

VCH-FC
Biotec.
S.165
C.1



ESCUELA DE PREGRADO - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE

**“Caracterización de Fructanos en hojas de *Aloe barbadensis* Miller
sometidos a estrés hídrico”**

Seminario de Título Entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Carlos Alberto Salinas Moreira

Directora de Seminario de Título: Dra. Liliana Cardemil Oliva

Co-Director de Seminario de Título: Dr. Michael Handford

Julio de 2012

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título presentado por el **Sr. Carlos Alberto Salinas Moreira**

“Caracterización de Fructanos en hojas de *Aloe barbadensis* Miller sometidos a estrés hídrico”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dra. Liliana Cardemil Oliva
Directora Seminario de Título

Dr. Michael Handford
Co-Director Seminario de Título

Comisión Revisora y Evaluadora:

Dra. Ana Preller Simmons
Presidente Comisión

Dr. Claudio Pastenes Villarreal
Evaluador

Santiago de Chile, Julio de 2012

BIOGRAFÍA



Bueno, primero que nada habría que partir por mencionar que llegué a este mundo loco el día 18 de abril de 1984 en el University of Tennessee Medical Center en la ciudad de Knoxville en el estado sureño de Tennessee de los Estados Unidos de América. Debo destacar que no vine solo al mundo, ya que en esta aventura llamada vida me acompañó mi hermana melliza Joanna. A pesar de haber nacido tan lejos de Chile, un par de años después llegaría al país junto con mis padres y mi hermana a Santiago.

Es en estos primeros años en Chile que tengo mis primeros recuerdos de mi infancia junto con primos, tías, tíos y mis abuelitas (Mami Violeta y Mami Fresia). Al tiempo después volveríamos a Knoxville, Tennessee, ya que mi padre fue a hacer su PhD. Durante esa segunda estadía en USA aprendí varias cosas como hablar, escribir e incluso pensar en inglés, pero creo que lo más importante que aprendí allá fue a ser más tolerante y respetar a las personas, independiente de sus diferencias.

Cuando volvimos a Chile por segunda vez, varias cosas habían cambiando, lo más drástico era que había retornado el país a la democracia y había un presidente elegido por la gente. De vuelta terminé mis estudios de básica y media en el Colegio San Leonardo en Maipú, donde hice varios amigos y pasamos buenos momentos, pero también es cuando comenzó mi interés por el mundo de la biología.

Al finalizar el colegio, una carrera relativamente desconocida me llamó la atención y era Ingeniería en Biotecnología Molecular. Cuando postulé inicialmente no quedé, pero como la vida está llena de vueltas entré al Programa de Bachillerato de la Universidad de Chile y luego llegaría a Biotecnología. Creo que mi paso por Bachillerato fue una de las mejores decisiones de mi vida, ya que me abrió el mundo a otras áreas y pude conocer a muchas personas, algunas de las cuales sigo siendo amigo hasta el día de hoy.

Ahora que he recibido mi título de Ingeniero en Biotecnología Molecular, siento que un ciclo se ha completado y que el futuro me tiene preparado un nuevo rumbo por descubrir. Espero poder portar con un granito más de conocimiento al mundo de las ciencias con mi trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera partir por agradecer a mis padres Renato y Roxana, que me trajeron al mundo y me brindaron mucho cariño y amor tanto a mí como a mi hermana. Gracias por su apoyo y paciencia en este proceso tan importante para mí. También quisiera agradecer a mi hermana Joanna que me alentó siempre a continuar por este rumbo de las ciencias y por sus infinitas dudas sobre diversos temas científicos y no tan científicos.

También debo agradecer a mi familia que siempre me alentó a pesar de que hasta el día de hoy varios no tienen claro lo estudié y mucho menos como se llama la carrera. En particular, quisiera mencionar a la Mami Fresia y mi tía Chechy que en varias ocasiones me acogieron en su casa cuando me quedaba tarde en el laboratorio trabajando. A mi tía Chechy en particular por las largas y entretenidas conversaciones hasta temprano en la madrugada.

A la Dra. Liliana Cardemil que me aceptó en el laboratorio y que me enseñó a formar un pensamiento más crítico y objetivo. También por su paciencia y dedicación conmigo por sacar adelante mi trabajo.

A las personas que conforman el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, desde los profesores - Mike, Claudia y Lorena – por su apoyo y críticas constructivas. A los diversos compañeros de laboratorio del pasado y del presente que siempre han conformado una gran familia y creado un agradable ambiente de trabajo. A Sebastián por su trabajo fundamental y necesario en el lab. A Angélica que desde un comienzo me enseñó el correcto funcionamiento de un laboratorio y su vital apoyo. Al grupo LCO: Isabel, Claudia, Dario y Matías, que siempre fueron un gran apoyo y con los cuales pasamos penas y alegría.

Finalmente quisiera mencionar a las muchas personas que conocí y han sido importantes en mi vida universitaria como: Felipe H., Oriana, Inelia, Cecilia, Giss, Paola, Salvador, Mauricio, Yu, Ivonne, Francisca, Diego, Fefi, Nelly, Nico, Matu, Alejandra, Lorena, Caro, Cristóbal, Nicolás R., Vicho, Jorge, Marito, Pato Estrella, Pablo y varios más.

*Se lo dedico a mi familia y en especial a mis padres por su apoyo incondicional y
paciencia.*

También se lo dedico a mi hermana Joanna.

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS	2
INDICE DE TABLAS	5
INDICE DE FIGURAS	6
ABREVIACIONES	8
RESUMEN	9
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. Plantas CAM.....	15
1.2. Fructanos.....	17
1.3. Estructura y síntesis de fructanos.....	18
1.5. Aloe vera.....	26
1.6. Hipótesis.	29
1.7. Objetivo General.....	29
1.8. Objetivos Específicos.....	29
2. MATERIALES Y MÉTODOS	30
2.1. Condiciones de crecimiento y de inducción del estrés hídrico.	30
2.2. Material Vegetal.....	30
2.3. Extracción de Carbohidratos.....	31
2.3.1. Extracción de Azúcares Totales.	31
2.3.2. Extracción de Azúcares Solubles.	31
2.3.3. Extracción de Fructanos.	32
2.3.3.1. Extracción de Oligofructanos.	32
2.3.3.2. Extracción de Polifructanos.....	32

2.4. Cuantificación de los carbohidratos por Espectrofotometría.....	33
2.4.1. Cuantificación de Azúcares Totales y Solubles.....	33
2.4.2. Cuantificación de Fructanos.....	34
2.5. Purificación de Fructanos.....	35
2.6. Cromatografía de Capa Fina (TLC) de Fructanos.....	36
2.7. Análisis de fructanos por Cromatografía de Gases acoplado con Espectrometría de Masa (GC-MS).....	37
2.7.1. Cuantificación de fructanos por análisis de alditol acetatos mediante GC-MS. ..	38
2.7.1.1. Hidrólisis Ácida.....	39
2.7.1.2. Reducción de Azúcares hasta Alditoles.	39
2.7.1.4. Extracción de Alditoles Acetilados.	41
2.7.2. Análisis de los enlaces glicosídicos de fructanos.....	41
2.7.2.1. Metilación de los Polisacáridos.....	43
2.7.2.2. Limpieza y secado de polisacáridos.	44
2.7.2.3. Reducción hasta alditoles.	44
2.7.2.4. Extracción de Alditoles Acetilados per-O-metilados.	44
2.7.2.5. Determinación del GP de los Fructanos por GC-MS.	44
2.8. Análisis de Datos.	45
3. RESULTADOS	46
3.1 Cuantificación de Azúcares Totales.....	46
3.2. Cuantificación de Azúcares Solubles.....	48
3.3. Cuantificación de Fructanos.....	49
3.3.1. Cuantificación de Oligofructanos.....	50
3.3.2. Cuantificación de Polifructanos	51
3.4 Purificación de Fructanos.....	53

3.5. Análisis Cualitativo de la composición de Fructanos por TLC.	54
3.5.1. TLC de Oligofructanos de Puntas.	54
3.5.2. TLC de Oligofructanos de Bases.	56
3.5.3. Estimación de la cantidad de Oligofructanos por análisis de la placa cromatográfica de TLC.	57
3.5.4. TLC de Polifructanos de Puntas.	57
3.5.5. TLC de Polifructanos de Bases.	58
3.5.6. Estimación de la cantidad de Polifructanos por análisis de la placa cromatográfica de TLC.	59
3.6. Análisis de los Alditol Acetatos derivados de los Fructanos.	60
3.6.1. Análisis por GC-MS de los Alditol Acetatos derivados de los Oligofructanos. ..	60
3.6.2. Análisis por GC-MS de los Alditol Acetatos derivados de los Polifructanos.	63
3.7. Determinación de los enlaces glicosídicos de fructanos mediante el análisis de los PMAA por GC-MS.	65
3.7.1. Enlaces glicosídicos de los Oligofructanos.	65
3.7.2. Enlaces glicosídicos de los Polifructanos.	71
4. DISCUSIÓN	76
4.1. Azúcares totales y solubles.	79
4.2. Fructanos.	82
4.3. Proyecciones.	93
5. CONCLUSIONES	94
6. BIBLIOGRAFÍA	96

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cuantificación de Oligofruktanos de puntas y bases de hojas de Aloe vera sometidas distintos tratamientos hídricos a partir de la placa cromatográfica (TLC).....	57
Tabla 2: Cuantificación de Polifruktanos de puntas y bases de hojas de Aloe vera sometidas distintos tratamientos hídricos a partir de la placa cromatográfica (TLC).....	60
Tabla 3: Composición y cuantificación de Oligofruktanos purificados de hojas de Aloe vera sometidos a distintas condiciones hídricas.....	63
Tabla 4: Composición y cuantificación de Polifruktanos purificados de hojas de Aloe vera sometidos a distintas condiciones hídricas.....	64
Tabla 5: Identificación de Alditol Acetatos parcialmente metilados derivatizados de Fruktanos provenientes de hojas de plantas de <i>Aloe barbadensis</i> Miller.....	66
Tabla 6: Composición de los enlaces glicosídicos (% molar) de Oligofruktanos presentes en las puntas y bases de hojas de Aloe vera tratados con diferentes riegos.....	69
Tabla 7: Proporciones entre distintos tipos de enlaces y GP de Oligofruktanos de puntas y bases de hojas de Aloe vera de distintos tratamientos hídricos.	70
Tabla 8: Composición de los enlaces glicosídicos (% molar) de Polifruktanos de hojas de plantas de Aloe vera tratadas con diferentes riegos.	74
Tabla 9: Proporciones entre distintos tipos de enlaces y GP de Polifruktanos de puntas y bases de hojas de Aloe vera de distintos tratamientos hídricos.	75

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de la estructura de los distintos tipos de fructanos en plantas.....	21
Figura 2: Esquema de la biosíntesis de los fructanos en plantas.	25
Figura 3: Esquema del tautomerismo ceto-enólico de la fructosa en soluciones alcalina.	40
Figura 4: Esquema resumido del proceso de síntesis de los alditol acetatos parcialmente metilados (PMAA).....	42
Figura 5: Efecto del tratamiento hídrico en las cantidades de Azúcares Totales en las hojas de Aloe vera.....	46
Figura 6: Cantidad de Azúcares Totales de puntas y bases de hojas de Aloe vera en diferentes tratamientos hídricos.	47
Figura 7: Efecto del tratamiento hídrico en las cantidades de Azúcares Solubles en las hojas de Aloe vera.....	48
Figura 8: Cantidad de Azúcares Solubles de puntas y bases de hojas de Aloe vera sometidos a diferentes tratamientos hídricos.	49
Figura 9: Cuantificación de Oligofructanos en hojas de Aloe vera sometidas a diferentes tratamientos hídricos.....	50
Figura 10: Cantidades de Oligofructanos de puntas y bases de hojas de Aloe vera sometidos a diferentes tratamientos hídricos.	51
Figura 11: Cantidades de Polifructanos en hojas de Aloe vera sometidas a diferentes tratamientos hídricos.....	52
Figura 12: Cantidades de Polifructanos de puntas y bases de hojas de Aloe vera sometidos a diferentes tratamientos hídricos.	53
Figura 13: Perfil de elución de los extractos de Polifructanos de plantas sometidas a distintos tratamientos hídricos.....	54
Figura 14: TLC de Oligofructanos de las puntas de hojas de Aloe vera sometidos a distintos tratamientos de riego.	55

Figura 15: TLC de Oligofruktanos de las bases de hojas de Aloe vera sometidos a distintos tratamientos de riego..	56
Figura 16: TLC de Polifruktanos de las puntas de hojas de Aloe vera sometidos a distintos tratamientos de riego.	58
Figura 17: TLC de Polifruktanos de las bases de hojas de Aloe vera sometidos a distintos tratamientos de riego..	59
Figura 18: Análisis de cromatografía de gases de los Oligofruktanos purificados de puntas y bases de hojas de Aloe vera, derivatizados a alditol acetatos.	62
Figura 19: Perfil cromatográfico de los alditol acetatos parcialmente metilados (PMAA) de los Oligofruktanos de puntas de hojas de plantas de Aloe vera sometidos a distintas condiciones de riego.....	67
Figura 20: Perfil cromatográfico de los alditol acetatos parcialmente metilados (PMAA) de los Oligofruktanos de las bases de hojas de plantas de Aloe vera sometidas a distintas condiciones de riego.....	68
Figura 21: Perfil cromatográfico de los alditol acetatos parcialmente metilados (PMAA) de los Polifruktanos de las puntas de hojas de plantas de Aloe vera sometidos de distintas condiciones de riego.....	72
Figura 22: Perfil cromatográfico de los alditoles acetatos parcialmente metilados (PMAA) de los Polifruktanos de las bases de hojas de plantas de Aloe vera sometidas a distintas condiciones de riego.	73

ABREVIACIONES

- 1 - FFT** : fructano: fructano 1-fructosiltransferasa
- 1 - SST** : sacarosa: sacarosa 1-fructosiltransferasa
- 6 - SFT** : sacarosa: fructano 6-fructosiltransferasa
- 6G - FFT** : fructano: fructano 6G-fructosiltransferasa
- ANOVA** : Análisis de Varianza
- AO** : Ajuste Osmótico
- CAM** : Metabolismo del Ácido Crasuláseo
- CC** : Capacidad de Campo
- DMSO** : Dimetilsulfóxido
- DP** : Degree of Polimerization
- GP** : Grado de Polimerización
- GC** : Cromatografía de gases (del inglés Gas Cromatography)
- MS** : Espectrometría de Masa (del inglés Mass Spectrometry)
- PMAA** : Alditol Acetilados Parcialmente Metilados (del inglés Partially Methylated
Alditol Acetates)
- TLC** : Cromatografía de capa fina (del inglés Thin Layer Chromatography)

RESUMEN

Los desiertos como los que se encuentran en el norte de Chile son ambientes áridos y de gran fluctuación térmica entre el día y la noche. Las plantas que se encuentran en estos ambientes han desarrollado mecanismos de tolerancia a estas condiciones estresantes. Una planta que está fisiológicamente adaptada a estas condiciones es *Aloe barbadensis* Miller (Aloe vera), al contar con un metabolismo de tipo CAM y hojas suculentas, que le otorgan a esta planta una gran tolerancia a la escasez de agua. Debido a las propiedades farmacéuticas, alimenticias y cosmetológicas de las hojas de Aloe vera y el gel almacenado en las hojas, la planta tiene una gran importancia económica. Por estas razones la especie fue introducida en Chile como un potencial cultivo rentable. Sin embargo, el manejo agronómico hasta ahora no ha sido el adecuado, posiblemente a causa de que no se han realizado los estudios fisiológicos ni de análisis moleculares en esta planta en condiciones de diferentes regímenes de riego.

En el presente trabajo se estudiaron las respuestas fisiológicas y moleculares de Aloe vera a las condiciones de diferentes restricciones hídricas, desde un régimen de riego de 100% CC hasta el más severo de solo 25% de CC. En el seminario de título se cuantificaron los niveles de carbohidratos: azúcares totales, azúcares solubles y de los polisacáridos fructanos, en las hojas de las plantas.

Los fructanos son polímeros de fructosa que se construyen a partir de sacarosa y por lo tanto, tienen una glucosa terminal. Constituyen un tipo de carbohidrato de reserva hidrosoluble en el 15% de plantas angiospermas. Además de ser reserva de azúcar, poseen el importante rol fisiológico de ser moléculas protectoras para la planta cuando

hay un estrés abiótico, específicamente frente sequía y/o bajas temperaturas, permitiendo que la planta haga un adecuado ajuste osmótico en estas condiciones.

Los azúcares totales, azúcares solubles y fructanos (oligo y polifruktanos) fueron extraídos desde plantas sometidas a cuatro tratamientos de riego: T1, T2, T3 y T4 (1600, 1200, 800 y 400 mL/planta/15 días, respectivamente). De esta manera se analizaron las respuestas de síntesis de azúcares de Aloe vera al déficit hídrico. Los resultados obtenidos por espectrofotometría a partir de ensayos colorimétricos con Antrona indicaron un incremento significativo en las cantidades de azúcares totales, solubles, oligo y polifruktanos en plantas en condiciones T4, el tratamiento de restricción hídrica más severo, con respecto a la condición control T1, tanto en la puntas como en las bases de las hojas. Además se encontró que las cantidades de carbohidratos en las bases eran mayores que en las puntas de las hojas en los cuatro tratamientos.

Análisis por TLC de los extractos de fructanos purificados por cromatografía de intercambio iónico indicaron una mayor cantidad de fructanos y de un mayor grado de polimerización (GP) en las muestras obtenidas de plantas de los tratamientos T3 y T4, tanto en los oligofruktanos como en los polifruktanos provenientes de las puntas y de las bases de las hojas.

La composición de los enlaces glicosídicos de los fructanos de Aloe vera analizados mediante cromatografía de gases y espectrometría de masa (GC-MS) indicó un incremento gradual de los enlaces 1-fructosa, 6-fructosa, 6-glucosa y 1,6-fructosa ramificada desde T1 a T4, tanto en las puntas como en las bases de las hojas. Los resultados de enlaces glicosídicos permiten concluir que existe una diferencia estructural entre los fructanos presentes en las hojas de plantas T4 respecto a las plantas T1. De

manera que en la condición de mayor déficit hídrico los fructanos encontrados en hojas de plantas de Aloe vera presentan una estructura más ramificada y de un mayor GP, es decir pasando de una estructura tipo inulina en T1 a una tipo neo-fructano en T4.

Los resultados obtenidos en este seminario de título permiten concluir que las plantas de Aloe vera incrementan los niveles de carbohidratos presentes en sus hojas, particularmente los niveles de los fructanos, lo que indica que la planta realiza un eficiente ajuste osmótico (AO) cuando el agua disponible disminuye. Este eficiente AO que realiza la planta, le permite tolerar la falta de agua en las condiciones de aridez y semiaridez. Con los resultados encontrados en este trabajo se podrá aportar a la agricultura para establecer cultivos de Aloe vera en el norte de Chile y recomendar condiciones de riego en las cuales se favorezca la presencia y cantidad de fructanos en las hojas que pueden tener un rentable valor comercial como moléculas prebióticas.

ABSTRACT

Deserts such as those found in northern Chile are extremely arid with high temperature fluctuations between day and night. The plants found in these environments have evolved tolerance mechanisms to these stressful conditions. A plant which is physiologically adapted to these conditions is *Aloe barbadensis* Miller (Aloe vera). The plant has a CAM metabolism and succulent leaves, which give it a great tolerance to water restrictions. Due to the pharmaceutical, nutritional and cosmetic properties of the gel that is stored in its leaves, Aloe vera has a great economic importance. This is why it has been introduced in the north of the country as a potentially economically viable crop. However its agronomic management is not the most adequate because physiological studies and molecular analysis have not been performed for Aloe vera subjected to different irrigation treatments.

In this work we studied the physiological and molecular responses of Aloe vera under different water restriction conditions, from an irrigation regime of 100% Field Capacity to the most severe water deficit of 25% Field Capacity. The carbohydrate levels were quantified in Aloe vera: total sugars, soluble sugars and fructans from the leaves of the plants.

Fructans are polymers of fructose that are built from a sucrose molecule and therefore have a terminal glucose. They are a type of reserve water soluble carbohydrate present in 15% of the angiosperm plants. In addition of being sugar reserves, these polysaccharides have important physiological roles as protector molecules for the plant when there is abiotic stress, specifically when there is a stress caused by drought and/or low temperatures, allowing the plant to osmotically adjust in these conditions.

Total sugars, soluble sugars and fructans (oligo and polyfructans) were extracted from plants subjected to four irrigation treatments: T1, T2, T3 and T4 (1600, 1200, 800 and 400 mL/plant/15 days, respectively). Thus, the amounts of sugars synthesized were determined in Aloe vera plants subjected to increasing water deficit. The results obtained by spectrophotometry from colorimetric assays with Anthrone indicated a significant increase in the amounts of total sugars, soluble sugars and oligo and polyfructans in T4 plants, which was the most severe water restriction condition, compared to the control condition T1 plants, both in leaf tips and leaf bases. It was also found that the amounts of these carbohydrates were greater in the leaf bases than in the leaf tips in the four treatments.

TLC analysis of fructans purified by ion exchange chromatography indicated a greater amount of fructans and with a higher degree of polymerization (DP) in the leaf samples obtained from plants of treatments T3 and T4, in both leaf tips and leaf bases for oligo and polyfrutans.

The glycosidic linkage composition of Aloe vera fructans analyzed by gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS) indicated a gradual increase in the presence of 1-fructose, 6-fructose, 6-glucose and branched 1,6-fructose glycosidic linkages with the increase in water deficit, from T1 to T4 plants, both at the tips as well in the bases of the leaves. The results of the glycosidic linkage analyses lead to the conclusion that there is a structural difference between the fructans present in the leaves of plants from T1 respect to T4 plants. Therefore, in the most stressful condition for the plant, the leaves of Aloe vera synthesized fructans of a more branched structure and of a

higher DP. The fructans changed from an inulin type fructan molecule in T1 to a neo-fructan type in T4.

The results of this investigation allow us to conclude that Aloe vera plants increased the levels of carbohydrates in their leaves, particularly the levels of fructans, which indicate that the plant makes an efficient osmotic adjustment (OA) when the available water becomes scarce. This efficient OA increases the plant tolerance to live in arid or semiarid conditions. The results of this research may contribute to agriculture by establishing and developing productive crops of Aloe vera in the northern Chile, and suggesting irrigation conditions for the plants that will favor the presence and quantity of fructans in the leaves that may increase the commercial value of plants due to the presence of these prebiotic molecules.



1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos que están constantemente expuestos a variaciones del medioambiente. Esto se debe a que no son capaces de trasladarse de un sitio a otro en búsqueda de condiciones más favorables para su desarrollo. Variaciones en el clima que conlleva a cambios en la temperatura ambiental y en la disponibilidad de agua, son algunos de los factores que influyen diariamente en el desarrollo de las plantas, y que en ciertas ocasiones pueden llegar a ser perjudiciales en su sobrevivencia. Es en los ambientes desérticos y semiáridos donde las fluctuaciones extremas de la temperatura entre el día y la noche, como también la escasa disponibilidad del recurso hídrico lo que produce en el organismo un estrés por falta de agua. Pero pese a lo anterior, existen plantas que pueden sobrevivir en estas condiciones estresantes al desarrollarse en ellas distintos mecanismos de protección y/o de adaptación a las restricciones hídricas y temperaturas extremas que existen en esos ambientes.

