biology and Technology*. 2000; Vol. 20, pp 207-220, ISSN 0925-5214.

- [72] FATEMEH Nejat-zadeh-Doarandozi, MOHAMMAD Reza Naghan, SATTAR Tahmasebi Enferadi, AMIR Mousari, YOUNES Mostofi, MOHAMMAD Esmail Hassani. *Genetic diversity of accessions of Iranian Aloe vera based on horticultural traits and RAPD markers*. EN: *Industrial crops and products*. 2012. Vol 7. pp347-351.
- [73] C O'BRIEN, Chantal. *Physical and chemical characteristics of Aloe ferox leaf gel*. University of Johannesburg. South Africa 2008.
- [74] CHOI, Seongwon and CHUNG, Myung-Hee. *Review on the relationship between Aloe vera components and their biologic effects*. En: *Seminars in Integrative Medicine*. march 2003; Vol. 1, pp 53-62.
- [75] Y. Saks, N. Ish-shalom-Gordon. *A potential crop for cultivation under conditions of low-temperature winter and basalt soils*. EN: *Industrial crops and products*. 1995. Vol4. pp 85- 90.
- [76] GJESRTAD, G. *Chemical studies of Aloe vera juice*. En: *Advancing Frontiers of Plant Sciences*. 1971; Vol. 28.
- [77] ROMERO B., Fernando. *Estabilidad de vitaminas, vida comercial y bioaccesibilidad de folatos-hierro en fórmulas infantiles de continuación y crecimiento*. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Murcia, Murcia, 2008.
- [78] PÉREZ-Álvarez, J., AQUINO-Triana, S., FLORES-Espinoza, A., RAMÍREZ-Baca, P., CANDELAS-Cadillo, M. G., AGUILERA-Ortiz, M., CHEW, M. R. G. *Descripción de la calidad fisicoquímica, microbiológica y nutrimental de jugo de sábila Aloe vera (barbadensis M)*. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango. Av. Artículo 123 s/n, Fraccionamiento Filadelfia, Gómez Palacio, Dgo.pramirez@ujed.mx

## ANEXOS.

**Anexo 1. Interrelaciones entre las vías posibles de biosíntesis de L-AA en las plantas y el metabolismo central de hexosa de fosfato (22).**



## Anexo 2. Materiales y equipos.

Los equipos y materiales requeridos para el proceso de extracción fueron:

- Balanza analítica OHAUS® máx. capacidad 210g (0001g);
- pH-Metro Accumet® Basic AB15 FischerScientific;
- Agitador magnético;
- Centrífuga Thermofischer scientific máx. velocidad 14600 r.p.m, máx. densidad del material de relleno 1.2Kg/dm<sup>3</sup>;
- Ultrasonido Branson 3510DTH y otro modelo P250TH;
- Material de vidrio;
- Sistema de filtración a vacío compuesto por:
  - Bomba de vacío
  - Erlenmeyer de 1L
  - Porta filtros con pinza
  - Membrana ANODISC 47 (0.2µm 47mm Whatman®)
- Filtros desechables 25mm GD/X 0.45µm (Millipore);
- Jeringas desechables de 5mL;
- Viales de 2mL con tapón de rosca;

Las soluciones patrón de AA se prepararon con: estándar L- ácido ascórbico 99,9% (SIGMA grado HPLC; exp. Mayo 2012; R36-37, S26); con agua-ácido sulfúrico pH 2,7.

Los reactivos empleados para el desarrollo experimental fueron grado analítico:

- Agua destilada y agua desionizada filtrada y desgasificada.
- Ácido sulfúrico 95 - 97% (Fisher),
- Ácido ortofosfórico 85% (Merck),
- Fosfato monobásico de potasio KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck).
- Ácido ortofosfórico 1%. Tomar 5,9mL de ácido ortofosfórico 85% y diluir en un matraz de 500mL.
- Agua (H<sub>2</sub>O)- ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pH 2.7.
- Fase móvil:
  - I. Tampón fosfato 50mM; pesar 3,4 g de Fosfato monobásico de potasio KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, disolver en agua destilada, ajustar el pH a 2,5 con ácido o- fosfórico 1% y llevar a 1L con agua. Filtrar a vacío con filtros de 0.45 µm.
  - II. Solución agua (5% H<sub>2</sub>O) – ácido sulfúrico (95% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pH 2,7.

### Anexo 3. Cálculos.

#### Preparación de la curva de calibración

	Preparación	Concentración (mg/L)
M	Pesar 10mg de AA y aforar a 10mL con disolución extractora de trabajo	1000
A	Diluir M: 20µL en 10mL	2
B	Diluir A: 5mL en 10mL	1
C	Diluir B: 5mL en 10mL	0,5
D	Diluir C: 5mL en 10mL	0,25
E	Diluir D: 5mL en 10mL	0,125

#### Estimación del contenido de AA/ Kg hoja en base húmeda

Datos:  $Vol_{aforo} = 0,1 L$ ;  $Masa_{HOJA} = 16,1 g$ .

$$0,6858 \frac{mg}{L} * 0,1L * \frac{1}{0,0161Kg} = 4,259 \frac{mg}{Kg}$$

#### Limite de detección (LD)

Datos:

Se uso la ecuación 1 y 3, con los valores de  $y_B (=a)$  y  $s_B (=s_{y/x})$   
 $a = -46011$ ;  $s_{y/x} = 25865,611$ ;  $b = 844080,774$

Reemplazando en ecuación (3)  $y = -46011,0 + 3 * 25865,611$   
 $y = 31585,833$ .