1.1. Plantas CAM.

Las plantas tipo CAM (metabolismo ácido de las Crassulaceae) son un grupo de plantas adaptadas a los ambientes áridos y semiáridos. En ellas existe la acumulación de ácidos orgánicos, como el ácido málico, durante la noche. Además estas plantas evitan la pérdida de agua durante la fotosíntesis al abrir sus estomas sólo durante la noche para el intercambio gaseoso, cuando la temperatura ambiental ha descendido. De esta forma, el metabolismo CAM le permite a la planta maximizar la eficiencia en el uso de agua (Denius & Homm 1972, Christopher & Holtum 1996, Cushman 2001, Cushman &

Borland 2002, Delatorre-Herrera y col. 2010). Las plantas de tipo CAM suelen ser también xerófitas, es decir, están especialmente adaptadas a vivir en estos ambientes secos. Las xerófitas presentan ciertas características morfológicas como tener raíces extendidas con una gran cantidad de raíces secundarias superficiales, y tener hojas o tallos suculentos, porque acumulan agua. Entre las plantas que presentan estas adaptaciones, se encuentran algunas liláceas, como el *Aloe barbadensis* Miller.

Otro mecanismo de adaptación a los ambientes extremos (frío, calor y falta de agua), es el eficiente ajuste osmótico que debe tener la planta para compensar la pérdida de agua. Para ello las plantas sintetizan azúcares y otros compuestos, tales como prolina y glicina-betaína que son osmolitos y ayudan a regular la presión osmótica en el interior de la célula vegetal (Yoshida y col. 1997, Tabaei-Aghdai y col. 2003, Chaves & Oliveira 2004, Vinocur & Altman 2005, Seki y col. 2007, Rekart-Cowie y col. 2008). Las plantas CAM se caracterizan por una eficiente síntesis de azúcares y polisacáridos, osmolitos que ayudan a retener el agua en la planta. La succulencia de las plantas CAM se debe a la presencia de polisacáridos que retienen una gran cantidad de agua (Ogburn y Edwards 2010), un ejemplo de ello es el acemanano que se encuentra en la hoja constituyendo un gel. Además existen otros azúcares y polisacáridos que protegen a la planta de temperaturas extremas y falta de agua, manteniendo las propiedades fisicoquímicas de las membranas otorgándoles una óptima fluidez (Crowe y col. 1988, Koster y col. 1994, Tsvetkova y col. 1998).

1.2. Fructanos.

Un tipo de carbohidrato no-estructural que cumple estas funciones de mantener las propiedades fisicoquímicas de la membrana son los fructanos. Recientemente se ha encontrado que estos azúcares son capaces de interactuar con bicapas lipídicas, específicamente insertándose entre los fosfolípidos a nivel de las cabezas polares formando puentes de hidrógeno (del Viso y col. 2009). Los resultados experimentales han demostrado que los fructanos ayudarían a las membranas a mantener sus propiedades fisicoquímicas durante los procesos de desecación (Hincha y col. 2002, Vereyken y col. 2003, Valluru & Van den Ende 2008). Los fructanos son polímeros de fructosa que presentan una molécula de glucosa terminal unida a una o dos moléculas de fructosa. Se ha establecido que este tipo de polisacárido protege a la planta principalmente en condiciones de bajas temperaturas y de estrés hídrico (Pollock & Cairns, 1991, Spollen & Nelson 1994, Puebla y col. 1997, Hare y col. 1998, De Roover y col. 2000, Amiard y col. 2003). Además, ellos son capaces de incrementar la presión osmótica rápidamente en el interior de la célula al hidrolizarse los polisacáridos (polifruktanos) a oligosacáridos (oligofruktanos), teniendo los oligofruktanos una función de osmolitos al ser altamente solubles en agua (Bialeski 1993). Esta acción sería fundamental para proteger la célula vegetal contra la formación de hielo en su interior y contra la pérdida de agua (Jeong & Housley, 1990, Tognetti y col. 1990, Livingston III & Henson 1998, del Viso y col. 2009). El papel fisiológico de los fructanos en estrés hídrico y en frío se ha demostrado en plantas transgénicas que son capaces de sintetizar fructanos. Después de la transgénesis estas plantas son más tolerantes al frío,

congelamiento y sequía (Pilon-Smits y col. 1995, Pilon-Smits y col. 1999, Li y col. 2007, Kawakami y col. 2008). Los fructanos también se consideran como polisacáridos de reserva de la planta. Se han encontrado fructanos en alrededor de 45.000 especies de angiospermas, aproximadamente un 15% de los angiospermas son capaces de sintetizar este tipo de polímero. También se ha visto que la mayoría de las plantas que los sintetizan habitan en regiones donde hay periodos de escasez de agua o mucho frío durante el año (Hendry 1993). Sin embargo, las plantas no son los únicos organismos que sintetizan fructanos. Estos polisacáridos se han encontrado además en hongos y en bacterias (Hendry 1993, Vijn & Smeekens 1999).

1.3. Estructura y síntesis de fructanos.

Los fructanos son polímeros de fructosa que se construyen a partir de una molécula de sacarosa inicial, a la que se le unen moléculas de fructosa a la fructosa y/o a la glucosa de la sacarosa. La longitud o grado de polimerización (GP) de estas cadenas de fructosa que se forman a partir de la sacarosa pueden variar considerablemente dependiendo de la especie de planta y de las condiciones ambientales. Las cadenas con un GP de 3 a 10 son denominados Oligofructanos, mientras que con un GP sobre 10 son llamados Polifructanos. Además, se clasifican según el tipo de enlace glicosídico inicial existente en la primera molécula de fructosa que se une a sacarosa, de manera que se distinguen tres tipos de trisacáridos. Estos trisacáridos de fructanos son: a) 1-cestosa b) 6-cestosa y c) neo-cestosa (Vijn y Smeekens 1999, Van den Ende y col. 2004, Livingston III y col. 2009). La 1-cestosa se caracteriza por la unión de una fructosa a la fructosa de la sacarosa mediante un enlace β -(2 \rightarrow 1). La 6-cestosa se constituye a partir

de la unión de una fructosa al carbono 6 de la fructosa de la sacarosa, constituyéndose el enlace β -(2→6). Finalmente, en la neo-cestosa la fructosa inicial se une al carbono 6 de la glucosa de la sacarosa, por un enlace β -(2→6). En todos ellos la elongación del polímero se hace desde los residuos de fructosa, mediante enlaces de tipo β -(2→1) y/o β -(2→6). De esta forma dependiendo del trisacárido a partir del cual son sintetizados, de las ramificaciones que se agregan a estos trisacáridos y de los enlaces presentes, los polifruktanos se pueden clasificar en: inulina, levanos, graminanos, neo-inulina, neo-levanos y neo-fructanos (Vijn y Smeekens 1999, Van den Ende y col. 2004, Mancilla-Margalli y López 2006, Livingston III y col. 2009). Las inulinas se sintetizan a partir del trisacárido 1-cestosa y el enlace glicosídico entre las unidades de fructosa es β -(2→1), dándole un carácter lineal a la molécula. Presentan un muy bajo grado de ramificación en su estructura y se encuentran en plantas dicotiledóneas. (Van den Ende y col. 2004, Livingston III y col. 2009) En el caso de los levanos, se sintetizan a partir del trisacárido 6-cestosa. Se caracterizan por ser una molécula lineal con enlaces glicosídicos de tipo β -(2→6) entre las fructosas, además tienen un bajo grado de ramificación. Los levanos se encuentran comúnmente en monocotiledóneas. Los graminanos son sintetizados a partir de 1-cestosa y sacarosa que originan un tetrasacárido específico llamado bifurcosa, este tetrasacárido a su vez puede ser elongado mediante enlaces β -(2→1) y β -(2→6) generando una estructura ramificada. Los graminanos se encuentran principalmente en monocotiledóneas, particularmente en gramíneas (pastos y cereales) (Van den Ende y col. 2004, Livingston III y col. 2009). Las neo-inulinas se forman a partir del trisacárido neo-cestosa que es elongado mediante enlaces β -(2→1) entre las fructosas con una estructura lineal. Se encuentran en monocotiledóneas, como los asparagales (ajo, cebolla

y espárrago). Los neo-levanos son formados a partir de la neo-cestosa, que es elongado mediante enlaces β -(2 \rightarrow 6). Este tipo de fructano está presente en monocotiledoneas, tales como poáceas (Van den Ende y col. 2004, Livingston III y col. 2009). Finalmente los neo-fructanos se construyen a partir de la neo-cestosa y la polimerización de la molécula se realiza tanto por enlaces β -(2 \rightarrow 1) como también β -(2 \rightarrow 6), lo que genera una estructura altamente ramificada. Estos se encuentran en monocotiledoneas, ejemplo *Agave tequilana* (Van den Ende y col. 2004, Mancilla-Margalli y López 2006).

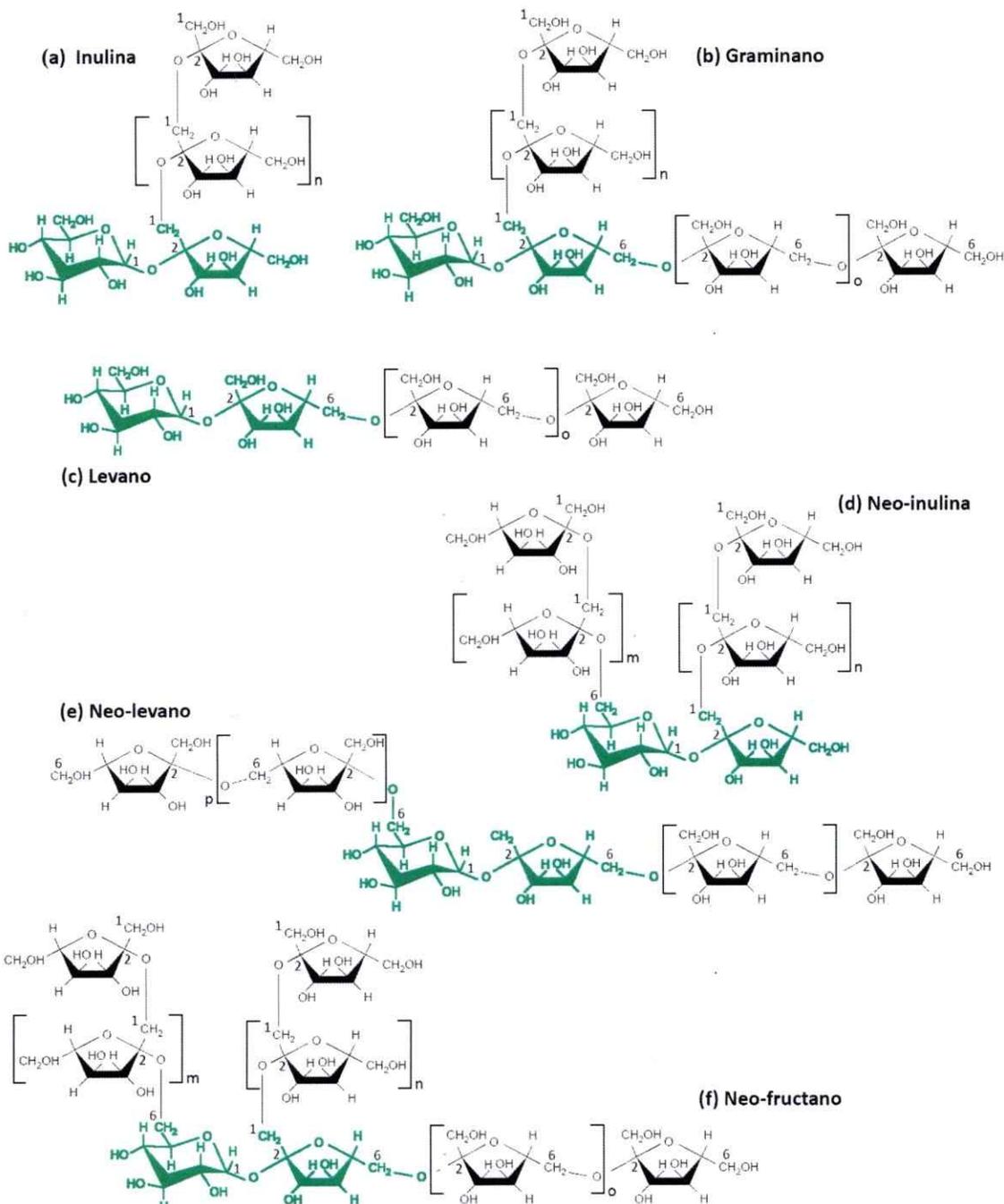


Figura 1: Esquema de la estructura de los distintos tipos de fructanos en plantas. La molécula de sacarosa (dímero de α -D-glucosa+ β -D-fructosa) está en color verde. (a) La Inulina tiene una cadena lineal de fructofuranosilos con enlaces β -(2 \rightarrow 1) unida a la fructosa inicial de la sacarosa. (b) Graminano presenta cadenas de fructofuranosilos con enlaces β -(2 \rightarrow 1) y β -(2 \rightarrow 6) unidos a la fructosa inicial. En sus cadenas puede presentar ramificaciones. (c) Levano presenta a partir de la fructosa de la sacarosa, una cadena lineal de fructofuranosilos con enlaces β -(2 \rightarrow 6). (d) Neo-inulina tiene dos cadenas lineales de fructofuranosilos, ambos con enlaces de tipo β -(2 \rightarrow 1), uno unida a la fructosa inicial y otra cadena unida a la glucosa inicial. (e) Neo-levano tiene dos cadenas de fructofuranosilos formado por enlaces β -(2 \rightarrow 6),

uno a partir de la fructosa de la sacarosa y otra cadena unida a la glucosa inicial. (f) Neo-fructano presenta cadenas de fructofuranosilos con ambos tipos de enlaces, β -(2→1) y β -(2→6), y están unidas tanto a la fructosa como también a la glucosa de la sacarosa. Sus cadenas también pueden presentar ramificaciones. Modificado a partir de Ritsema y Smeekens 2003.

Como se había mencionado anteriormente, la síntesis de los fructanos es a partir de sacarosa a la cual se le van agregando sucesivamente moléculas de fructosa (en forma de fructofuranosilo). La posición y el tipo de enlace mediante el cual se van adicionando nuevas unidades de fructosa van a depender de la actividad catalítica de la enzima responsable. Las enzimas que sintetizan fructanos se denominan fructosiltransferasas. Se han encontrado hasta el momento cuatro fructosiltransferasas distintas en plantas, estas difieren en su actividad enzimática al emplear distintos dadores y aceptores de unidades de fructofuranosil (Ritsema y Smeekens 2003, Van den Ende y col. 2004, Livingston III y col. 2009).

La enzima sacarosa: sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST, EC 2.4.1.99) produce la 1-kestosa y glucosa a partir de dos moléculas de sacarosa, mediante la hidrólisis de una sacarosa y cuyo fructofuranosil liberado es transferido a la fructosa de la otra sacarosa formando un enlace β -(2→1) (Ritsema y Smeekens 2003, Van den Ende y col. 2004, Livingston III y col. 2009).

La elongación del trisacárido 1-kestosa con fructosas a través de enlaces β -(2→1), que originan a la inulina, es catalizado por fructano: fructano 1-fructosiltransferasa (1-FFT, EC 2.4.1.100). La enzima 1-FFT puede usar como dadores de fructosas a la 1-kestosa u oligofructanos de un GP >3; mientras que utiliza como aceptores de los radicales fructofuranosilos liberados a la sacarosa como también a los oligofructanos (Ritsema y Smeekens 2003, Van den Ende y col. 2004, Livingston III y col. 2009).

La enzima sacarosa: fructano 6-fructosiltransferasa (6-SFT, EC 2.4.1.10) sintetiza a la 6-cestosa cuando transfiere un radical fructofuranosilo al C6 de la fructosa de una sacarosa. También puede transferir un radical fructofuranosilo al C6 de la glucosa presente en la 1-cestosa, produciendo de esta forma el tetrasacárido denominado bifurcosa. Como en el caso de las otras transferasas el dador del radical fructofuranosilo puede ser la sacarosa u otro oligo o polifrutano. La actividad de la 6-SFT sobre la 6-cestosa va a producir la polimerización de los levanos. Mientras que la actividad conjunta de la 6-SFT y 1-SST van a originar al grupo de los graminanos (Van den Ende y col. 2004, Livingston III y col. 2009).

La cuarta fructosiltransferasa es la fructano: fructano 6G-fructosiltransferasa (6G-FFT, EC 2.4.1.243), que transfiere un radical fructofuranosilo al C6 de la glucosa de la sacarosa. El dador del radical fructofuranosilo es la 1-cestosa y el receptor es la sacarosa, de esta forma se origina la neo-cestosa. La neo-cestosa puede ser alargada a su vez por la 1-FFT o por la 6-SFT, originando a las neo-inulinas y neo-levanos respectivamente. En el caso de la actividad conjunta de 1-FFT con 6-SFT a partir de la neo-cestosa origina a los neo-fructanos (Vijn I. y col. 1997, Ritsema y Smeekens 2003, Van den Ende y col. 2004).

Los genes de estas cuatro enzimas han sido clonados y secuenciados, siendo el gen para el 6-SFT de cebada (*Hordeum vulgare*) el primero en ser estudiado y posteriormente secuenciado (Sprenger y col. 1995). Luego se clonaron los genes para 1-SST (de Hallaux & Van Cutsem 1997) y 1-FFT (Goblet y col. 1999) en achicoria (*Cichorium intybus*). La clonación del gen para 6G-FFT se realizó a partir de cebolla (*Allium cepa*; Vijn y col. 1997). De esta misma especie también se clonó el gen *I-sst*

(Vijn y col. 1998). Se ha hecho ingeniería metabólica en plantas transgénicas, a las cuales se les han introducido los genes de las fructosiltransferasas de otras especies vegetales. Algunos ejemplos son: la transformación de tabaco (*Nicotiana tabacum*) y achicoria con *6-sft* de cebada (Sprenger y col. 1997); la transformación de betarraga (*Beta vulgaris*; Sévenier y col. 1998) y petunia (*petunia*; van der Meer y col. 1998) con los genes para 1-SST y 1-FFT de *Helianthus tuberosus*. Estos experimentos se realizaron para estudiar los efectos de protección al estrés hídrico y las bajas temperaturas de los fructanos en las plantas, como también para estudiar la función de los genes introducidos y la acumulación de fructanos en especies que de forma endógena no los sintetizan. Las plantas transgénicas demostraron que efectivamente acumulaban fructanos y eran más tolerantes a la falta de agua y a bajas temperaturas (Sprenger y col. 1997, Vijn y col. 1997, van der Meer y col. 1998).

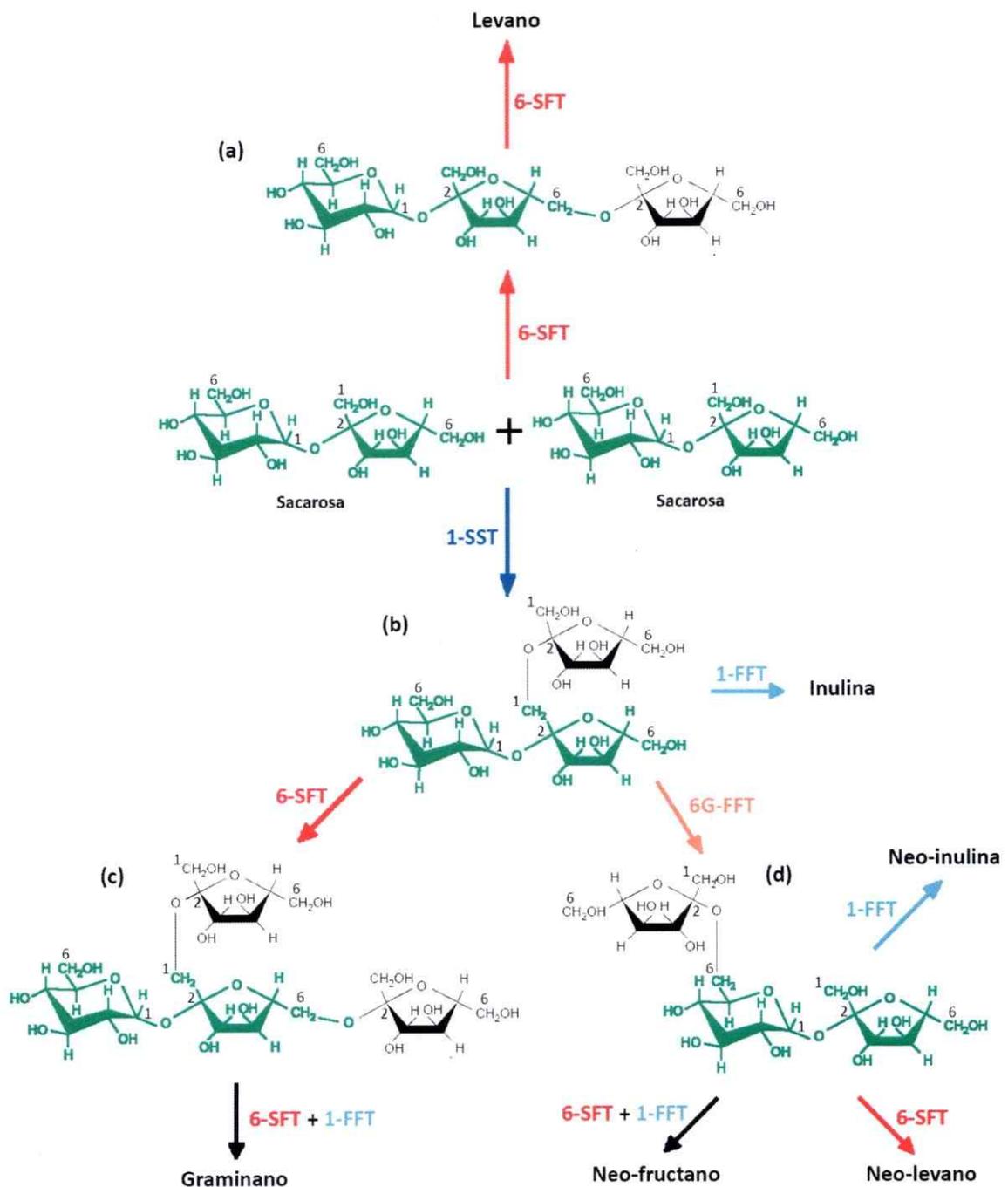


Figura 2: Esquema de la biosíntesis de los fructanos en plantas. En verde se muestra la molécula de sacarosa inicial. (a) El trisacárido 6-cestosa es sintetizado a partir de sacarosa por medio de la enzima 6-SFT. (b) Mientras que el trisacárido 1-cestosa es formado mediante la actividad de la enzima 1-SST, también a partir de moléculas de sacarosa. (c) El tetrasacárido bifurcosa es sintetizado por medio de la acción de 6-SFT usando a 1-cestosa como aceptor de un residuo de fructofuranosilo proveniente de sacarosa. (d) El trisacárido neo-cestosa es sintetizado mediante la actividad de la enzima 6G-FFT que usa también a 1-cestosa, pero en este caso como un dador del grupo fructofuranosilo hacia la glucosa de una sacarosa como aceptor (Ritsema y Smeekens 2003, Van den Ende y col. 2004, Livingston III y col. 2009).

1.4. Beneficios asociados al consumo de fructanos.

Los fructanos no sólo son beneficiosos para las plantas. Se ha demostrado que la ingesta de estos carbohidratos produce resultados favorables en el funcionamiento intestinal de los mamíferos (Flickinger y col. 2003, Verdonk y col. 2005, Urías-Silvas y col. 2008) y particularmente en humanos (Jackson y col. 1999, Kruesel y col. 1999, Taper & Roberfroid 2000, Kilian y col. 2002, Wang 2009). Actúan como prebióticos, es decir, es un ingrediente no digerible de alimentos que estimula de forma selectiva el crecimiento de bacterias beneficiosas en el colon, específicamente a las *Bifidobacterium* (Kruesel y col. 1999, Kilian y col. 2002, Roberfroid 2002, Bouhnik y col. 2007) y *Lactobacilli* (Kleessen & col. 2001). Este efecto de favorecer el crecimiento de determinadas especies de bacterias intestinales por sobre al resto presentes en tracto digestivo, se atribuye a que estas bacterias en particular son capaces de hidrolizar los enlaces β -(2 \rightarrow 1) presentes en los fructanos (Roberfroid 2002). Los fructanos servirían, además, para evitar el desarrollo de cáncer, particularmente cáncer colo-rectal (Taper y Roberfroid 2000, Taper y Roberfroid 2002, Pool-Zobel 2005, Sauer y col. 2007). Los fructanos disminuyen los niveles de colesterol y de triglicéridos (Beylot 2005, Brighenti 2007, Urías-Silvas y col. 2008). Se ha visto también que favorecen la absorción de minerales como Ca^{+2} y Mg^{+2} en el intestino grueso (Coudray y col. 2003, Griffin y col. 2003, Griffin y Abrams 2005, Weaver y col. 2010).

1.5. Aloe vera

Aloe barbadensis Miller, conocido más comúnmente como Aloe vera corresponde a una planta que ha evolucionado en ambientes semiáridos. Se encuentra

clasificado actualmente como miembro de la orden Asparagales dentro de la familia Xanthorrhoeaceae y subfamilia Asphodelaceae, estando previamente clasificado en la orden de los Liliales de la familia Liliaceae (Chase 2004 , Chase y col. 2009). Es originaria del norte de África y se encuentra adaptada a ambientes en los cuales hay una baja disponibilidad de agua durante periodos prolongados del año, condición característica de las zonas desérticas y sub-tropicales del continente africano. El Aloe vera es una monocotiledónea xerófita, que presenta un metabolismo tipo CAM (Ni y col. 2004). Como se había mencionado previamente, las especies CAM presentan adaptaciones a ambientes estresantes, entre los cuales se destaca una eficiente síntesis de oligo y polisacáridos que ayudan a la planta a retener agua. Se ha introducido Aloe vera a la III y IV región de Chile, debido justamente a su tolerancia a los ambientes secos y de altas temperaturas, ambas características presentes en estas zonas de Chile. En el laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias en la Universidad de Chile, se ha estudiado las respuestas fisiológicas y moleculares del Aloe vera bajo diversos regímenes de riego y de altas temperaturas. Los resultados experimentales han demostrado que bajo estas condiciones de estrés abiótico se produce un incremento significativo en la expresión de los genes de estrés y acumulación notoria de proteínas de respuesta a shock térmico (HSP70, HSP100 y Ubiquitina) y estrés oxidativo a través de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Salinas y col. 2010). Estos resultados demuestran que Aloe vera posee genes que le permiten tolerar bien el estrés hídrico, las altas temperaturas y el estrés oxidativo que desencadenan altas temperaturas y falta de agua.

Un tipo de polisacárido característico que sintetiza Aloe vera en grandes cantidades es el acemanano (un tipo de galactoglucomanano acetilado). La estructura principal del acemanano está formada mayoritariamente por manosa y en menor cantidad de moléculas de glucosa formando enlaces β -(1→4) entre si, mientras que la galactosa forma las ramificaciones mediante enlaces α -(1→6) con la estructura principal (Chow y col. 2005, Chun-hui y col. 2007). Este complejo polisacárido mucilaginoso es almacenado principalmente en las células del tejido parenquimático de las hojas, lo que da origen al gel viscoso característico del Aloe vera (Ni y col. 2004). Sería este gel mucilaginoso rico en galactoglucomananos, el que otorgaría la cualidad de succulencia a la planta, además sería el responsable de retener y almacenar grandes cantidades de agua por largos periodos.

El *Aloe barbadensis* Miller es una de entre las más de 300 especies de Aloe que más se comercializa en la actualidad. Esta planta es altamente cotizada debido a diversas propiedades medicinales que se le han atribuido a lo largo de los siglos, en especial sus capacidades regenerativas de la piel, como por ejemplo la cicatrización rápida post-operatorio o después de quemaduras (Reynolds & Dweck 1999) y la estimulación del sistema inmune (Reynolds & Dweck 1999, Gauntt y col. 2000, Lee y col. 2001, Leung & col. 2004, Vega y col. 2005, Im y col. 2010). Estas propiedades curativas asociadas al Aloe vera se deberían en gran medida al galactoglucomanano presente en el gel de las hojas.

A pesar que Aloe vera es una planta del orden de los Asparagales en las cuales se han descrito la presencia de fructanos, como es el caso de ajo, cebolla, espárrago y en especies de Agave que es también una planta CAM, cuando se comenzó esta tesis se

levantó la hipótesis de que en *Aloe barbadensis* Miller debían de haber fructanos. Sin embargo, estas moléculas nunca han sido descritas en Aloe vera ni en otras especies de Aloe. Este es entonces el primer trabajo donde se describen estas moléculas para esta especie y las modificaciones que ellas tienen cuando paulatinamente se restringe el agua a la planta.

1.6. Hipótesis.

“En las plantas de *Aloe barbadensis* Miller el estrés hídrico incrementa significativamente las concentraciones de carbohidratos y en particular de los fructanos, induciendo modificaciones en la estructura de los polímeros de fructano.”

1.7. Objetivo General.

Estudiar los niveles de carbohidratos, y la presencia y composición de fructanos en las hojas de plantas de *Aloe barbadensis* Miller (Aloe vera) sometidas a diferentes niveles de déficit hídrico.

1.8. Objetivos Específicos.

- 1) Cuantificar las concentraciones de los carbohidratos totales y solubles en hojas de Aloe vera sometidas a estrés hídrico.
- 2) Cuantificar las concentraciones de fructanos en hojas de Aloe vera sometidas a estrés hídrico.
- 3) Determinar la composición de fructanos y los tipos de enlaces que presentan estos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Condiciones de crecimiento y de inducción del estrés hídrico.

Los ensayos se realizaron con muestras de plantas de *Aloe barbadensis* Miller (Aloe vera) que fueron cultivadas en el Campo Experimental de Las Cardas de la Universidad de Chile durante la temporada 2006-2007. Este sitio está ubicado en la región de Coquimbo, Chile (30° 17'S, 71° 15'O). Se implementaron cuatro tratamientos distintos de riego por goteo, las cuales consistían en 1600, 1200, 800 y 400 mL (conformando los tratamientos T1, T2, T3 y T4 respectivamente) de agua por planta suministrado cada quince días. De esta forma la única condición de campo que era controlado era la cantidad de agua que recibían las plantas. Al grupo de plantas sometidas al tratamiento 1 o T1 (1600 mL de agua), fueron considerados como el grupo control de riego. Los volúmenes de agua para cada tratamiento se determinaron al considerar la de Capacidad de Campo (CC) del terreno, el cual consiste en la máxima capacidad del suelo en retener agua después de haberse drenado el exceso al cabo de dos días. Es así como se decidió trabajar con el 100%, 75%, 50% y 25% CC, que corresponden a los 1600, 1200, 800 y 400 mL de agua por planta respectivamente.

2.2. Material Vegetal.

Se ocuparon las puntas y bases de las hojas de Aloe vera, designando a los primeros 15 cm de la hoja en contacto con el tallo de la planta, como la base y los 15 cm del extremo apical de la hoja como a la punta. Estas porciones de hojas incluían tanto tejido epidérmico de la planta, correspondiente a la corteza fotosintética, como también

la pulpa interna o gel, que constituye el tejido parenquimático. Se obtuvieron muestras desde 3 plantas distintas para cada condición de riego, analizándose en total 12 plantas distintas, y usando tanto las puntas y bases de las respectivas hojas. Todas las muestras recolectadas se almacenaron en un refrigerador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior uso.

2.3. Extracción de Carbohidratos.

Dependiendo del tipo de carbohidrato que se buscaba obtener desde las muestras de hojas, se emplearon distintos protocolos de extracción. A continuación se presentan los métodos de extracción para azúcares totales, solubles y de fructanos.

2.3.1. Extracción de Azúcares Totales.

Para la extracción de los azúcares totales se maceraron 2,5 g de hoja, que había sido previamente congelado usando nitrógeno líquido, después se agregó 15 mL de agua desionizada y llevó a ebullición por 5 min. Posteriormente, se centrifugó a 10.000 rpm (7.796 g) por 15 min. a temperatura ambiente. Se rescató y almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ el sobrenadante obtenido.

2.3.2. Extracción de Azúcares Solubles.

Se empleó el método de Cardemil y Reiner con modificaciones (Cardemil y Reiner 1982), siendo similar al usado para los azúcares totales, pero con algunos cambios. A partir de 2,5 g de hoja macerada (que había sido congelado previamente con nitrógeno líquido), se agregó 15 mL de etanol 95% (v/v). Se calentó a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min.

Luego todo es centrifugado a 10.000 rpm (7.796 g) por 15 min a temperatura ambiente. Finalmente es rescatado y almacenado el sobrenadante a -20 °C.

2.3.3. Extracción de Fructanos.

La extracción de los fructanos se basó siguiendo una modificación al método realizado por Cairns y Pollock (Cairns & Pollock 1988).

2.3.3.1. Extracción de Oligofructanos.

A partir de 5 g de hoja junto con 10 mL de etanol 80% (v/v) se calentó hasta ebullición por 5 min, luego usando nitrógeno líquido se congeló el tejido de Aloe y se maceró. La muestra macerada se mezcló nuevamente con el etanol restante de la ebullición y todo se centrifugó a 5.000 rpm (1.949 g) por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se rescató y almacenó el sobrenadante. Se realiza una segunda extracción con etanol 80% (v/v) al pellet obtenido previamente, salvo que en la segunda extracción se empleó 3 mL de etanol. Los dos volúmenes de sobrenadantes obtenidos se juntaron y se denominó como el extracto de oligofructanos. El extracto obtenido fue guardado a -20°C.

2.3.3.2. Extracción de Polifructanos.

El pellet obtenido de la última centrifugación (proveniente de la sección 2.3.3.1) fue resuspendido con 10 mL de agua desionizada. En seguida se calentó a 60 °C por 15 min. Luego se centrifugó a 5.000 rpm (1.949 g) por 5 min. a temperatura ambiente. Nuevamente, al igual que para los oligofructanos, se separó el pellet del sobrenadante y se rescató el sobrenadante. El pellet restante fue resuspendido con 3 mL de agua

desionizada para realizar una segunda extracción. Finalmente ambos volúmenes de sobrenadante obtenidos fueron mezclados y se denominó como extracto de polifruktanos, y fue guardado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.4. Cuantificación de los carbohidratos por Espectrofotometría.

Se utilizó un ensayo colorimétrico específico para carbohidratos denominado Test de Antrona o modificaciones de éste. La intensidad del color se cuantificó a 620 nm por medio de espectrofotometría como una aproximación para cuantificar los azúcares de los distintos tipos de extractos obtenidos. Las mediciones se llevaron a cabo en el espectrofotómetro Termo Spectronic Genesys 20 modelo 4001/4.

2.4.1. Cuantificación de Azúcares Totales y Solubles.

Tanto para el extracto de azúcares totales, como para los azúcares solubles se utilizó el ensayo colorimétrico usando una solución de Antrona (Dische 1962). La solución de Antrona fue preparada con 150 mg de antrona que se disolvió en 100 mL de H_2SO_4 concentrado. Las mediciones de cuantificación se llevaron a cabo en tubos de ensayo, en los cuales se mezcló 10 μL de cada muestra más 990 μL de agua desionizada y se completaron con 2 mL de la solución de antrona preparada previamente, teniendo en cada tubo un volumen total de 3 mL. Debido a que la reacción es exotérmica, se dejaron los tubos por 10 min en hielo y luego a temperatura ambiente por otros 10 min, antes de ser medidos en el espectrofotómetro a 620 nm. Para poder cuantificar la

concentración de azúcares presente en las muestras fue necesario generar una curva de calibración con tendencia lineal. Esta consistió de una solución de glucosa a una concentración de 1 mg/mL, la cual se estableció con seis puntos (0 µg, 10 µg, 25 µg, 50 µg, 75 µg y 100 µg de glucosa). Los resultados obtenidos fueron comparados con la curva patrón de glucosa para determinar las concentraciones y fueron expresados finalmente en mg/g peso seco de hoja. Se analizaron muestras de hojas de tres plantas distintas para cada tratamiento (3 muestras biológicas) y a cada muestra se realizó dos mediciones (2 réplicas técnicas).

2.4.2. Cuantificación de Fructanos.

En el caso de los fructanos, tanto para las mediciones de los oligofructanos y polifructanos, se empleó una modificación al método de Antrona que es más sensible para cetosas (Jermyn 1956, Van Handel 1967). Esta solución de antrona fue preparada a partir de 300 mg de antrona que fue disuelta en 36 mL de agua desionizada al que finalmente se adicionó 114 mL de H₂SO₄ concentrado. Esta solución también debe ser preparada en el momento y no se debe esperar más de 3 a 4 horas para usarla. Para la cuantificación de las muestras de oligofructanos, en cada tubo de ensayo se mezcló 10 µL de muestra más 240 µL de agua y se agregó al final 2,5 mL de la solución de antrona. Mientras que para las muestras de polifructanos en los tubos de ensayo se mezclaron 20 µL de muestra con 230 µL de agua desionizada y 2,5 mL de antrona. El volumen final en ambos casos fue de 2,75 mL. Las soluciones en los tubos fueron agitadas usando vortex y luego los tubos fueron colocados en un baño termoregulado a 37 °C por 45 min.

Luego se dejaron por 10 min a temperatura ambiente antes de proceder a medir absorbancia a 618 nm. Para la curva de calibración se usó una solución de fructosa a una concentración de 0,2 mg/mL, y con seis puntos en la curva (0 µg, 2 µg, 5 µg, 10 µg, 15 µg y 20 µg de fructosa). Los resultados se expresaron en mg g⁻¹ peso seco de hoja. Se analizaron muestras de hojas de tres plantas distintas para cada tratamiento (3 muestras biológicas) y a cada muestra se realizó dos mediciones (2 réplicas técnicas).

2.5. Purificación de Fructanos.

Debido a que los extractos obtenidos presentaban, además de azúcares, otras moléculas contaminantes principalmente pigmentos, las muestras debieron ser purificadas para los ensayos posteriores. Para esto se usaron columnas con resinas de intercambio iónico, como fase estacionaria, para obtener los azúcares neutros de interés (Machado de Carvalho & Dietrich 1993). Aproximadamente 5 mg del extracto de fructanos fueron previamente neutralizados (llevados a pH 7,0) usando NH₄OH. Usando agua desionizada como fase móvil, las muestras neutralizadas pasaron primero por una columna con 6 mL de resina catiónica (Dowex® 50x8-200, Sigma-Aldrich) y luego por la columna con 6 mL de resina aniónica (Dowex® 1x8-200, Sigma-Aldrich), todo lo anterior a temperatura ambiente. Ambas columnas estaban conectadas en serie de tal forma que la muestra pasaba de forma continuada desde una columna a otra. El flujo aproximado con el cual se eluyeron las muestras fue de 1,6 mL/min. Se cuantificó las concentraciones de fructanos presente en las fracciones recolectadas mediante el ensayo con antrona (sección 2.4.2.), con la diferencia que se usaron 40 µL de cada fracción para llevar a cabo la reacción. Aquellas fracciones en las cuales se detectaron fructanos se

concentraron en un evaporador rotatorio y posteriormente se liofilizaron, obteniéndose de este modo un polvo blanco-amarillento seco que se podía almacenar a temperatura ambiente.

2.6. Cromatografía de Capa Fina (TLC) de Fructanos.

Para determinar el GP de los oligofructanos y de los trisacáridos que los constituyen, se separaron por medio de TLC. Para ello se aplicó una alícuota equivalente a 12 µg aproximadamente de las muestras de fructanos purificados en una placa de TLC de sílica-gel 60 F₂₅₄ de 20x20 cm (Merck). Las muestras purificadas que se usaron en las placas correspondía a las fracciones que se habían juntado y concentrado en el rotaevaporador, pero antes de que fuesen liofilizadas. Se cargaron en las mismas placas estándares de fructosa (40 µL, Merck), sacarosa (40 µL, Merck), trisacárido (20 µL, Megazyme), tetrasacárido (20 µL, Megazyme) y pentasacárido (20 µL, Megazyme) de fructanos de tipo inulina, todos los estándares fueron preparados a una concentración de 1 mg/mL. Como fase móvil se empleó una solución compuesta de 1-butanol: ácido acético: agua (55:30:15), en el cual se corrió la placa 3 veces (Spollen & Nelson 1988). La tinción y revelado de la placa se llevó a cabo rociando una solución de urea- ácido fosfórico (Wise y col. 1955) y luego calentando la placa a 150 °C por 10 min aprox. Además la placa fue fotografiada en luz blanca y en luz UV (366 nm), usando una cámara digital Canon PowerShot A460.

El análisis de la placa cromatográfica en capa fina de los extractos de oligo y polifructanos nos permitió estimar la cantidad real de fructanos en las muestras sin la interferencia de sacarosa y fructosa. Esto se realizó mediante la utilización del programa

de análisis de imágenes MCID Analysis versión 7.0 para Windows, con el cual se analizaron las áreas y la intensidad de las bandas obtenidas para la fructosa y sacarosa presente en las placas de TLC. Para esto se construyó una curva de calibración para sacarosa y otra para fructosa. Debido a que se sabe que se cargó 12 µg total de muestra, al restar las cantidades de fructosa y sacarosa, se obtuvo la cantidad de fructanos presente, resumiéndose lo anterior en la siguiente ecuación:

$$\mu\text{g de Fructanos} = 12\mu\text{g} - (\mu\text{g de Fructosa} + \mu\text{g Sacarosa})$$

Se consideró como fructanos a partir de los trisacáridos y aquellos sacáridos de mayor grado de polimerización ($GP \geq 3$). Cabe destacar que es simplemente una estimación de las cantidades, ya que se analizaron las fotografías correspondientes a una muestra por planta por tratamiento.

2.7. Análisis de fructanos por Cromatografía de Gases acoplado con Espectrometría de Masa (GC-MS).

Para estudiar la estructura de los fructanos fue necesario recurrir a métodos analíticos más sofisticados y sensibles como es la cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa. Para estos análisis se contó con el financiamiento del proyecto FONDECYT N°1070899 y FONDECYT 7080094. Estos proyectos permitieron la colaboración del Dr. Markus Pauly, para lo cual se viajó al laboratorio de Great Lakes Bioenergy Research Center (GLBRC) del Plant Research Laboratory del Michigan State University para realizar estos análisis. Fue posible así analizar en detalle la composición de los monosacáridos, como también los enlaces glicosídicos presentes en los fructanos provenientes del Aloe vera bajo estrés hídrico.

2.7.1. Cuantificación de fructanos por análisis de alditol acetatos mediante GC-MS.

Para determinar la composición los monosacáridos que conforman la estructura de los fructanos y también para cuantificar las concentraciones de fructanos en las hojas de Aloe vera se empleó el ensayo de alditol acetilados (York y col. 1985). Este método consistió en primero hidrolizar los polisacáridos hasta obtener los monosacáridos, luego los carbohidratos en forma de monosacáridos fueron derivatizados, obteniendo así un producto final volátil (los alditoles o polioles acetilados) que posteriormente fueron analizados por medio de GC-MS. Por razones que en este análisis la fructosa se tautomeriza en glucosa y manosa debido al tautomerismo ceto-enólico de la fructosa (Abdel-Akherj y col. 1951, Carpita y Shea 1989), la cuantificación de los alditol acetatos por medio de GC-MS permitió determinar la composición de glucosa y de manosa en las muestras de fructanos. Al considerar las cantidades obtenidas de manosa y glucosa, a partir de los 100 µg total de la muestra inicial cargada para este análisis, como un porcentaje del respectivo azúcar en la muestra se empleó este porcentaje para luego extrapolar los miligramos de fructanos totales. El equipo de cromatografía de gases empleado fue un Agilent 7890A GC System con un sistema de inyección automatizada de muestras, Agilent 7683 Automatic Liquid Sampler, estando conectado con un espectrómetro de masa Agilent 5975 MS. La columna ocupada fue una Supelco SP-2380 (Sigma-Aldrich) de dimensiones 30m x 0,25mm x 0,20µm. Se empleó el software GC/MSD ChemStation versión E.02.00.493 de Agilent Technologies para analizar los cromatogramas obtenidos. A continuación se presenta más detallado el protocolo de derivatización de carbohidratos hasta alditoles acetilados.

2.7.1.1. Hidrólisis Ácida.

Previo a la hidrólisis, se preparó a partir de cada extracto de fructano purificado y liofilizado una solución a 1 mg/mL, al disolver 1 mg de muestra sólida en 1 mL de agua desionizada. Luego se tomó 100 μ L de la solución y se colocó en un tubo de ensayo con tapa rosca, al cual se le agregó 20 μ L de una solución de inositol [1 mg/mL]. Después se procedió a liofilizar las muestras en los tubos de ensayo. Una vez seca la muestra, se adicionó a cada tubo 250 μ L de ácido trifluoroacético [2M], que luego fueron tapados y calentados en una placa calefactora a 60 °C por 60 minutos. Posteriormente los tubos fueron enfriados y el ácido trifluoroacético fue evaporado, dejando los tubos en la placa calefactora a 40 °C y bajo una suave corriente de aire. Finalmente se agregó 300 μ L de 2-propanol, que luego es evaporado a 40 °C en la placa calefactora (este paso se repite un vez).

2.7.1.2. Reducción de Azúcares hasta Alditoles.

Se agregó a cada tubo 200 μ L de una solución recién preparada de borohidruro de sodio (NaBH_4). Esta solución fuertemente reductora se preparó a partir de 10 mg de NaBH_4 en 1 mL de hidróxido de amonio [1M], debiendo ser preparada justo antes de ser usada. Luego se dejaron los tubos a temperatura ambiente por 90 minutos, al cabo de ese tiempo es neutralizado el NaBH_4 con 150 μ L de ácido acético glacial. Después se adicionaron 250 μ L de ácido acético: metanol (1:9 v/v), que luego es evaporado bajo una suave corriente de aire y a 30 °C. Finalmente se agregaron 250 μ L de metanol, que también es evaporado usando aire y calor a 30 °C (este último paso se repitió dos veces más). Es necesario mencionar que en condiciones alcalinas, como las usadas en este caso,

las moléculas de D-fructosa van a originar D-glucosa y D-manosa. Este fenómeno se debe al tautomerismo ceto-enólico de la fructosa (Figura 3), obteniéndose un 50% de manosa y un 50% de glucosa (Abdel-Akherj y col. 1951, Carpita y Shea 1989).