Despejando y reemplazando ecuación (1)  $x = \frac{y-a}{b}$

LD = 0,092 mg/L

#### Porcentaje de Recuperación

Datos:

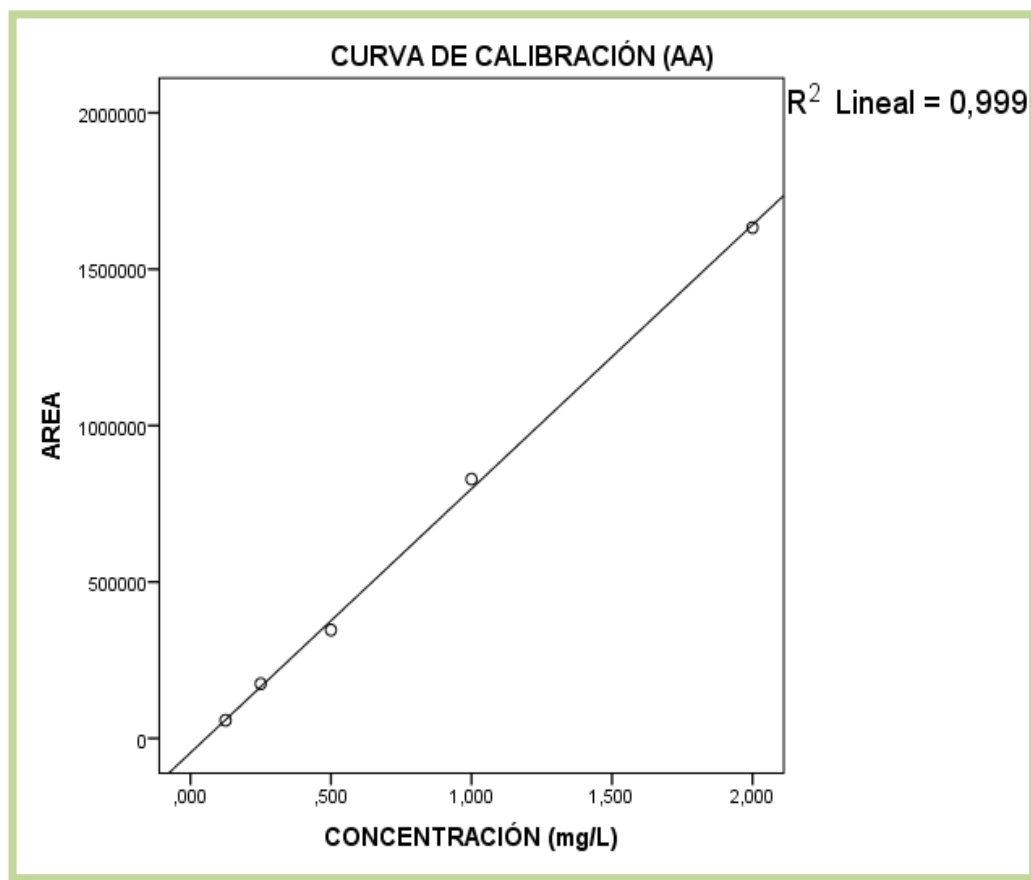
$m = 0,653 \frac{mgAA}{L} * 0,1L = 0,0653mgAA$ ; donde,  $Vol_{aforo} = 0,1 L$ ; Este cálculo se aplica a todas las concentraciones halladas.

Fortificación:  $2 \frac{mgAA}{L} * 0,05L = 0,1mgAA$ ;

Reemplazando en la ecuación 4:

$$R = \frac{0,18490mgAA - 0,0653mgAA}{0,1mgAA} * 100 = 119,58 \%$$

**Anexo 4. Promedio curvas de calibración del ácido ascórbico por CLAE.**



$$y = -46011 + 844080,774x$$

**Anexo 5. Datos del análisis del mucílago y fertilidad de los suelos de las zonas de estudio (tesis 2011).**

**Resultados unificados de los análisis al mucilago de *Aloe vera* procedentes de las zonas estudiadas.**

ANALISIS	BELEN	FLORIDA	MARSELLA	MISTRATO	SANTUARIO
pH	-	5,2	6,37	5,20	6,06
% Cenizas	-	0,039	0,10	0,26	0,10
% Humedad	-	99,061	98,94	99,13	98,79
% N	-	0,010	0,022	0,0007	0,021

**Resultados unificados de los análisis de fertilidad de los suelos de las fincas estudiadas.**

PARAMETRO	BELEN	FLORIDA	MARSELLA	MISTRATO	SANTUARIO	
%M.O	16	15,6	6,16	7,9	23	
%N	0,6	0,6	0,23	0,3	0,7	
pH	5,4	4,9	5,7	5,5	5,2	
meq/100g	K	0,48	0,19	0,17	0,39	0,41
	Ca	1,1	4,1	1,9	13	5,1
	Mg	0,5	0,8	0,6	3	1,7
	Al	-	0,9	0,4	-	0,4
(ppm)	P	2	16	1	2	2
	Fe	-	126	147	283	173
	Mn	-	22	10,3	43	29
	Zn	-	13	2,3	5,5	7
	Cu	-	12	6,3	7,5	3,5
	B	-	0,24	0,07	0,21	0,048
	S	-	46	34,3	28	17