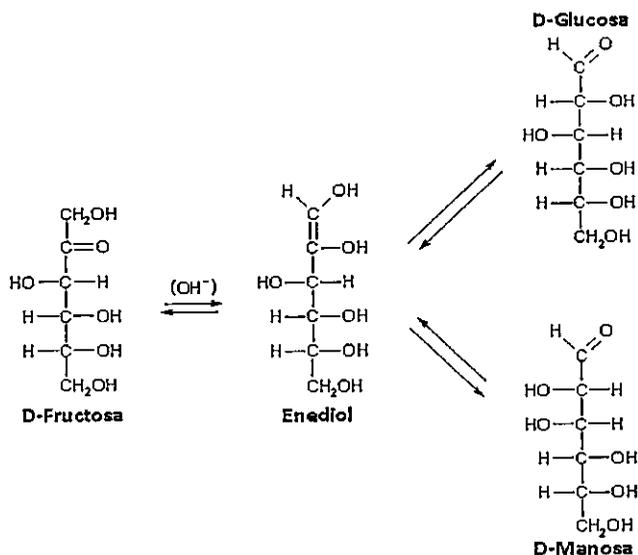


Figura 3: Esquema del tautomerismo ceto-enólico de la fructosa en soluciones alcalinas. Se muestra la conversión de fructosa (cetosa) a manosa o glucosa (ambos aldeídos) en condiciones alcalinas mediante la formación de un intermediario llamado enediol. Esquema modificado desde: <http://www.demochem.de/D-Fehling-e.htm> (visitado el 30-08-2011).

Cabe mencionar que la glucosa proveniente desde la fructosa al ser reducida bajo estas condiciones produce glucitol, también llamado sorbitol. A su vez, la manosa obtenida desde la fructosa al ser reducida originará el alditol o poliol conocido como manitol.

2.7.1.3. Acetilación de los Aditales.

A cada tubo se agregó 50 µL de anhídrido acético y 50 µL de piridina, que luego fue agitado con vortex e incubado por 20 minutos a 121 °C en la placa calefactora. Después fueron enfriados en hielo y el contenido de los tubos fue evaporado usando una

suave corriente de aire y a 25 °C. Finalmente se adicionó 200 µL de tolueno y luego fue evaporado bajo un chorro de aire a 25 °C (este paso es repetido dos veces más). Es así como se adicionan grupos acetilo (R-COCH₃) a los alditoles, específicamente al interactuar con todos los grupos hidroxilos (R-OH) libres de los alditoles previamente sintetizados.

2.7.1.4. Extracción de Alditoles Acetilados.

Se introduce a cada tubo 1 mL de acetato de etilo y se agitan a mano, luego se agrega 4 mL de agua desionizada y se tapan los tubos para ser agitados con vortex. Centrifugar a 2.000 rpm por 2 minutos para separar las fases (arriba queda la fase con acetato de etilo y abajo queda el agua). Se pipeteó 50 µL de la fase superior (acetato de etilo) a los frascos de GC-MS, y se diluyeron con 100 µL de acetona y fueron tapados. Las muestras que no fueron analizadas inmediatamente fueron almacenadas a 4 °C.

2.7.2. Análisis de los enlaces glicosídicos de fructanos.

Para determinar los tipos de enlaces presentes en las estructuras de fructanos provenientes de Aloe vera, se generaron y analizaron alditoles acetilados parcialmente metilados (PMAA). Esta metodología estuvo basado en el trabajo de Ciucanu y Kerek 1984, con ciertas modificaciones en el protocolo (Ciucanu 2006). La generación de PMAA es bastante similar al ensayo de los alditoles acetilados (visto en 2.7.1.), pero la gran diferencia radica en que previo a la hidrólisis ácida las muestras de polisacáridos son parcialmente metiladas, específicamente son per-*O*-metiladas en todos los grupos hidroxilos libres de los carbohidratos, además de otras modificaciones en algunos pasos.

En la Figura 4 se presenta un esquema del proceso de síntesis de los PMAA para los fructanos.

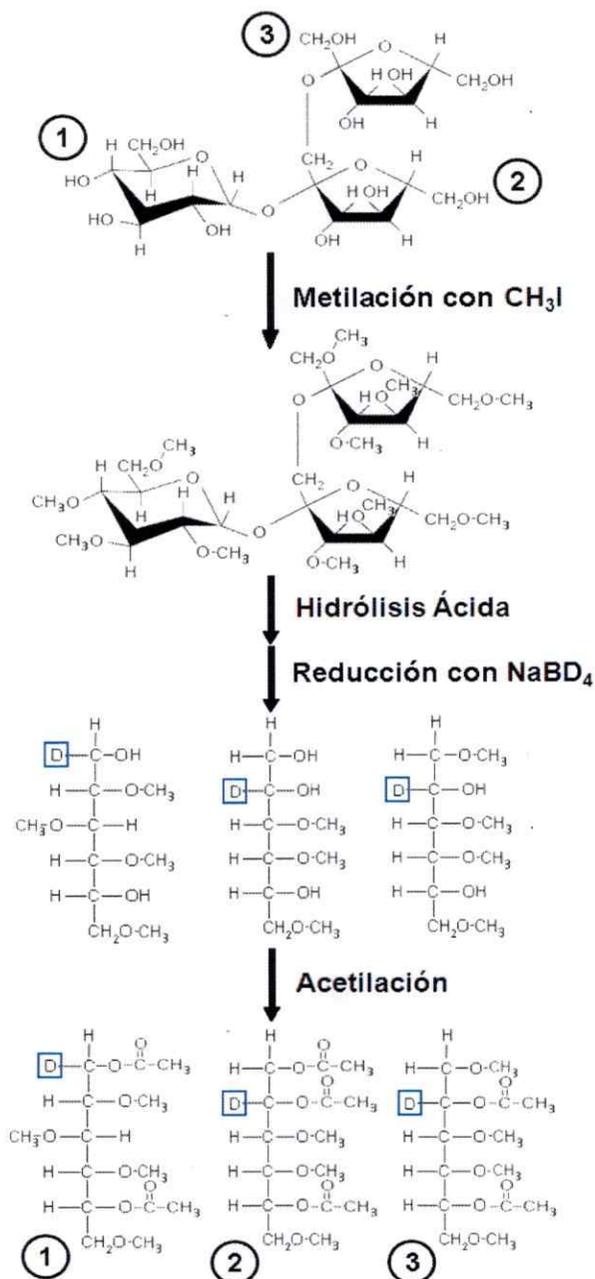


Figura 4: Esquema resumido del proceso de síntesis de los alditol acetatos parcialmente metilados (PMAA). Se muestra un esquema del proceso de síntesis de PMAA a partir de 1-cestosa. El carbohidrato es disuelto en DMSO y luego es metilado usando CH_3I . Mediante hidrólisis ácida se generan los monosacáridos que van a ser posteriormente reducidos a los respectivos alditoles usando NaBD_4 , a los cuales se une deuterio (en el cuadrado azul) en el carbono C1 para la glucosa y en C2 para la fructosa. Los grupos metilos restantes son finalmente acetilados. 1: Glucosa terminal. 2: Fructosa con enlace β -(2→1). 3: Fructosa terminal.

2.7.2.1. Metilación de los Polisacáridos.

Previamente una solución de NaOH en DMSO fue preparado a partir de 100 μL de NaOH, 200 μL de metanol seco y 5 mL de DMSO seco en un tubo de ensayo con tapa rosca, que fue agitado con vortex y luego sonicado por 5 minutos. Al cabo de una centrifugación de 2 minutos a 2.000 rpm, se removió el DMSO (sobrenadante) y se adicionó nuevamente 5 mL de DMSO seco. Estos lavados con DMSO seco se repitieron tres veces. Al final se adicionaron 2 mL de DMSO seco. Para la metilación como tal, se pipetearon 150 μL de la solución de fructanos a 1 mg/mL (preparación visto en sección 2.7.1.1.) en tubos de ensayo con tapa rosca, con la diferencia que no se adicionó 20 μL de inositol. Luego se liofilizaron las muestras en los tubos. Después se agregó a cada muestra 200 μL de DMSO y se dejó agitando usando un agitador magnético por tubo toda la noche. Al cabo de eso tiempo se agregó a cada tubo 200 μL de la solución de NaOH en DMSO (preparado antes de usar), y se dejó agitando a temperatura ambiente por 15 minutos. Luego usando una jeringa de vidrio seca (secada previamente en una estufa a 68 °C por lo menos 15 minutos) se adicionaron 100 μL de yoduro de metilo (CH_3I) a los tubos, después se introdujo N_2 al interior de los tubos y se taparon. Fueron agitados con vortex y luego con agitador magnético por 30 minutos y, siendo después ser sonicados durante 5 minutos. Para detener la reacción de metilación se agregaron 2 mL de agua desionizada a la solución y se agitó suavemente. Finalmente se burbujeó nitrógeno por la solución de cada tubo hasta que ésta se aclaró completamente.

2.7.2.2. Limpieza y secado de polisacáridos.

Se agregó 2 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) a los tubos y se agitó con vortex, siendo posteriormente centrifugados a 2.000 rpm por 2 minutos. Después se transfirió la fase orgánica (abajo) a otro tubo limpio y seco, teniendo precaución de no llevar agua de la fase superior. Las muestras se dejaron bajo una corriente de aire hasta que quedaran completamente secas.

2.7.2.3. Reducción hasta aldítoles.

El protocolo fue similar al usado en 2.7.1.2, con la diferencia que en vez de usar NaBH_4 se usó una solución de NaBD_4 (borodeuteruro de sodio). Este fue preparado justo antes de ser usado al disolver 10 mg de NaBD_4 en 1 mL de hidróxido de amonio. De esta forma los monosacáridos van a quedar marcados con isotopos de deuterio (D) cuando son reducidos a sus respectivos polioles.

2.7.2.4. Extracción de Aldítoles Acetilados per-O-metilados.

El procedimiento es similar al visto en 2.7.1.4., con la modificación en el pipeteo final desde la fase de acetato de etilo, que es de 100 μL en vez de 50 μL . Siendo posteriormente diluidas las muestras con 50 μL de acetona en los frascos de GC-MS, que finalmente son tapados.

2.7.2.5. Determinación del GP de los Fructanos por GC-MS.

Teniendo en cuenta que cada molécula de fructano cuenta con una sola unidad de glucosa en su estructura, se puede determinar el GP a partir de la proporción entre la fructosa y glucosa (fructosa total/glucosa total). Primero se determinó el porcentaje

molar (% Molar) de cada tipo de enlace presente en las muestras a partir del área bajo cada pico o señal obtenidos de los cromatogramas correspondientes a los distintos tipos de enlaces de fructanos. Al sumar los % molares de todos los enlaces de fructosa (fructosa terminal, 1-fructosa, 6-fructosa y 1,6-fructosa ramificada) se obtuvo la fructosa total, mientras que la suma de los % molares de los enlaces de glucosa (glucosa terminal y 6-glucosa) dieron con la glucosa terminal. Como la proporción fructosa total/glucosa total nos indica cuantas unidades de fructosa hay aproximadamente por cada unidad glucosa, para tener el GP total del fructano se tiene que sumar la unidad inicial de glucosa (equivalente a la suma de los % molares de glucosa terminal y 6-glucosa) a las unidades de fructosa. Para ello se sumó +1 a la proporción de fructosa total/glucosa total obtenida para obtener el GP final aproximado de la muestra de fructano.

2.8. Análisis de Datos.

Los datos obtenidos de las plantas bajo los distintos tratamientos hídricos fueron analizados estadísticamente por medio de análisis de varianza de una vía (ANOVA). Luego se estudiaron los datos de puntas y de bases de hojas independientemente para determinar si entre los distintos tratamientos había alguna diferencia significativa, para lo cual se usó el Test de Tukey. En el caso donde se compararon datos de puntas con los de las bases se aplicó un análisis de ANOVA de dos vías y un test a posteriori de Bonferroni para determinar si existía alguna diferencia significativa entre los datos de las puntas y las bases. Los análisis estadísticos y gráficos fueron realizados usando el programa GraphPad Prism 5 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

3. RESULTADOS

3.1 Cuantificación de Azúcares Totales.

Para estudiar los efectos del estrés hídrico en las plantas de Aloe vera, se analizaron las concentraciones de los azúcares totales en las hojas, y las variaciones en las concentraciones de los carbohidratos que pudiesen generarse como consecuencia de un déficit hídrico en la planta. Mediante el test de Antrona se determinaron las concentraciones en los extremos apicales o puntas, como también en las bases de las hojas de plantas sometidas a los distintos tratamientos de riego (T1: 1600, T2: 1400, T3: 800 y T4: 400 mL· planta cada 15 días). En la Figura 5 se muestran los resultados obtenidos de las mediciones para los azúcares totales.

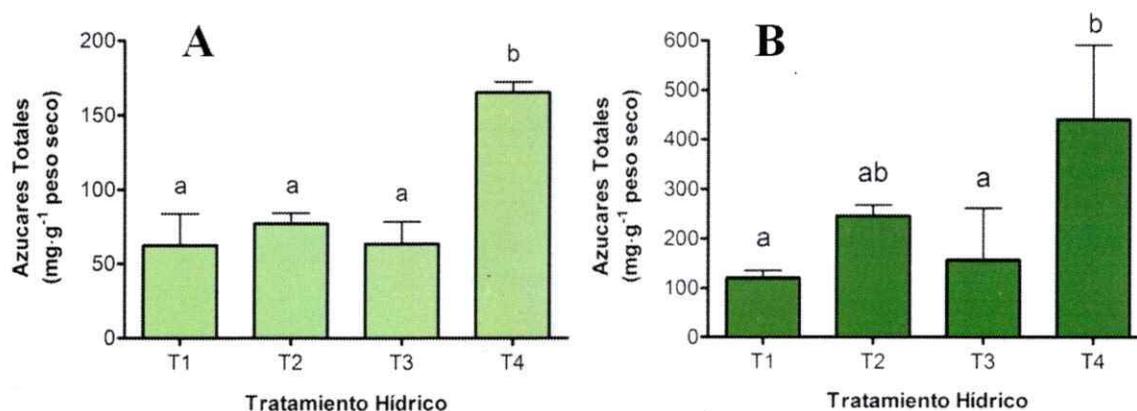


Figura 5: Efecto del tratamiento hídrico en las cantidades de Azúcares Totales en las hojas de Aloe vera. Se presentan los resultados obtenidos para cada tratamiento de riego (T1 al T4), considerando como control de riego a T1. **A)** Cantidad de azúcares totales en las puntas de las hojas Aloe vera. **B)** Cantidad de azúcares totales en las bases de las hojas de Aloe vera. Cada columna representa un valor promedio de 3 muestras biológicas y 2 réplicas técnicas con su respectiva barra de error correspondiente a la desviación estándar. Las letras distintas sobre cada barra indican que existe una diferencia significativa entre los valores de cada tratamiento (Test de Tukey, $P < 0,05$).

En la Figura 5A se observa claramente que en las puntas existe un incremento significativo de los azúcares totales en la condición de mayor estrés hídrico (T4 con 400 mL por planta). Algo similar se observó para las bases bajo las mismas condiciones (Figura 5B). La cantidad de azúcar en T4 es significativamente mayor que en T1 y T3, pero entre T2 y T4 no se detectó una diferencia significativa en las bases.

También se consideró si entre las puntas y bases de una misma hoja existen diferencias en las cantidades de azúcares totales en cada tratamiento de riego. Se encontró que el promedio de las concentraciones en las bases eran mayores que en las puntas, pero estas diferencias resultaron ser significativamente distintas entre sí solamente en T2 y en T4 (Figura 6). Por lo que solamente se puede establecer que en T2 y particularmente en T4 las bases presentaron una mayor cantidad de azúcares.

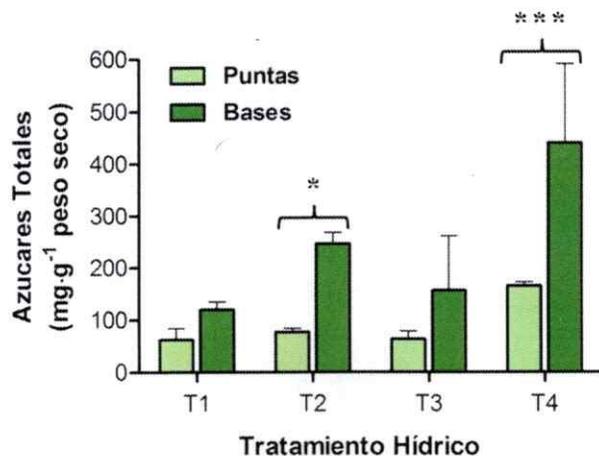


Figura 6: Cantidad de Azúcares Totales de puntas y bases de hojas de Aloe vera en diferentes tratamientos hídricos. Se consideró como control de riego al tratamiento 1 (T1). Cada columna representa un valor promedio de 3 muestras biológicas y 2 réplicas técnicas con su respectiva barra de error correspondiente a la desviación estándar. Los asteriscos indican una diferencia significativa entre puntas y bases de un mismo tratamiento, analizado por Test de Bonferroni (*: $P < 0,05$; ***: $P < 0,001$).

3.2. Cuantificación de Azúcares Solubles.

Otro grupo de carbohidratos que se estudiaron fueron los azúcares solubles, debido a que se sabe que están asociados con roles protectores en las plantas bajo condiciones estresantes y en particular bajo estrés hídrico. De forma similar que para los azúcares totales, los azúcares solubles fueron cuantificados mediante el test de Antrona. Se determinaron las cantidades en las puntas y en las bases de las hojas de *Aloe barbadensis* Miller en distintos tratamientos de riego (T1 a T4). Los resultados se observan en la Figura 7.

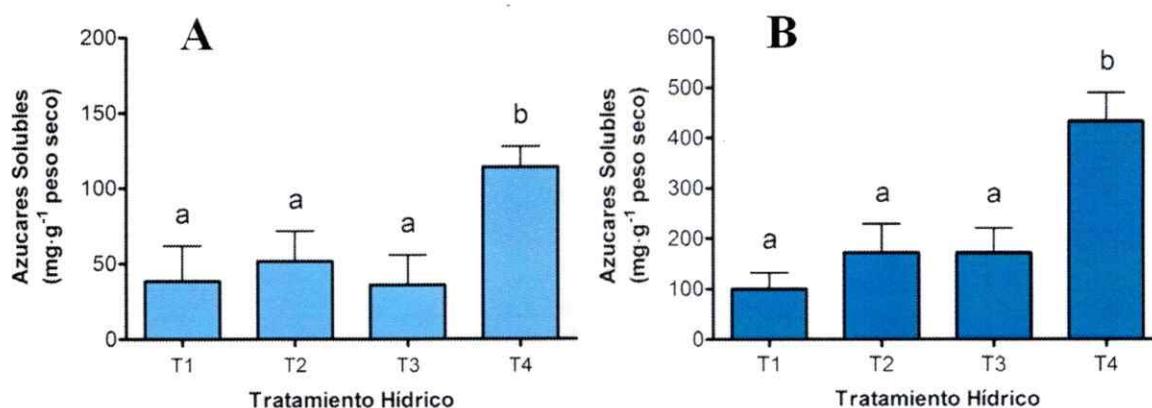


Figura 7: Efecto del tratamiento hídrico en las cantidades de Azúcares Solubles en las hojas de Aloe vera. Se presentan los resultados obtenidos para cada tratamiento de riego (T1 al T4), considerando como control de riego a T1. **A)** Cantidad de azúcares solubles en las puntas de las hojas Aloe vera. **B)** Cantidad de azúcares solubles en las bases de las hojas de Aloe vera. Cada columna representa un valor promedio de 3 muestras biológicas y 2 réplicas técnicas con su respectiva barra de error correspondiente a la desviación estándar. Las letras distintas sobre cada barra indican que existe una diferencia significativa entre los valores de cada tratamiento (Test de Tukey, $P < 0,05$).

Se encontró que hay un incremento significativo de los azúcares solubles tanto en las puntas (Figura 7A), como también en las bases (Figura 7B) de las hojas bajo el tratamiento hídrico T4, es decir, bajo la condición de mayor déficit hídrico (más estresante) para la planta.

Cuando se compararon las cantidades entre puntas y bases de una misma hoja proveniente de plantas sometidas a los distintos tratamientos (Figura 8), se observó nuevamente que los promedios de las bases de las hojas eran mayores en comparación a las puntas. Al llevar a cabo el análisis estadístico correspondiente, se demostró que exclusivamente en T2, T3 y T4 había diferencias significativas entre puntas y bases de las hojas en cuanto a las cantidades de azúcares solubles. Se repitieron resultados similares a los obtenidos para los azúcares totales (Figura 6), en cuanto a que T2 y T4 las bases registraron una mayor cantidad de carbohidratos que lo encontrado en las puntas de las mismas hojas.

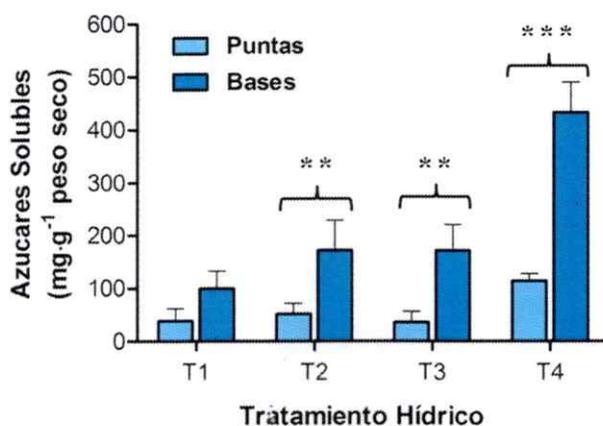


Figura 8: Cantidad de Azúcares Solubles de puntas y bases de hojas de Aloe vera sometidos a diferentes tratamientos hídricos. Cada columna representa un valor promedio de 3 muestras biológicas y 2 réplicas técnicas con su respectiva barra de error correspondiente a la desviación estándar. Los asteriscos indican una diferencia significativa entre puntas y bases de un mismo tratamiento, analizado por Test de Bonferroni (**: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$).

3.3. Cuantificación de Fructanos.

Los fructanos al ser solubles en agua son considerados osmolitos como también lo son las azúcares solubles de las plantas. Al ser solubles en agua ellos contribuyen en

las cantidades de azúcares solubles que la planta tiene. Sin embargo, por tener otros importantes roles en la protección al estrés hídrico, es conveniente establecer cuánto de la cantidad de azúcares solubles corresponde a los fructanos. Es así necesario realizar extracciones específicas para poder obtener y cuantificar estos polisacáridos.

3.3.1. Cuantificación de Oligofructanos

En la Figura 9 se muestran los resultados la cuantificación de estos oligosacáridos, y se detectó la presencia de oligofructanos tanto en puntas como en bases de las hojas. También se determinó que en el caso de las puntas había un incremento significativo de fructanos en T4 con respecto a los otros tratamientos (Figura 9A), mientras que en las bases no se detectaron variaciones significativas en las concentraciones entre los distintos tratamientos de riego (Figura 9B).

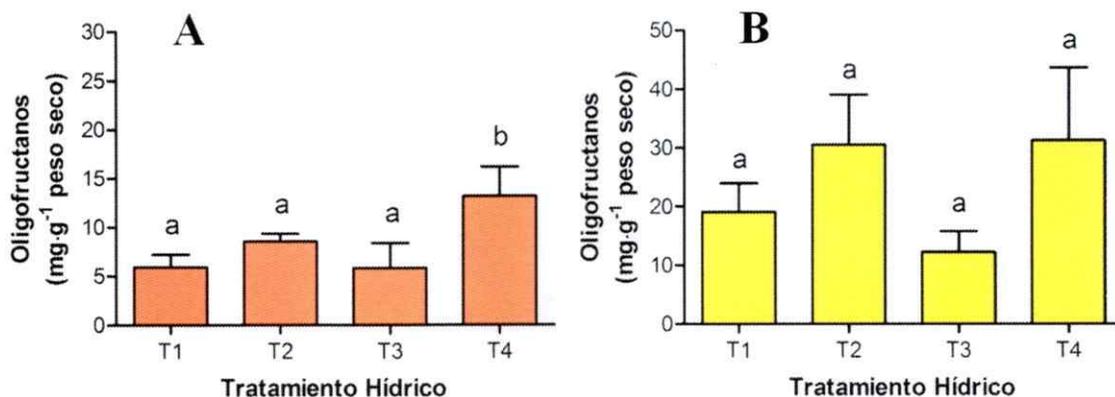


Figura 9: Cuantificación de Oligofructanos en hojas de Aloe vera sometidas a diferentes tratamientos hídricos. La cantidades se muestran para puntas y bases de hojas de Aloe vera en las diferentes condiciones de riego (T1 a T4), considerando a T1 como control de riego. **A)** Cantidad de oligofructanos en las puntas de hojas. **B)** Cantidad de oligofructanos en las bases de hojas. Cada columna representa un valor promedio de 3 muestras biológicas y 2 réplicas técnicas con su respectiva barra de error correspondiente a la desviación estándar. Las letras distintas sobre cada barra indican que existe una diferencia significativa entre los valores de cada tratamiento (Test de Tukey, $P < 0,05$).

Luego al analizar las diferencias entre las puntas y bases de las mismas hojas, se encontró la misma tendencia que en los azúcares totales, es decir, una mayor concentración de carbohidratos (oligofruktanos) en las bases con respecto a las puntas. Y en este caso particular, se vio que en T2 y en T4 las diferencias entre bases y puntas eran estadísticamente significativas. En la Figura 10 se muestra la comparación entre puntas y bases para las cantidades de oligofruktanos.

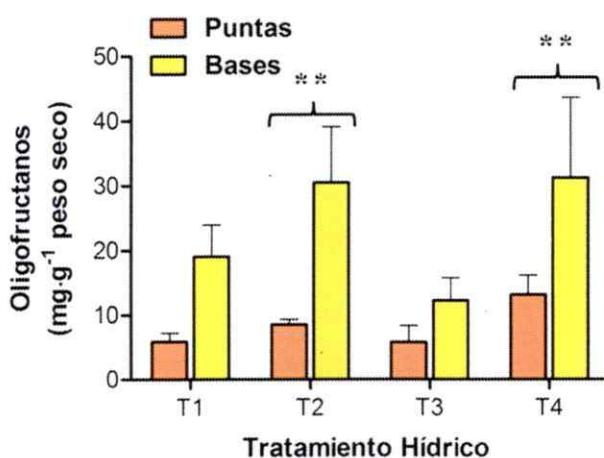


Figura 10: Cantidades de Oligofruktanos de puntas y bases de hojas de Aloe vera sometidos a diferentes tratamientos hídricos. Cada columna representa un valor promedio con su respectiva barra de error correspondiente a la desviación estándar. Los asteriscos indican una diferencia significativa entre puntas y bases de un mismo tratamiento, analizado por Test de Bonferroni (**: $P < 0,01$).

3.3.2. Cuantificación de Polifruktanos

También se determinaron las cantidades de Polifruktanos en las hojas de Aloe vera usando el mismo test de Antrona modificado que se usó para cuantificar a los oligofruktanos. Es así como en la Figura 11 se presentan los resultados de esta cuantificación. En la Figura 11A se aprecia que en T4, hay un incremento significativo en la cantidad de polifruktanos en las puntas de la planta en comparación con los demás

tratamientos. Mientras que en las bases (Figura 11B) las mayores cantidades de polifruktanos se detectaron en T4 y en T2. En ambos tipos de muestras analizadas se encontró que la condición de mayor déficit hídrico para la planta registraban las mayores concentraciones de polifruktanos.

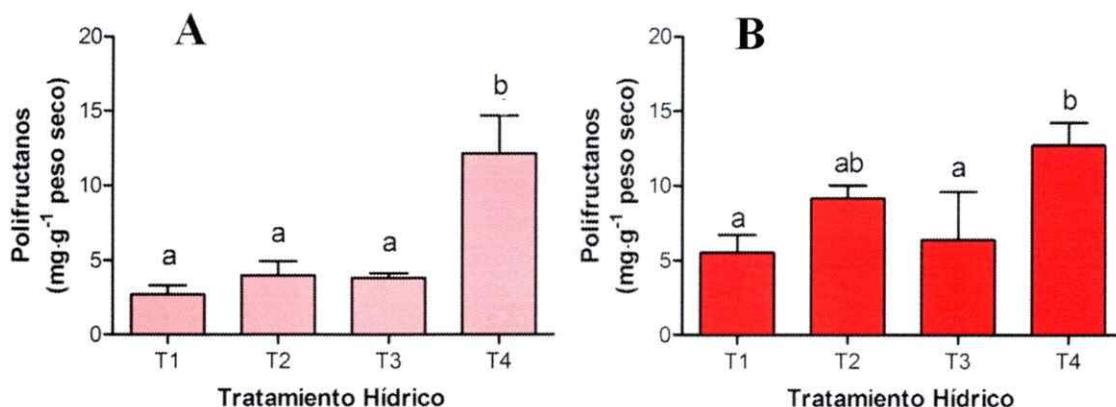


Figura 11: Cantidades de Polifruktanos en hojas de Aloe vera sometidas a diferentes tratamientos hídricos. Se muestran las concentraciones obtenidas desde las plantas bajo las condiciones de riego (T1 a T4), considerando a T1 como control de riego. **A)** Cantidad de polifruktanos en las puntas de hojas. **B)** Cantidad de polifruktanos en las bases de hojas. Cada columna representa un valor promedio de 3 muestras biológicas y 2 réplicas técnicas con su respectiva barra de error correspondiente a la desviación estándar. Las letras distintas sobre cada barra indican que existe una diferencia significativa entre los valores de cada tratamiento (Test de Tukey, $P < 0,05$).

Al graficar las cantidades de las puntas con las bases del respectivo tratamiento (Figura 12) se observó en que en T1, T2 y T3 las bases presentaban en promedio valores más altos, siendo esta diferencia significativa solamente entre puntas y bases de T2. Mientras que en la condición de mayor estrés hídrico, o sea T4, no se registraron diferencias significativas entre las concentraciones de puntas con bases, siendo prácticamente idénticos los valores obtenidos.

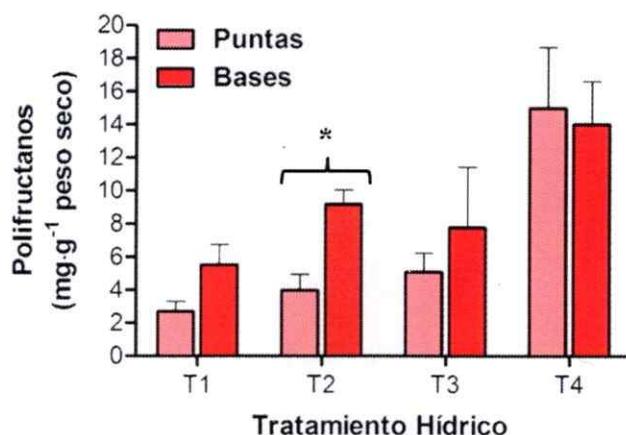


Figura 12: Cantidades de Polifruktanos de puntas y bases de hojas de Aloe vera sometidos a diferentes tratamientos hídricos. Cada columna representa un valor promedio de 3 muestras biológicas y 2 réplicas técnicas con su respectiva barra de error correspondiente a la desviación estándar. Los asteriscos indican una diferencia significativa entre puntas y bases de un mismo tratamiento, analizado por Test de Bonferroni (*: $P < 0,05$).

3.4 Purificación de Fructanos.

Para los ensayos de cromatografía de capa fina (TLC) y de GC-MS se tuvo que purificar previamente los extractos de oligofruktanos y de polifruktanos obtenidos. Para ello se emplearon columnas con resinas de intercambio iónico (como se ha detallado en la sección 2.5 de Materiales y Métodos) con el objetivo de remover cualquier compuesto cargado, como son los pigmentos, que podrían interferir con los experimentos posteriores. De esta forma se rescató solamente a los azúcares neutros al cabo de la purificación.

Las fracciones de oligofruktanos y polifruktanos recolectadas ya purificadas desde las columnas de intercambio iónico fueron cuantificadas mediante la solución de antrona modificada para cetosas (mencionado en la sección 2.4.2). Los resultados de las concentraciones de las fracciones recolectadas fueron graficados, pero no se encontró

ninguna relación entre las curvas de elución de las muestras con el respectivo tratamiento hídrico del cual provenían. Tampoco se observó una relación entre lo obtenido en las puntas con lo visto en las bases para un mismo tratamiento hídrico. A continuación, en la figura 13 se muestran las curvas de elución obtenidas a partir de los extractos de polifruktanos.

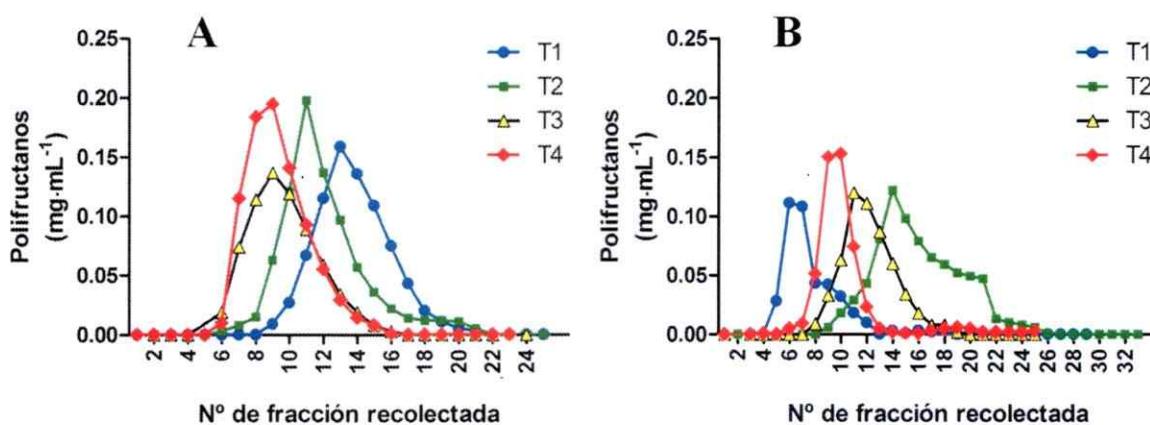


Figura 13: Perfil de elución de los extractos de Polifruktanos de plantas sometidas a distintos tratamientos hídricos. A) Fracciones de extracto de Polifruktanos de las puntas de hojas. B) Fracciones extracto de Polifruktanos de las bases de hojas. Cada curva de elución representa un evento de purificación independiente.

Las formas de curvas de elución como también la fracción recolectada en la cual se rescató la mayor concentración de carbohidratos no eran las mismas entre las puntas y las bases de un mismo tratamiento hídrico. Resultados similares se obtuvieron para las fracciones purificadas de los extractos de los oligofruktanos (resultados no mostrados).

3.5. Análisis Cualitativo de la composición de Fructanos por TLC.

3.5.1. TLC de Oligofruktanos de Puntas.

En la Figura 14 se presentan los resultados de la cromatografía de capa fina (TLC) de las muestras de oligofruktanos, ya purificados, provenientes desde las puntas de las

hojas de Aloe vera de T1 a T4. Se encontró que la banda correspondiente a la sacarosa era bastante intensa y constante en las cuatro condiciones vistas, mientras que la banda asociada a la fructosa de mayor color fue en T3. Se detectaron bandas de mayor intensidad en la coloración y de mayor GP en T4 que fueron vistas muy tenuemente en los otros tratamientos. En luz UV sí se encontraron algunas bandas de mayor GP en T1 a T3, pero la intensidad de estas bandas era mucho menor a lo visto en T4. Se detectó la presencia de trisacáridos de tipo 1-cestosa principalmente y en menor intensidad a neo-cestosa en las cuatro muestras de Aloe vera.

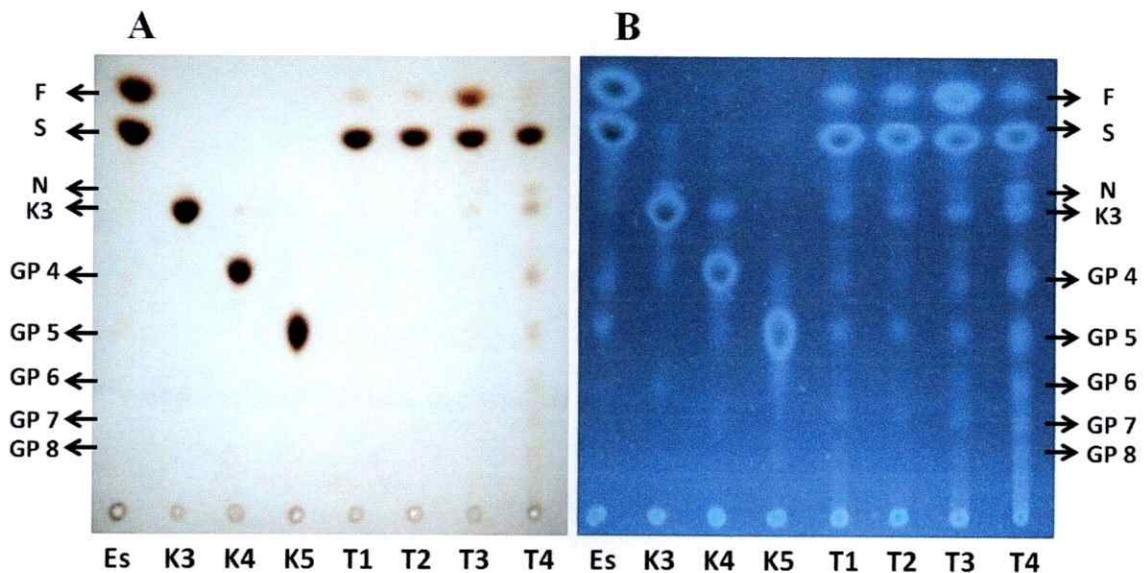


Figura 14: TLC de Oligofructanos de las puntas de hojas de Aloe vera sometidos a distintos tratamientos de riego. A) Oligofructanos observados en la placa de sílica gel bajo luz blanca. **B)** Oligofructanos observados en la placa de sílica gel bajo luz ultravioleta (366 nm). Es: estándares de fructosa (F) y sacarosa (S). K3, K4, K5: estándares de la serie inulina. K3 es la 1-cestosa (trisacárido), K4: tetrasacárido, K5: pentasacárido. GP: grado de polimerización de los oligofructanos de las hojas de Aloe vera. N: neo-cestosa, trisacárido de los neofructanos.

3.5.2. TLC de Oligofruktanos de Bases.

La figura 15 muestra el TLC realizado para las muestra de oligofruktanos purificados de las bases de las hojas de Aloe vera. En 15A, que fue tomada bajo luz blanca, se observan bandas de mayor GP en T2 y en T4, siendo en esta última las bandas de una coloración más intensa. Las bandas de fructosa fueron similares en T1,T2 y T4, salvo en T3 donde fue menos intensa la banda. Lo contrario se observó para la sacarosa, en donde la banda más intensa se registró para T3 y en las otras tres condiciones se mantuvo similar y de menor tamaño. De forma similar a las puntas, en las bases también se detectó 1-cestosa y en menor intensidad neo-cestosa en las cuatro condiciones de riego que fueron sometidas las plantas.

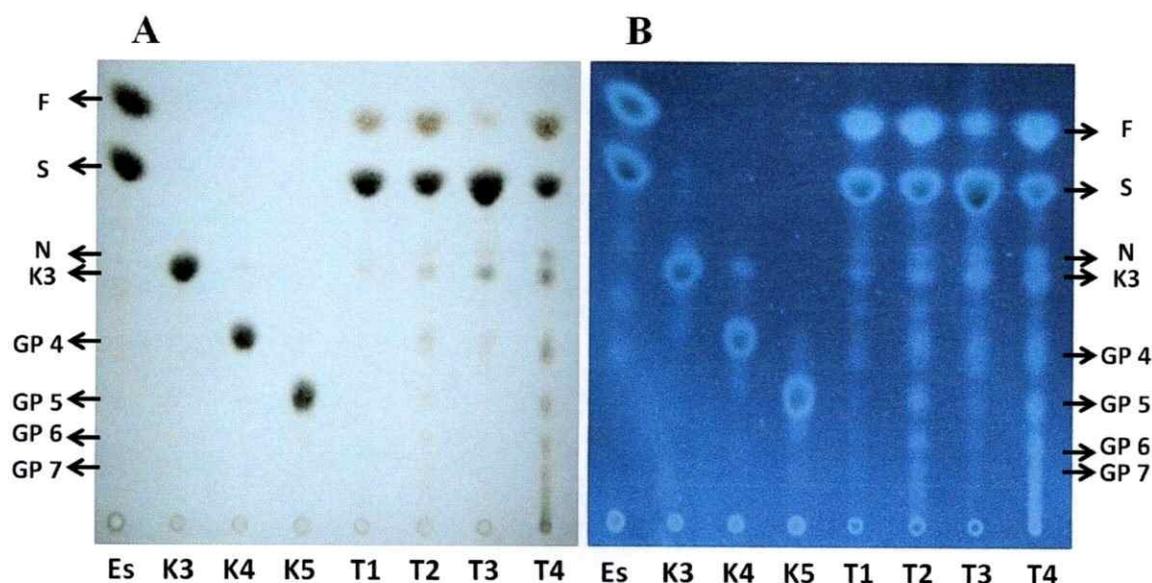


Figura 15: TLC de Oligofruktanos de las bases de hojas de Aloe vera sometidos a distintos tratamientos de riego. A) Oligofruktanos observados en la placa de sílica gel bajo luz blanca. B) Oligofruktanos observados en la placa de sílica gel bajo luz ultravioleta (366 nm). Es: estándares de fructosa (F) y sacarosa (S). K3, K4, K5: estándares de la serie inulina. K3 es la 1-cestosa (trisacárido), K4: tetrasacárido, K5: pentasacárido. GP: grado de polimerización de los oligofruktanos de las hojas de Aloe vera. N: neo-cestosa, trisacárido de los neofruktanos.

3.5.3. Estimación de la cantidad de Oligofruktanos por análisis de la placa cromatográfica de TLC.

Los análisis de TLC permitieron estimar la cantidad de fructosa y sacarosa presentes en las muestras y por lo tanto, estimar específicamente la cantidad de oligofruktanos a partir del trisacárido hasta fructanos de mayor GP. La tabla 1 muestra la cantidad de oligofruktanos estimada.

La tabla 1 muestra que la cantidad de oligofruktanos tiende a aumentar con el estrés hídrico, siendo T4 el tratamiento donde se acumuló la mayor cantidad de fructanos llegando a un 42,9% en las puntas y un 43.5% en las bases. La cantidad de oligofruktanos disminuye en T3, ya que la fructosa en las puntas aumentó considerablemente en este tratamiento desde 0.36 μg a 4.07 μg de fructosa, 10.7 veces más de fructosa que en T2. En las bases en cambio, en T3 hay un aumento notorio de sacarosa por sobre los demás azúcares como la fructosa y oligofruktanos.

Tabla 1: Cuantificación de Oligofruktanos de puntas y bases de hojas de Aloe vera sometidas distintos tratamientos hídricos a partir de la placa cromatográfica (TLC).

Muestra	Tratamiento	Fructosa (μg)	Sacarosa (μg)	Fructanos (μg)	% Fructosa + Sacarosa	% Fructanos
Punta	T1	0,59	9,22	2,19	81,7	18,3
	T2	0,36	7,81	3,83	68,1	31,9
	T3	4,07	7,59	0,33	97,2	2,8
	T4	0,38	6,47	5,15	57,1	42,9
Base	T1	1,81	7,14	3,05	74,6	25,4
	T2	2,39	6,03	3,58	70,2	29,8
	T3	0,38	10,56	1,06	91,1	8,9
	T4	2,33	4,45	5,22	56,5	43,5

3.5.4. TLC de Polifruktanos de Puntas.

En la Figura 16 se muestran los resultados de TLC para las muestras purificadas de polifruktanos de puntas de hojas. Se observa que en T3 y T4 hay una mayor cantidad

de bandas de un GP mayor que no se ven en T1 y T2. La presencia de sacarosa en todas las muestras es bastante prominente, disminuyendo la intensidad de las bandas correspondientes en T3 y T4. También se detectó la presencia de trisacáridos de tipo 1-cestosa y neo-cestosa en todas las muestras analizadas.

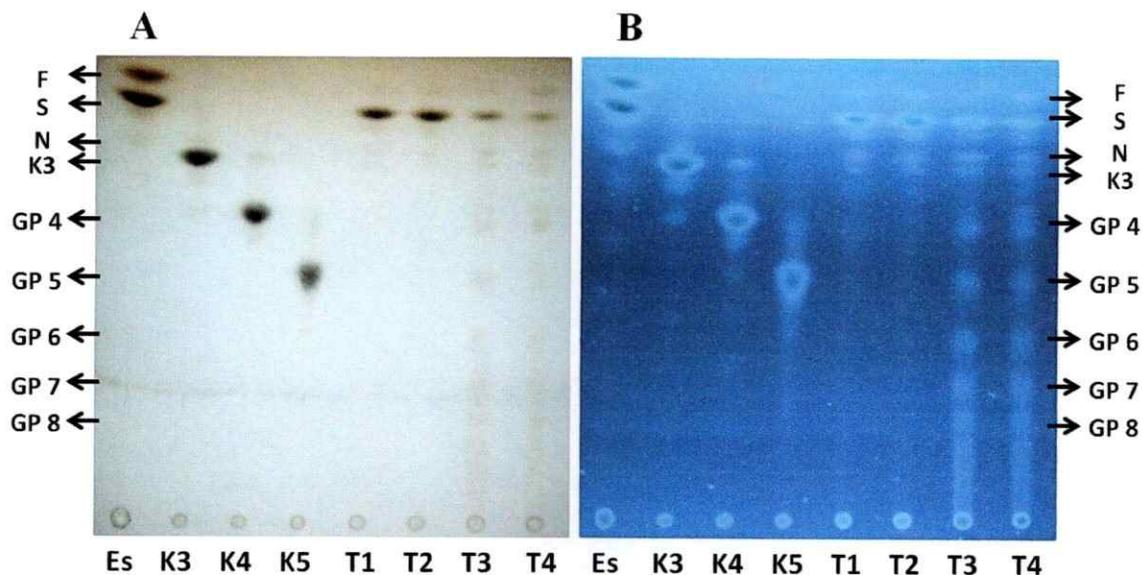


Figura 16: TLC de Polifruktanos de las puntas de hojas de Aloe vera sometidos a distintos tratamientos de riego. A) Polifruktanos observados en la placa de sílica gel bajo luz blanca. B) Polifruktanos observados en la placa de sílica gel bajo luz ultravioleta (366 nm). Es: estándares de fructosa (F) y sacarosa (S). K3, K4, K5: estándares de la serie inulina. K3 es la 1-cestosa (trisacárido), K4: tetrasacárido, K5: pentasacárido. GP: grado de polimerización de los polifruktanos de las hojas de Aloe vera. N: neo-cestosa, trisacárido de los neofruktanos.

3.5.5. TLC de Polifruktanos de Bases.

En la Figura 17 se muestran los resultados del TLC de las muestras de polifruktanos de las bases de las hojas de Aloe vera sometidas a los distintos tratamientos. Se detectó un patrón de bandas similares a lo visto para las puntas (Figura 16). En T3 y T4 se encontró una mayor cantidad de bandas con un GP mayor, que no estaban presentes en T1 ni T2. Las bandas correspondientes a sacarosa eran bastante

visibles en las cuatro condiciones de riego sin grandes variaciones, mientras que la señal de fructosa resultó ser más intensa en T1 en comparación con las otras muestras. En las 4 condiciones de riego se detectaron sólo trisacáridos de tipo 1-cestosa y neo-cestosa.

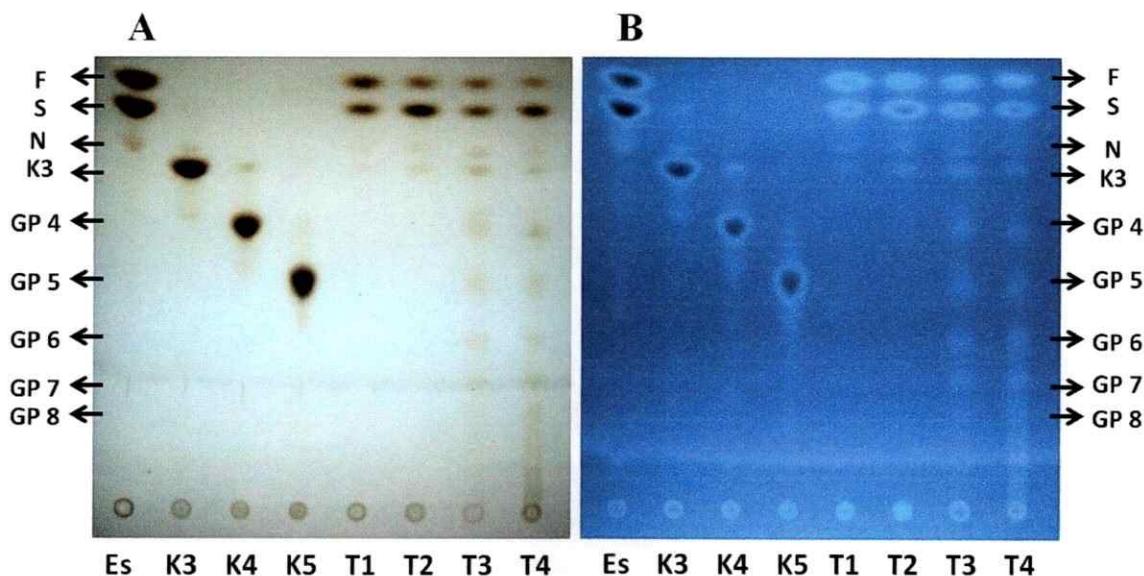


Figura 17: TLC de Polifruktanos de las bases de hojas de Aloe vera sometidos a distintos tratamientos de riego. A) Polifruktanos observados en la placa de sílica gel bajo luz blanca. B) Polifruktanos observados en la placa de sílica gel bajo luz ultravioleta (366 nm). Es: estándares de fructosa (F) y sacarosa (S). K3, K4, K5: estándares de la serie inulina. K3 es la 1-cestosa (trisacárido), K4: tetrasacárido, K5: pentasacárido. GP: grado de polimerización de los polifruktanos de las hojas de Aloe vera. N: neo-cestosa, trisacárido de los neofruktanos.

3.5.6. Estimación de la cantidad de Polifruktanos por análisis de la placa cromatográfica de TLC.

Tal como en el caso de los oligofruktanos, el análisis de TLC permitió estimar la cantidad de fructanos presentes en los extractos de polifruktanos de la hoja de Aloe vera a partir del trisacárido hasta mayores GP (Tabla 2). La mayor cantidad de polifruktanos encontrados fue en T4, en el caso de las puntas con un 95%. Para las bases, la mayor

cantidad de fructanos encontrados fue en T3 con 56.2 % del total de la muestra cargada en la placa.

Tabla 2: Cuantificación de Polifruktanos de puntas y bases de hojas de Aloe vera sometidas distintos tratamientos hídricos a partir de la placa cromatográfica (TLC).

Muestra	Tratamiento	Fructosa (µg)	Sacarosa (µg)	Fructanos (µg)	% Fructosa + Sacarosa	% Fructanos
Punta	T1	0,10	5,05	6,85	42,9	57,1
	T2	0,04	4,19	7,78	35,2	64,8
	T3	0,33	2,23	9,45	21,3	78,7
	T4	0,05	0,57	11,38	5,1	94,9
Base	T1	4,94	5,28	1,78	85,2	14,8
	T2	2,37	8,38	1,25	89,6	10,4
	T3	1,79	3,47	6,74	43,8	56,2
	T4	1,10	5,02	5,88	51,0	49,0

3.6. Análisis de los Alditol Acetatos derivados de los Fructanos.

3.6.1. Análisis por GC-MS de los Alditol Acetatos derivados de los Oligofruktanos.

En la Figura 19 se presentan dos cromatogramas del análisis de los alditol acetato de cromatografía de gases para determinar la composición de azúcar de los fructanos. En todas las muestras se pudo identificar un pico correspondiente a la manosa con un tiempo de retención (t_R) de 13,753 min, seguido de un pico de glucosa de t_R de 14,900 min. El área del pico de glucosa fue 3,66 veces mayor que el de la manosa en las puntas y 4,48 veces mayor en las bases. La fructosa que constituye gran parte de los fructanos, en el proceso de derivatización se tautomeriza en manosa y en glucosa, razón por la cual aparecen solamente estos dos azúcares en el cromatograma. Al revisar las señales de cada pico por espectrometría de masa (MS), ambos generan los siguientes fragmentos ionizados en m/z 73, 103, 115 (registrándose como la señal de mayor intensidad), 128,

139, 145, 187, 217, 259, 289 y 361 que son característicos de los alditol acetato de las hexopiranosas (manitol en la caso de manosa y sorbitol en el caso de glucosa), pero la diferencia en los t_R en la columna es lo que permite distinguir finalmente a la manosa de la glucosa. El último pico registrado en los cromatogramas corresponde al inositol que se adicionó a las muestras, presentó un t_R de 15,670 min. El inositol se usó como un estándar interno debido a que no es degradado durante el proceso de derivatización, lo que permitió cuantificar las cantidades de manosa y glucosa presentes en las muestras de fructanos respecto al inositol. Los fragmentos ionizados generados a partir del inositol detectados por MS son en m/z 103, 109, 115, 126, 157, 168, 199, 210, siendo la señal en m/z 168 de mayor intensidad.

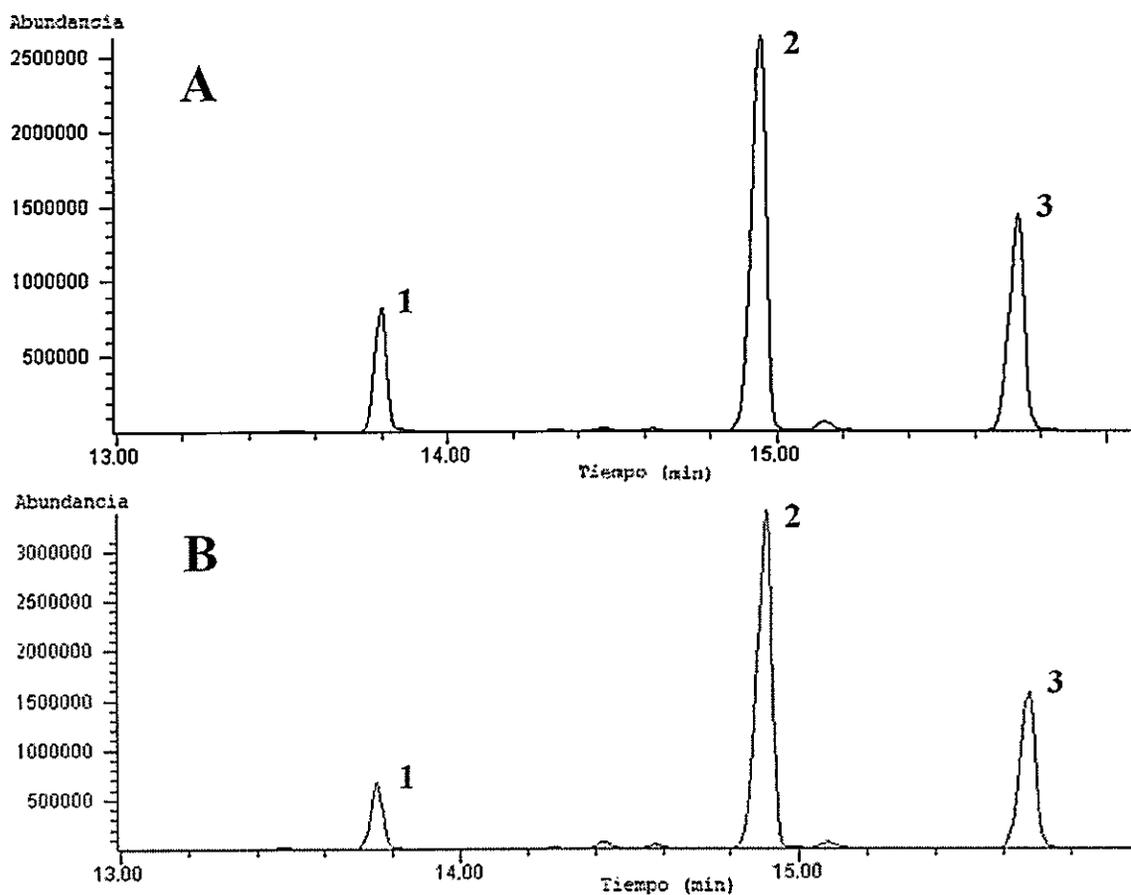


Figura 18: Análisis de cromatografía de gases de los Oligofruktanos purificados de puntas y bases de hojas de Aloe vera, derivatizados a alditol acetatos. A) Cromatograma de los alditol acetatos derivados de los oligofruktanos de punta de hoja de Aloe vera. B) Cromatograma de los alditol acetatos derivados de los oligofruktanos de base de hoja de Aloe vera. 1: Identifica a la manosa. 2: Identifica a la glucosa. 3: Corresponde al inositol, que es el estándar interno.

A partir de los resultados obtenidos desde los cromatogramas de las muestras derivatizadas se pudo cuantificar los fructanos de las muestras purificadas. La Tabla 3 presenta los resultados cuantitativos de manosa y glucosa y la cuantificación deducida de fructanos totales a partir de la manosa y glucosa, presentes en puntas y bases de hojas de Aloe vera sometidos a distintos tratamientos hídricos.

Tabla 3: Composición y cuantificación de Oligofruktanos purificados de hojas de Aloe vera sometidos a distintas condiciones hídricas. Se muestran las cantidades de manosa, glucosa y de fructanos totales obtenidos a partir de la cuantificación de manosa y glucosa. Cada cifra es el promedio de tres réplicas con su respectiva desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey, $P < 0,05$). PT1 a PT4: corresponde a las puntas del tratamiento de riego respectivo. BT1 a BT4: corresponden a las bases del tratamiento de riego respectivo.

Muestra	Manosa (mg/ g peso seco)		Glucosa (mg/ g peso seco)		Total Oligofruktanos (mg/ g peso seco)	
PT1	1,55 ± 0,05	a	5,60 ± 0,29	a	7,15 ± 0,34	a
PT2	1,78 ± 0,07	b	6,56 ± 0,26	b	8,34 ± 0,32	b
PT3	0,69 ± 0,03	c	6,78 ± 0,47	b	7,47 ± 0,50	a,b
PT4	4,20 ± 0,10	d	12,76 ± 0,30	c	16,96 ± 0,40	c
BT1	3,86 ± 0,11	a	25,48 ± 1,00	a	30,63 ± 2,97	a
BT2	6,33 ± 0,08	b	39,71 ± 1,18	b	48,16 ± 4,45	b
BT3	4,98 ± 0,10	c	20,31 ± 0,41	c	27,04 ± 3,21	a
BT4	8,92 ± 0,05	d	41,87 ± 0,91	b	53,79 ± 5,72	b

Los resultados de la Tabla 3 indican que a mayor déficit hídrico aumenta significativamente la cantidad de los oligofruktanos en las hojas, tanto en las puntas como en las bases, siendo la cantidad presente en las muestras PT2 y PT4 de 1,17 y 2,37 veces mayor, respectivamente, que la presente en las muestras de PT1. En las bases los oligofruktanos es de 1,57 y 1,76 veces mayor en BT2 y BT4, respectivamente, a la cantidad presente en BT1.

3.6.2. Análisis por GC-MS de los Alditol Acetatos derivados de los Polifruktanos.

Los cromatogramas de las muestras de polifruktanos mantuvieron proporciones similares a lo detectado en los oligofruktanos entre las señales de manosa y glucosa. En las puntas de las hojas hubo una diferencia de 3,43 veces entre manosa y glucosa, mientras que en las bases esta diferencia fue de 5,05 veces entre los azúcares. A su vez

los tiempos de retención de los alditol acetatos (manitol, sorbitol e inositol) se conservaron (datos no mostrados). En la Tabla 4 se muestran los resultados de la cuantificación de manosa, glucosa y deducidos para los polifruktanos totales a partir de manosa y glucosa en puntas y bases de hojas de Aloe vera bajo las condiciones hídricas ya establecidas.

Tabla 4: Composición y cuantificación de Polifruktanos purificados de hojas de Aloe vera sometidos a distintas condiciones hídricas. Se muestran las cantidades de manosa, glucosa y de fructanos totales deducidos de las cantidades de manosa y glucosa obtenidas. Cada cifra es el promedio de tres replicas con su respectiva desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey, $P < 0,05$). PT1 a PT4: corresponde a las puntas del tratamiento de riego respectivo. BT1 a BT4: corresponden a las bases del tratamiento de riego respectivo.

Muestra	Manosa (mg/ g peso seco)		Glucosa (mg/ g peso seco)		Total Polifruktanos (mg/ g peso seco)	
PT1	0,79 ± 0,02	a	3,01 ± 0,08	a	3,81 ± 0,10	a
PT2	1,25 ± 0,09	b	4,84 ± 0,47	b	6,10 ± 0,56	b
PT3	1,55 ± 0,10	b	4,43 ± 0,16	b	5,98 ± 0,24	b
PT4	4,71 ± 0,23	c	11,38 ± 0,35	c	16,09 ± 0,57	c
BT1	1,74 ± 0,07	a	9,18 ± 0,32	a	10,92 ± 0,38	a
BT2	1,21 ± 0,01	b	7,67 ± 0,12	b	8,87 ± 0,14	b
BT3	3,74 ± 0,22	c	11,06 ± 0,61	c	14,80 ± 0,83	c
BT4	4,75 ± 0,10	d	20,97 ± 0,33	d	25,72 ± 0,42	d

En la Tabla 4 se ve que al igual que los oligofruktanos (tabla 3), los polifruktanos incrementaron de forma significativa en condiciones de mayor estrés hídrico (particularmente en T4). En las puntas de las hojas de T2 y T3 se encontró 1,60 y 1,57 veces, respectivamente, más polifruktanos que en las puntas de T1. En T4 fue de 4,22

veces mayor con respecto a T1. En las bases se observó que en las plantas T3 hay 1,36 veces más polifruktanos que en T1, y en T4 había 2,36 veces más que en T1.

3.7. Determinación de los enlaces glicosídicos de fruktanos mediante el análisis de los PMAA por GC-MS.

Para determinar la composición de los enlaces glicosídicos presentes en las muestras de fruktanos de las hojas de Aloe vera, se metilaron las muestras previo a los pasos de derivatización de los carbohidratos. De esta forma se generaron alditol acetatos parcialmente metilados (PMAA), específicamente per-*O*-metilados, que luego fueron analizados por cromatografía de gases asociada con espectrometría de masas.

3.7.1. Enlaces glicosídicos de los Oligofruktanos.

En la Figura 19 se muestran los cromatogramas de las muestras de oligofruktanos de puntas de hojas de Aloe vera de T1 (Figura 19A) y de T4 (Figura 19B). En ambos cromatogramas se detectaron siete señales correspondientes a los PMAA provenientes de fruktanos. Los picos registrados en los cromatogramas están detallados en la Tabla 5.

Tabla 5: Identificación de Alditol Acetatos parcialmente metilados derivatizados de Fructanos provenientes de hojas de plantas de *Aloe barbadensis* Miller. ^a: Los números corresponden al orden de elución e identifican las señales de los cromatogramas de las Figuras 20 a 23. ^b: Tiempo de retención (minutos) en la columna.

Pico ^a	t _R ^b	Compuesto	Tipo de Enlace
1	11,730	2,5-di- <i>O</i> -acetil-(2-deuterio)-1,3,4,6-tetra- <i>O</i> -metil-D-manitol	Fructosa terminal
2	11,797	2,5-di- <i>O</i> -acetil-(2-deuterio)-1,3,4,6-tetra- <i>O</i> -metil-D-sorbitol	Fructosa terminal
3	12,905	1,5-di- <i>O</i> -acetil-(1-deuterio)-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -metil-D-sorbitol	Glucosa terminal
4	15,600	1,2,5-tri- <i>O</i> -acetil-(2-deuterio)-3,4,6-metil-tri- <i>O</i> -metil-D-manitol y 2,5,6-tri- <i>O</i> -acetil-(2-deuterio)-1,3,4-tri- <i>O</i> -metil-D-hexitol	1-fructosa y 6-fructosa
5	15,720	1,2,5-tri- <i>O</i> -acetil-(2-deuterio)-3,4,6-metil-tri- <i>O</i> -metil-D-sorbitol	1-fructosa
6	16,602	1,5,6-tri- <i>O</i> -acetil-(1-deuterio)-2,3,4-tri- <i>O</i> -metil-D-sorbitol	6-glucosa
7	20,220	1,2,5,6-tetra- <i>O</i> -acetil-(2-deuterio)-3,4-di- <i>O</i> -metil-D-hexitol	1,6-fructosa ramificada

Los tipos de enlaces en la Tabla 5 demuestran la presencia de la fructofuranosa terminal de la cadena del fructano señalado como fructosa terminal, a su vez la glucosa terminal corresponde a la glucopiranososa del extremo inicial de la cadena del fructano unido a una fructofuranosa mediante un enlace glicosídico desde el C1 de la glucosa. La 1-fructosa señala la presencia de enlaces de tipo β -(2→1) entre fructofuranosas, mientras que 6-fructosa representa los enlaces de tipo β -(2→6) entre fructofuranosas. Posteriormente aparece la 6-glucosa correspondiente a la glucopiranososa interna con enlaces en sus C1 y 6 con fructofuranosas, característico de los neo-fructanos. Finalmente aparece la 1,6-fructosa ramificada que indica la presencia de fructofuranosas enlaces de tipo β -(2→1) y a la vez β -(2→6), esta fructosa posee doble enlaces generando una estructura ramificada en el fructano. Los enlaces encontrados en este trabajo fueron comparados con la literatura sobre PMAA de fructanos (Carpita y Shea 1989, Mancilla-Margalli y López 2006).

Los resultados de la Figura 19 muestran que en puntas de hojas de plantas T4, se encontró mayor cantidad de 1-fructosa, 6-fructosa, 6-glucosa y 1,6-fructosa ramificada, lo que demuestra un incremento en oligofruktanos con estos tipos de enlaces en su estructura. También se registró en los cromatogramas un incremento de la fructosa terminal.

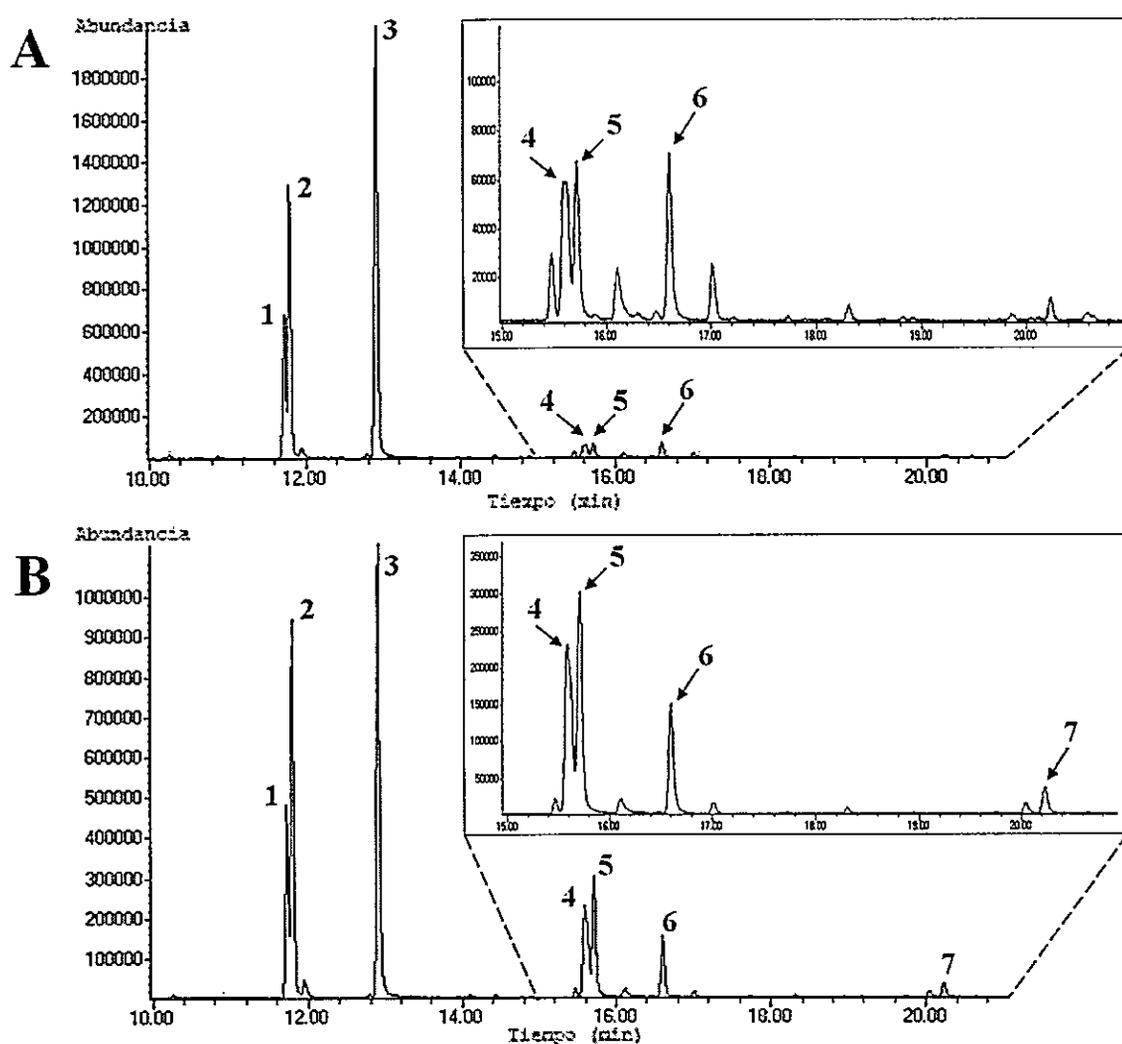


Figura 19: Perfil cromatográfico de los alditol acetatos parcialmente metilados (PMAA) de los Oligofruktanos de puntas de hojas de plantas de Aloe vera sometidos a distintas condiciones de riego. A) Cromatograma de los PMAA de oligofruktanos de puntas de hojas de Aloe vera de T1 (OPT1). B) Cromatograma de los PMAA de los oligofruktanos de puntas de hojas de Aloe vera de T4 (OPT4). 1 y 2: fructosa terminal, 3: glucosa terminal, 4: 1-fructosa y 6-fructosa, 5: 1-fructosa, 6: 6-glucosa y 7: 1,6-fructosa ramificada. En el recuadro se muestra la región del cromatograma correspondiente amplificado, señalizando el rango de tiempo de retención mediante las líneas punteadas.

En los perfiles cromatográficos de oligofruktanos obtenidos de las muestras de bases de hojas de plantas de Aloe vera (Figura 20) se encontraron resultados similares a los vistos para las puntas. A mayor estrés hídrico, se detectaron mayor cantidad de 1-fructosa, 6-fructosa, 6-glucosa y 1,6-fructosa ramificada.

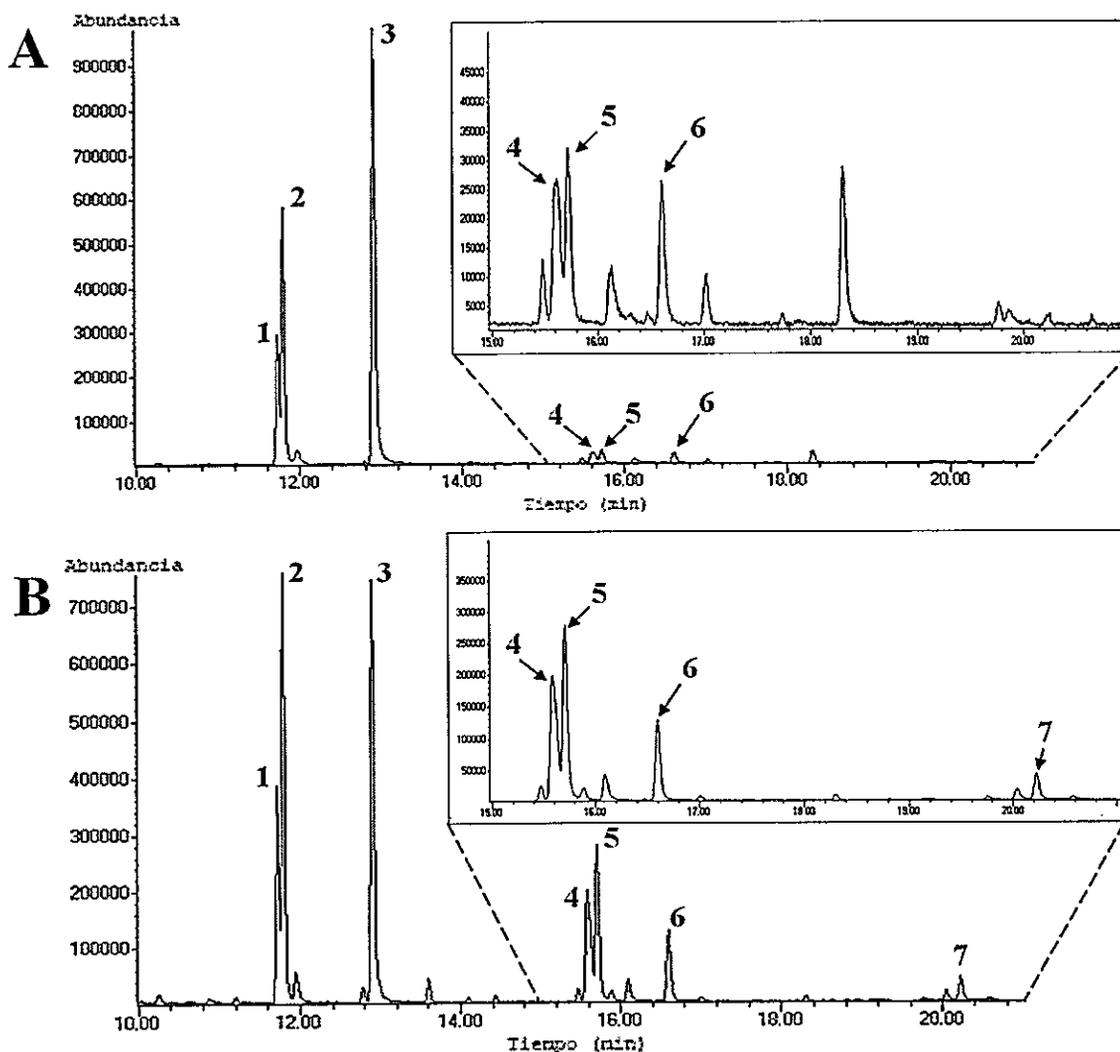


Figura 20: Perfil cromatográfico de los alditol acetatos parcialmente metilados (PMAA) de los Oligofruktanos de las bases de hojas de plantas de Aloe vera sometidas a distintas condiciones de riego. A) Cromatograma de los PMAA de oligofruktanos de las bases de hojas de Aloe vera de T1 (OBT1). B) Cromatograma de los PMAA de los oligofruktanos de las bases de hojas de Aloe vera de T4 (OBT4). 1 y 2: fructosa terminal, 3: glucosa terminal, 4: 1-fructosa y 6-fructosa, 5: 1-fructosa, 6: 6-glucosa y 7: 1,6-fructosa ramificada. En el recuadro se muestra la región del cromatograma correspondiente amplificado, señalizando el rango de tiempo de retención mediante las líneas punteadas.

Los resultados obtenidos por el análisis de los PMAA de los oligofruktanos por GC-MS se resumen en la Tabla 6, mostrándose el porcentaje molar de los enlaces glicosídicos que se encontraron en las muestras de puntas y bases de hojas respectivamente.

Tabla 6: Composición de los enlaces glicosídicos (% molar) de Oligofruktanos presentes en las puntas y bases de hojas de Aloe vera tratados con diferentes riegos. OPT1 a OPT4: corresponde a los oligofruktanos de puntas del respectivo tratamiento hídrico. OBT1 a OBT4: son los oligofruktanos de las bases del respectivo tratamiento hídrico. ¹: Corresponde por lo menos a un 60% del total de iones obtenidos por GC-MS, los demás no se consideraron al no ser carbohidratos. nd: no detectado en la muestra.

Tipos de Enlaces	Tratamiento Hídrico (% molar)							
	OPT1	OPT2	OPT3	OPT4	OBT1	OBT2	OBT3	OBT4
Fructosa terminal	37,97	42,23	40,96	30,88	43,15	32,14	37,21	37,81
Glucosa terminal	55,47	51,92	49,08	37,62	51,16	49,94	55,32	29,04
1-Fructosa	3,52	3,07	6,26	17,61	2,72	11,53	4,30	19,28
6-Fructosa	0,82	1,08	1,52	6,40	1,32	2,30	1,30	6,00
6-Glucosa	2,21	1,70	2,19	5,96	1,65	4,09	1,87	5,87
1,6- Fructosa ramificada	nd	nd	nd	1,53	nd	nd	nd	2,01
Total (%) ¹	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

A partir de los resultados presentados de la Tabla 6 se puede observar que a medida que las plantas eran sometidas a condiciones de menor riego, como en T3 y T4, la composición de enlaces presentes en los oligofruktanos cambia. Específicamente aumentaron los % molares de 1-fructosa, 6-fructosa, 6-glucosa y 1,6-fructosa. Cabe mencionar que la 1,6-fructosa ramificada se detectó sólo en T4, tanto para las muestras de puntas y bases. En cambio, el % molar de glucosa y fructosa terminal disminuyen en T4 respecto a T1. En las bases de las hojas se incrementó el % molar de los mismos

enlaces que en las puntas, es decir, de la 1-fructosa, 6-fructosa, 6-glucosa y de la 1,6 fructosa, disminuyendo el % molar de la fructosa y glucosa terminal con el aumento de déficit hídrico.

La Tabla 7 presenta las proporciones entre distintos tipos de enlaces presentes en los oligofruktanos analizados y el grado de polimerización (GP) estimado. Para ello se tuvo en cuenta que cada molécula de fructano cuenta con una sola unidad de glucosa en su estructura, se determinó el GP a partir de la proporción entre la fructosa y glucosa (fructosa total/glucosa total). Como la proporción fructosa total/glucosa total nos indica cuantas unidades de fructosa hay aproximadamente por cada unidad glucosa, para tener el GP total del fructano se tiene que sumar la unidad inicial de glucosa (equivalente a la suma de los % molares de glucosa terminal y 6-glucosa) a las unidades de fructosa. Se sumó +1 a la proporción de fructosa total/glucosa total, obteniéndose el GP aproximado de la muestra de fructano.

Tabla 7: Proporciones entre distintos tipos de enlaces y GP de Oligofruktanos de puntas y bases de hojas de Aloe vera de distintos tratamientos hídricos. Lineal: Es la suma de la fructosa terminal, glucosa terminal, 1-fructosa y 6-fructosa. Ramificado: Es la suma de la 6-glucosa y 1,6-fructosa ramificada. OPT1 a OPT4: corresponde a los oligofruktanos de puntas del respectivo tratamiento hídrico. OBT1 a OBT4: son los oligofruktanos de las bases del respectivo tratamiento hídrico.

Proporción entre enlaces	Tratamiento Hídrico							
	OPT1	OPT2	OPT3	OPT4	OBT1	OBT2	OBT3	OBT4
Lineal / Ramificado	21,73	22,50	11,80	7,77	23,27	10,86	16,83	4,34
Glucosa terminal / 6-Glucosa	33,53	17,85	9,66	5,23	42,30	7,29	9,73	3,05
Fructosa total/ Glucosa Total	1,62	1,21	1,82	1,92	1,80	2,03	1,94	2,24
GP	2,62	2,21	2,82	2,92	2,80	3,03	2,94	3,24

A partir de la tabla anterior se observó, que tanto para oligofruktanos de puntas como de las bases, las proporciones entre los enlaces de tipo lineal con respecto a los ramificados disminuyen con el déficit hídrico. Algo similar se observó en la razón entre glucosa terminal con 6-glucosa, siendo en OPT4 y OBT4 donde estas proporciones fueron las más bajas indicando que la 6-glucosa aumenta. A su vez se encontró que la relación de fructosa por cada glucosa presente en las muestras se incrementaba levemente en T4 con respecto a T1, indicando un aumento en el GP de los oligofruktanos en T4. Cabe mencionar que para la tabla 7 se analizaron los resultados presentados en la tabla 6 más los resultados de plantas de Aloe vera cultivadas en nuestro laboratorio (resultados no mostrados). Para las plantas cultivadas en nuestro laboratorio, los enlaces glicosídicos obtenidos fueron similares al de las plantas provenientes del campo experimental.

3.7.2. Enlaces glicosídicos de los Polifruktanos.

Los cromatogramas del análisis de los PMAA obtenidos de las muestras de polifruktanos se presentan a continuación. En la Figura 21 se muestran los cromatogramas de los PMAA de los polifruktanos provenientes de las puntas de las hojas de *Aloe barbadensis* Miller en T1 (Figura 21A) y T4 (Figura 21B), a su vez en la Figura 22A y 22B muestran los cromatogramas para los PMAA de polifruktanos de las bases de las hojas de T1 y T4, respectivamente. Los resultados obtenidos para las muestras de polifruktanos fueron similares a los encontrados para los oligofruktanos, en el sentido que los tiempos de retención de las muestras se conservaron entre ambos grupos de fruktanos. Además en las muestras de los polifruktanos se detectaron los

mismos tipos de enlaces glicosídicos entre fructosas y glucosas que en las muestras de oligofructanos.

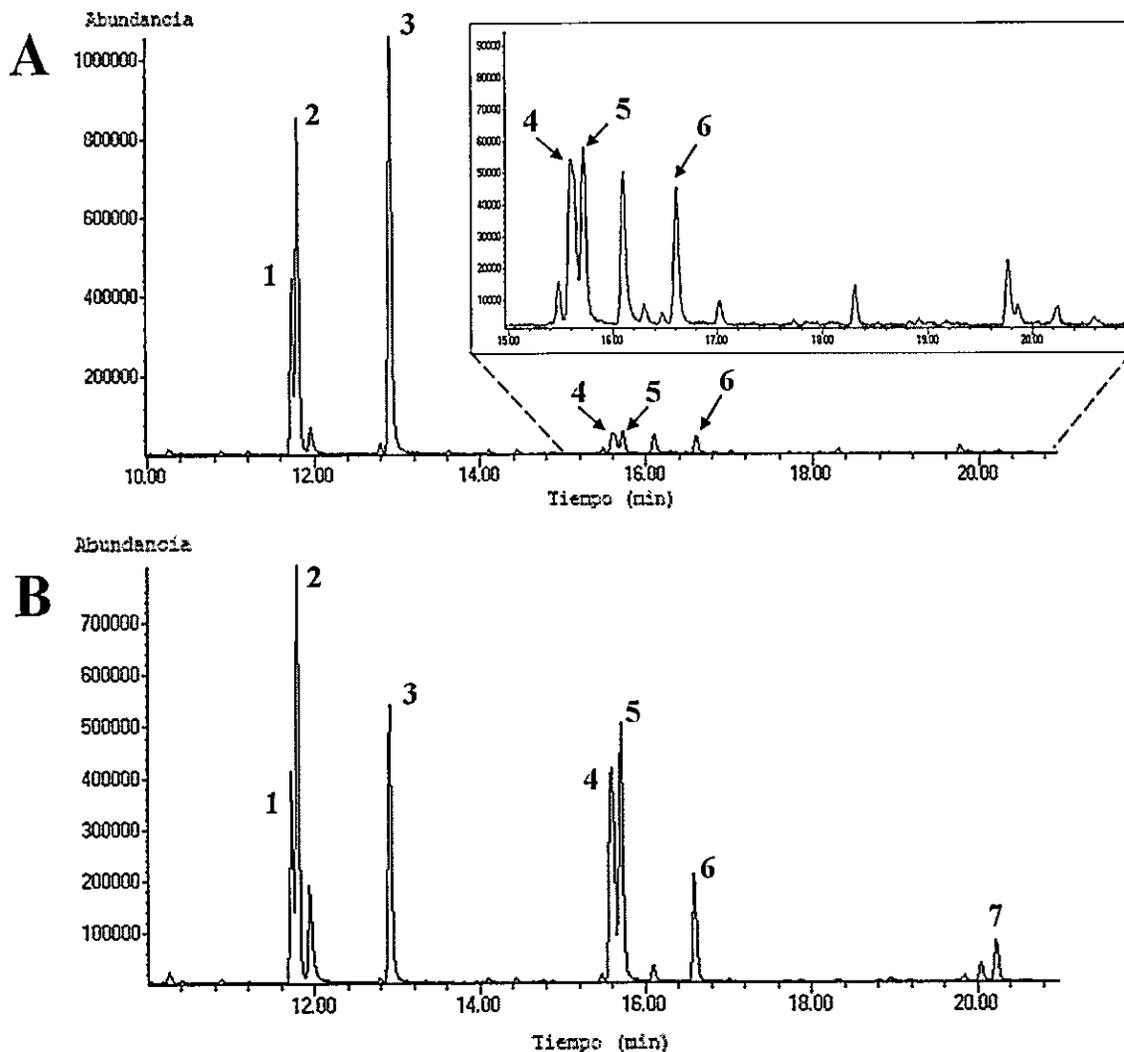


Figura 21: Perfil cromatográfico de los alditol acetatos parcialmente metilados (PMAA) de los Polifructanos de las puntas de hojas de plantas de Aloe vera sometidos a distintas condiciones de riego. **A)** Cromatograma de los PMAA de polifructanos de las puntas de hojas de Aloe vera de T1 (PPT1). **B)** Cromatograma de los PMAA de los polifructanos de las puntas de hojas de Aloe vera de T4 (PPT4). 1 y 2: fructosa terminal, 3: glucosa terminal, 4: 1-fructosa y 6-fructosa, 5: 1-fructosa, 6: 6-glucosa y 7: 1,6-fructosa ramificada. En el recuadro se muestra la región del cromatograma correspondiente amplificada, señalizando el rango de tiempo de retención mediante las líneas punteadas.

Los perfiles cromatográficos de los polifructanos de puntas y de las bases de hojas obtenidos fueron bastante similares. Se observó un aumento en la intensidad de las

señales correspondientes a 1-fructosa, 6-fructosa, 6-glucosa y 1,6-fructosa en T4 en relación a T1. En el caso particular de la 1,6-fructosa no se detectó este tipo de enlace en las muestras de puntas ni en las bases de las plantas de T1, pero sí se detectaron en condiciones de mayor estrés hídrico de T3 y T4 (Figura 22B y 23B, respectivamente para T4).

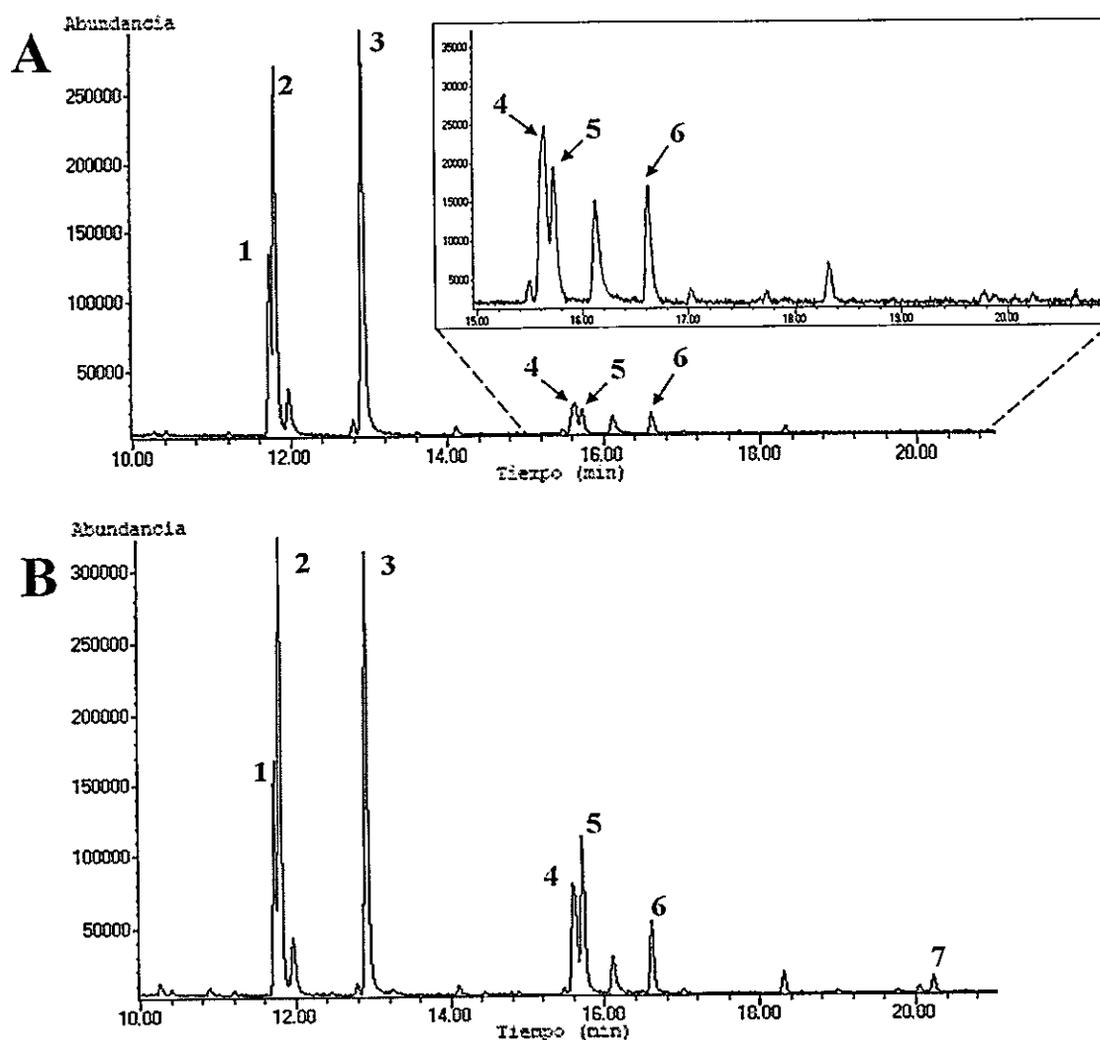


Figura 22: Perfil cromatográfico de los alditos acetatos parcialmente metilados (PMAA) de los Polifrutanos de las bases de hojas de plantas de Aloe vera sometidas a distintas condiciones de riego. A) Cromatograma de los PMAA de polifrutanos de las bases de hojas de Aloe vera de T1 (PBT1). B) Cromatograma de los PMAA de los polifrutanos de las bases de hojas de Aloe vera de T4 (PBT4). 1 y 2: fructosa terminal, 3: glucosa terminal, 4: 1-fructosa y 6-fructosa, 5: 1-fructosa, 6: 6-glucosa y 7: 1,6-fructosa ramificada. En el recuadro se muestra la región del cromatograma correspondiente amplificado, señalizando el rango de tiempo de retención mediante las líneas punteadas.

En la Tabla 8 se muestra la composición de los enlaces glicosídicos que están presentes en las muestras de polifruktanos de puntas y bases de hojas de plantas de Aloe vera sometidos a los distintos tratamientos de riego.

Tabla 8: Composición de los enlaces glicosídicos (% molar) de Polifruktanos de hojas de plantas de Aloe vera tratadas con diferentes riegos. PPT1 a PPT4: corresponde a los polifruktanos de puntas del respectivo tratamiento hídrico. PBT1 a PBT4: son los polifruktanos de las bases del respectivo tratamiento hídrico. ¹: Corresponde por lo menos a un 60% del total de iones obtenidos por GC-MS, los demás no se consideraron al no ser carbohidratos. nd: no detectado en la muestra analizada.

Tipos de Enlaces	Tratamiento Hídrico (% molar)							
	PPT1	PPT2	PPT3	PPT4	PBT1	PBT2	PBT3	PBT4
Fructosa terminal	47,83	54,67	46,00	28,32	50,45	-	34,05	41,28
Glucosa terminal	44,31	35,97	25,80	18,06	40,33	-	17,22	29,80
1-Fructosa	3,55	4,55	17,51	29,28	3,70	-	32,95	17,76
6-Fructosa	2,30	2,55	4,79	13,02	3,26	-	5,14	4,78
6-Glucosa	2,00	2,26	4,95	7,95	2,26	-	7,74	5,13
1,6- Fructosa ramificada	nd	nd	0,95	3,36	nd	-	2,89	1,26
Total (%)¹	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	-	100,00	100,00

La composición de los enlaces glicosídicos de los polifruktanos (Tabla 8) varía dependiendo del tratamiento hídrico al cual fue sujeto la planta. Se encontró que de forma similar a los oligofruktanos, la 1-fructosa, 6-fructosa, 6-glucosa y 1,6-fructosa en las puntas y bases de las hojas aumentan con el déficit hídrico. Fructosa y glucosa terminal en cambio disminuyen con el déficit hídrico. En el caso particular de las muestras de PBT2 no se obtuvieron sus perfiles cromatográficos de GC-MS.

En la Tabla 9 se muestran las proporciones entre distintos tipos de enlaces detectados en las muestras de polifruktanos y además un GP estimado de igual forma como se realizó para los oligofruktanos.

Tabla 9: Proporciones entre distintos tipos de enlaces y GP de Polifruktanos de puntas y bases de hojas de Aloe vera de distintos tratamientos hídricos. Lineal: Es la suma de la fructosa terminal, glucosa terminal, 1-fructosa y 6-fructosa. Ramificado: Es la suma de la 6-glucosa y 1,6-fructosa ramificada. PPT1 a PPT4: corresponde a los polifruktanos de puntas del respectivo tratamiento hídrico. PBT1 a PBT4: son los polifruktanos de las bases del respectivo tratamiento hídrico.

Proporción entre enlaces	Tratamiento Hídrico							
	PPT1	PPT2	PPT3	PPT4	PBT1	PBT2	PBT3	PBT4
Lineal / Ramificado	49,02	43,26	15,96	7,84	43,33	-	8,41	14,66
Glucosa terminal / 6-Glucosa	22,16	15,92	5,21	2,27	17,88	-	2,22	5,81
Fructosa total / Glucosa Total	1,16	1,62	2,25	2,84	1,35	-	3,01	1,86
GP	2,16	2,62	3,25	3,84	2,35	-	4,01	2,86

En las muestras de polifruktanos analizados se encontraron resultados similares a los observados previamente en oligofruktanos (Tabla 7). La proporción entre los enlaces lineales y ramificados, como la proporción entre glucosa terminal y 6-glucosa disminuyen con el déficit hídrico en las puntas y en las bases de las hojas. En cambio el GP de las muestras de polifruktanos tanto en puntas como en las bases de las hojas aumenta con el déficit hídrico y es mayor que en el caso de los oligofruktanos.

4. DISCUSIÓN

En este seminario de título se comprobó la hipótesis planteada “En las plantas de *Aloe barbadensis* Miller el estrés hídrico incrementa significativamente las concentraciones de carbohidratos y en particular de los fructanos, induciendo modificaciones en la estructura de los polímeros de fructano”. Los resultados efectivamente demostraron que los azúcares totales, azúcares solubles y fructanos (oligo y polifruktanos) aumentan con el estrés hídrico. Sin embargo, lo más importante es que las biomoléculas oligo y polifruktanos no sólo aumentan en cantidad y en grado de polimerización, sino que además aumenta específicamente un tipo de estructura que está menos presente en las plantas con mayor riego. La estructura de los fructanos cambia con la restricción hídrica desde una estructura lineal tipo inulina a una estructura ramificada tipo neo-fructano. Estos resultados son de gran importancia para la sobrevivencia de la planta ya que se ha determinado que los fructanos contribuyen al ajuste osmótico, pero además protegen las membranas celulares y proteínas de la falta de agua (Hoekstra y col. 2001, Vereyken y col. 2001, Vereyken y col. 2003, Valluru y Van den Ende 2008, Livingston III y col. 2009).

Los ambientes áridos y semiáridos como los desiertos que se encuentran en el norte de Chile se caracterizan por la escasa disponibilidad de agua para todas las formas de vida que se encuentran allí. El déficit hídrico de estos ambientes sumado a las altas temperaturas que se producen durante el día, dificultan el desarrollo de las plantas que no están adaptadas a este medio. Debido a las condiciones ambientales existentes que causan diferentes estreses abióticos en las plantas y principalmente el estrés hídrico

originado por la falta de agua, las plantas que han logrado superar estas barreras ambientales tuvieron que desarrollar mecanismos sofisticados de adaptación y de tolerancia al estrés hídrico.

Aloe vera fue introducido en Chile como un cultivo que puede ser económicamente rentable en el norte del país, particularmente en las regiones de Atacama y de Coquimbo, ya que puede cultivarse con poca agua y por la importancia económica que tienen sus hojas y el gel presente en el interior de ellas. El gel es de gran valor económico por las propiedades farmacéuticas, nutricionales y cosmetológicas atribuidas a las moléculas presentes en el gel (Chow y col. 2005, Im y col. 2010). Para la planta, el gel tiene importancia porque le permite acumular agua, lo que es una adaptación a la escasez de este recurso en los ambientes en que esta especie vive. Aloe vera es una planta CAM, suculenta por la gran cantidad de agua que almacena en sus hojas y porque es capaz de asimilar CO₂ durante la noche, cuando la demanda evaporativa disminuye (Cushman 2001, Cushman y Borland 2002. Ogburn y Edwards 2010).

Siendo una planta CAM, *Aloe barbadensis* Miller es una planta que presenta una eficiente síntesis de azúcares los que utiliza para realizar un ajuste osmótico (Ogburn y Edwards 2010, Delatorre-Herrera y col. 2010). Un buen ajuste osmótico de esta especie demuestra que efectivamente ella puede tolerar las condiciones de aridez. En nuestra publicación del 2010 (Delatorre-Herrera 2010) se demostró que los fructanos aumentan en Aloe vera con la restricción hídrica. Debido a ello, es importante determinar la importancia del estrés hídrico sobre la acumulación, concentración y composición de los

azúcares en la planta y en particular de los fructanos. Por lo tanto, en este seminario de título se estudió la respuesta del Aloe vera a restricciones hídricas graduales causadas por regímenes de riego que van desde 100% CC hasta 25 % CC y las consecuencias de este déficit hídrico en la acumulación de carbohidratos, principalmente de los oligo y polifruktanos. Para ello se cuantificaron los azúcares totales, azúcares solubles y fructanos en Aloe vera. La razón por la cual se analizaron los carbohidratos presentes en las hojas de las plantas de los distintos tratamientos se debe a que variaciones en las cantidades de azúcares, particularmente una acumulación de estos, indicaría un ajuste osmótico de la planta frente a la falta de agua. El ajuste osmótico (AO) es una respuesta común y muy conservada en las plantas al estrés hídrico, de hecho es una respuesta conservada en todos los organismos ante la desecación. El AO consiste en la disminución del potencial hídrico de la célula debido a una acumulación neta de solutos u osmolitos en respuesta al déficit hídrico para mantener un gradiente hídrico favorable hacia el interior de la célula (Morgan J.M. 1984). La célula vegetal al sintetizar y acumular estos solutos en su citoplasma o su vacuola, es capaz de mantener su turgencia y mantener el funcionamiento normal de la célula (Zhang J. y col. 1999, Chimenti y col. 2002). Estos solutos acumulados por las células vegetales son denominados solutos u osmolitos compatibles y consisten en compuestos de bajo peso molecular, altamente solubles y que en altas concentraciones no son tóxicas para las células. Los solutos compatibles que pueden ser acumulados por la célula vegetal varían dependiendo de las especies. Entre ellos están: aminoácidos (prolina, glutamato), azúcares hidrosolubles (monosacáridos como glucosa y fructosa, disacáridos como sacarosa y trehalosa, y oligo y polisacáridos tales como los fructanos), polioles (sorbitol y manitol), aminas

cuaternarias (glicina betaína), ácidos orgánicos (malato y citrato) y iones (K^+) (Mullet y Whitsitt 1996, Zhang J. y col. 1999, Burg y Ferraris 2008).

4.1. Azúcares totales y solubles.

De los resultados obtenidos para los azúcares totales como también para los azúcares solubles, se encontró que estos incrementaron significativamente en la condición de mayor estrés hídrico, es decir, en las hojas provenientes de las plantas de Aloe vera sometidas al tratamiento de riego 4 (T4), correspondiente al 25% CC. Se observó además, que en T4 las muestras de las bases de las hojas presentaban mayores cantidades de azúcares que en las puntas. Esta diferencia entre bases y puntas se detectó tanto para los azúcares totales como en los azúcares solubles. La mayor cantidad de azúcares totales y solubles presentes en las bases de las hojas de Aloe vera en todos los tratamientos hídricos se puede explicar porque las bases tienen un rol de reservorio de gel y carbohidratos para la planta. Los azúcares se sintetizan principalmente en las puntas donde ocurre la mayor asimilación de CO_2 por un tipo de metabolismo CAM que es muy eficiente. Los azúcares sintetizados en las puntas posiblemente se almacenan en las bases de las hojas en forma de fructanos y otros polisacáridos de reserva.

El aumento de los azúcares totales con el aumento de la restricción hídrica se debe en parte al aumento de los azúcares solubles que aumentan para el ajuste osmótico. Sin embargo, los polisacáridos que también conforman parte de los azúcares totales también aumentan en estas condiciones. Así, los resultados indican que los fructanos aumentan con el déficit hídrico. Si otros polisacáridos aumentan como es el caso de los polisacáridos de pared celular, estos tendrían que determinarse a futuro. También sería

importante saber si el ácido abscísico (ABA), que regula el status hídrico de las plantas, está involucrado en este aumento de azúcares totales. Bastide y col. (1993) encontraron un aumento de ABA en plantas CAM sometidos a estrés hídrico.

El incremento significativo en T4 de los azúcares totales y en particular de los azúcares solubles demuestra que la planta responde ante esta condición, con síntesis y acumulación de nuevas moléculas que contribuyen a un ajuste osmótico efectivo. En consecuencia, bajo mayor estrés hídrico se induce una mayor síntesis y acumulación de solutos compatibles en forma de carbohidratos hidrosolubles. En plantas T4, además, aumentó significativamente la prolina que es también un soluto compatible (Delatorre-Herrera y col. 2010). En T2 y en T3 también hubo un aumento en las cantidades de azúcares respecto a T1, pero la diferencia fue menor que lo observado en T4 respecto a T1, además estas variaciones no fueron estadísticamente significativas. De esta forma se da por cumplido el objetivo de cuantificar los azúcares totales y solubles de las hojas de Aloe vera. Por lo tanto, los azúcares totales de la planta en estas condiciones intermedias (75% y 50% CC) tuvo un menor ajuste osmótico.

La cuantificación de los azúcares totales y solubles realizada por antrona es confiable porque está fundamentada en el método diferenciado de extracción de moléculas pequeñas y macromoléculas: el etanol 95% a 70°C solamente extrae moléculas pequeñas, como monosacáridos, oligosacáridos pequeños, aminoácidos y otras moléculas pequeñas (McCready y col. 1950, Yemm y Willis 1954). Cuando la extracción se realiza con agua desionizada en ebullición, el agua hirviendo rompe membranas, extrayendo monosacáridos y polisacáridos que son solubles en agua caliente

como: pectina, fructanos y glucomananos (Smith y col. 1964, Simpson y col. 1984). El reactivo de antrona sólo cuantifica los componentes que contienen carbohidratos. La antrona reacciona con los anillos de piranosa y furanosa en medio de ácido sulfúrico concentrado, hidrolizando los enlaces glicosídicos de oligo y polisacáridos. Los monosacáridos liberados van a ser deshidratados y transformados en furfurales (para las pentosas) y 5-hidroximetilfurfurales (para las hexosas), siendo estos compuestos los que interactúan directamente con la antrona, formando un complejo de color azul en el medio ácido en cual se lleva a cabo la reacción (Love 1953, Yemm y Willis 1954). Por esta razón, la antrona cuantifica todos los azúcares presentes en los extractos, sean monosacáridos o polímeros. (Dreywood 1946, Koehler 1952, Yemm y Willis 1954, Dische 1962, Momose y col. 1963). Cabe mencionar que la solución de antrona ha sido usada en reiteradas ocasiones para la cuantificación de carbohidratos totales de muestras provenientes de plantas (McCready y col. 1950, Yemm y Willis 1954, Cerning-Beroard 1975, Arrizon y col. 2010). Incluso se ha utilizado el método de la antrona para cuantificar DNA y RNA, al cuantificar respectivamente la 2-desoxirribosa y ribosa (Gary y Klausmeier 1954). En trabajos más recientes (Turula Jr. Y Col. 2010) se ha logrado utilizar el método de la antrona en procesos automatizados para la cuantificación de carbohidratos de distintas muestras y con un alto grado de precisión.

La razón por la cual es posible detectar la presencia de fructanos, particularmente de fructosa, desde las muestras extraídas se debe al uso de la solución de antrona modificada de Jermyn (1956). Se ha determinado en reiteradas ocasiones (Van Handel 1967, Cerning-Beroard 1975, Jermyn 1975) que la fructosa, y las cetohehexosas en general,

reaccionan más rápido que otros azúcares como las aldohexosas (ejemplo: glucosa, manosa y galactosa, azúcares que componen el acemanano, un tipo de galactoglucomannano en Aloe vera) en la reacción colorimétrica con antrona en ácido sulfúrico concentrado. Es por esto que el procedimiento para la determinación cuantitativa de fructosa difiere de la cuantificación total de carbohidratos en el uso de una temperatura de reacción más baja (en nuestro caso de 37° C) en el uso de ácido a una concentración menor, diluido en agua (Wise y col. 1955). De esta forma es posible favorecer la reacción entre la fructosa con la antrona de forma específica, y así poder cuantificar los fructanos que están compuestos principalmente por fructosa.

Una limitación de la cuantificación con antrona se presenta al analizar pentosas, tales como arabinosa y xilosa, debido a la inestabilidad del complejo que se forma entre la pentosa y la antrona. Esta inestabilidad conlleva a que la coloración característica de este ensayo sea muy breve como para ser cuantificado, llegando a tener una coloración ámbar (Bridges 1952).

4.2. Fructanos.

Como los fructanos no han sido descritos en Aloe vera previamente, y debido a su rol fisiológico protector en condiciones de sequía, se decidió analizar la presencia de fructanos en Aloe vera y sus cambios cualitativos y cuantitativos en los diferentes tratamientos hídricos. Se encontró un incremento significativo de la cantidad de oligofructanos sólo en las puntas de las hojas de las plantas sometidas a T4. En las bases no se observaron cambios significativos.

En la cuantificación de los polifruktanos se encontró en las puntas y en las bases de las plantas sometidas a un mayor estrés hídrico (T4) un incremento significativo respecto al control, sin diferencias significativas entre las dos regiones de la hoja.

Estos resultados indican que la planta de Aloe vera responde al estrés hídrico con una eficiente síntesis y acumulación de estas moléculas. Los fructanos son considerados como un tipo de polisacárido soluble considerado ser un soluto compatible, que juegan un rol importante en el ajuste osmótico que realiza la planta en respuesta al estrés hídrico (Zhang J. y col. 1999, Burg y Ferraris 2008). Como en el caso de los oligofruktanos, los polifruktanos incrementaron más en la puntas que en las bases cuando aumentó el estrés hídrico. En condiciones de campo y por la forma de las hojas del Aloe vera, las puntas de las hojas posiblemente son más afectadas por la falta de agua y por mayor radiación lumínica que las bases de las hojas. Además, las puntas constituyen la zona fotosintetizadora de la hoja porque tienen mayor cantidad de cloroplastos. Las bases de las hojas, en cambio, están constituidas por tejido con mayor cantidad de gel (galactoglucomanano) y se considera que almacenan más agua gracias a la presencia de este polisacárido. Las altas temperaturas también pueden afectar la fisiología de las puntas respecto a las bases. Las puntas tienen menor cantidad de gel y una mayor superficie de evaporación respecto a las bases y podrían ser más afectadas por el aumento de temperatura. En las puntas, por lo tanto, la pérdida de agua por evaporación es mayor y necesita de una mayor y mejor protección, que los fructanos pueden darle. Los resultados demostraron que el incremento de los fructanos es mayor en las puntas que en las bases cuando aumenta el déficit hídrico.

La purificación de oligofruktanos y polifruktanos demostró que las columnas de intercambio iónico no separaron a los polímeros en sus diferentes grados de polimerización. Sólo se logró extraer estos polisacáridos sin carga de pigmentos y otras moléculas contaminantes (Figura 13).

Los fruktanos purificados pudieron ser mejor analizados por TLC. TLC fue usado principalmente para determinar el grado de polimerización en los oligo y polifruktanos y los tipos de fruktanos sintetizados en los diferentes tratamientos hídricos a través del Rf de los trisacáridos presentes.

A partir de los resultados de TLC obtenidos para los oligofruktanos (Figuras 14 y 15) y de los polifruktanos (Figuras 16 y 17), se determinó en primer lugar que efectivamente en las hojas de *Aloe barbadensis* Miller había fruktanos y estaban presentes en los cuatro tratamientos de riego. Se encontró que había trisacáridos del tipo 1-cestosa y neo-cestosa en todas las muestras analizadas, pero no del tipo 6-cestosa. Este resultado indicaría que el Aloe vera al igual que las demás especies Asparagales (ejemplo: cebolla, ajo, esparrago y agave), sintetiza fruktanos del tipo inulina y de tipo neo-fruktano (Vijn y Smeekens 1999, Van den Ende y col. 2004, Mancilla-Margalli y López 2006, Livingston III y col. 2009). Para los fruktanos de un GP ≥ 4 no se pudo determinar por TLC el tipo de fruktano al que pertenecía. Debido a que se encontró 1-cestosa y neo-cestosa, es probable que en las hojas de Aloe vera haya una mezcla de fruktanos tipo inulina y de tipo neo-fruktano.

Los resultados del TLC de los extractos de oligofruktanos de puntas (Figura 14 y Tabla 1) y bases (Figura 15 y Tabla 2) se correlacionaron con los resultados obtenidos previamente mediante el test de antrona específico para las cetosas (Figura 9). Se encontró que sólo en las puntas de hojas de plantas de T4 hubo un incremento sustancial de los oligofruktanos, mientras que en las bases de las hojas la mayor presencia de oligofruktanos fue vista en plantas de T4. En ambas placas analizadas para los extractos de oligofruktanos se encontró que en la condición de mayor estrés hídrico, correspondiente al T4, se registraron las bandas de los fruktanos de mayor área e intensidad. En el caso de los extractos de polifruktanos, igual que en el caso de los oligofruktanos, los resultados de los análisis de TLC se correlacionaron con los resultados obtenidos por espectrofotometría (test de antrona). La mayor cantidad de polifruktanos fueron detectados en plantas T4. Los resultados obtenidos permiten concluir que los fruktanos de ambos extractos (oligofruktanos y polifruktanos) aumentan con el déficit hídrico, incrementándose además el grado de polimerización. Los fruktanos extraídos de plantas T3 y T4 presentaron un GP mayor a los encontrados en las plantas T1 y T2. Sólo en el caso del extracto de oligofruktanos de las bases de las hojas de plantas T2, se encontró un GP mayor que en las plantas T3.

Cabe también mencionar que el agente revelador usado en los análisis de TLC es específico para las cetosas, y bajo luz ultravioleta se observan algunas diferencias respecto a cuando la placa se estudia bajo la luz blanca. Específicamente se observaron bandas de fruktanos en UV que no son visibles en luz blanca. Esta diferencia se puede explicar por la reacción entre la urea y los carbohidratos en el medio ácido dado por la

presencia del ácido fosfórico. Al aplicar calor, se formarán compuestos fluorescentes que absorben a los 362 nm y emiten fluorescencia a los 414 nm en el caso de la fructosa (Spikner y Towne 1962, Yang y col. 2002). Yang y col. (2002) establecieron que se formaba un complejo entre el azúcar y la urea en condiciones ácidas, que presentaba propiedades de fluorescencia. Además, demostraron que existía un comportamiento lineal entre la fluorescencia emitida y la concentración del azúcar usado para generar el compuesto. De esto se puede deducir que, a una mayor intensidad de fluorescencia en una banda de fructanos en la placa de TLC, hay una mayor cantidad de ese fructano.

Un análisis analítico más detallado de los fructanos de las hojas de Aloe vera se llevó a cabo mediante la derivatización a alditol acetato de los azúcares componentes de los fructanos y estudio por GC-MS de las muestras. De esta forma se logró cuantificar también a los fructanos de las hojas. Producto del tautomerismo ceto-enólico de la fructosa se observó sólo manosa (manitol) y glucosa (sorbitol) (Abdel-Akherj y col. 1951, Carpita y Shea 1989). La suma de estos dos azúcares corresponde a los oligo y polifruktanos totales analizados.

En la Tabla 3 y 4, se encontró que efectivamente las muestras de las bases de las hojas presentaban una mayor cantidad de fructanos en comparación a las puntas, y que estos aumentaban a medida que aumentaba el déficit hídrico corroborando de esta forma los resultados obtenidos previamente por la cuantificación con antrona. Los resultados de la cuantificación mediante GC-MS confirmaron la misma tendencia de diferencias en cantidad de fructanos en las puntas y las bases de las hojas, diferencias que disminuyen con el aumento del déficit hídrico. Los resultados obtenidos por medio de

espectrofotometría y con los análisis de GC-MS de los alditol acetatos de los azúcares componentes de los fructanos permitieron cumplir con el objetivo de cuantificar la cantidad de fructanos presentes en hojas de plantas de Aloe vera sometidas a diferentes condiciones de irrigación.

Para establecer si la disminución de agua afectaba la estructura de la molécula, se analizaron los tipos de enlaces glicosídicos presentes en los fructanos de las puntas y las bases de las hojas de Aloe vera sometidas a los cuatro tratamientos de riego.

Los datos de los análisis de los PMAA de los oligofructanos (Tablas 6 y 7) indicaron la presencia de enlaces de tipo 1-fructosa, 6-fructosa, 6-glucosa y 1,6-fructosa ramificada (todos enlaces glicosídicos característicos de los fructanos) (López y col. 2003, Mancilla-Margalli y López 2006, Wack y Blaschek 2006, Ravenscroft y col. 2009), por lo que nuevamente se logró confirmar la presencia de fructanos en las hojas de Aloe vera. Se pudo establecer, además, que en las condiciones de mayor déficit hídrico se incrementaron los enlaces de tipo 6-fructosa, 6-glucosa y de 1,6-fructosa presentes en los fructanos. Los análisis de los enlaces permitieron corroborar que la fructosa y glucosa terminal disminuyen en los tratamientos de menor riego. La 1-fructosa también disminuye y por lo tanto, los fructanos de tipo lineal disminuyen aumentado a su vez los enlaces de ramificación. Uno de estos enlaces de ramificación que más aumenta es el que compromete al C6 de la glucosa inicial y que es característico de los neo-fructanos (Sims 2003, Lammens y col. 2009). Estos resultados nos indican que a medida que el déficit hídrico aumenta en plantas de Aloe vera, la estructura de los fructanos que se sintetizan y acumulan en sus hojas varía.

Específicamente, la estructura cambia de una forma tipo-inulina a una tipo neo-fructano. Los análisis de GC-MS también corroboraron que el GP promedio de los fructanos incrementaba a medida que aumenta la falta de agua.

Los PMAA obtenidos de los polifruktanos (Tablas 8 y 9) fueron similares al de los oligofruktanos. A medida que se incrementaba el déficit hídrico al cual estaba sometida la planta (en particular en T3 y T4), los enlaces de tipo 1-fructosa, 6-fructosa, 6-glucosa y 1,6-fructosa ramificada aumentan. También se observó un incremento de los enlaces ramificados por sobre los de tipo lineal, y una mayor presencia de fructanos con fructosa unida al C6 de la glucosa. En los polifruktanos además se detectó una variación en su GP, que aumenta en las condiciones de mayor déficit hídrico. Los polifruktanos de BT2 no pudieron ser analizados para enlaces glicosídicos. Los cromatogramas obtenidos mostraron un alto background de contaminación y por lo tanto, no se logró diferenciar los derivados PMAA con respecto a las señales de los contaminantes.

El resultado de GP de los PMAA de los fructanos analizados mediante GC-MS, arrojó valores bastante pequeños, incluso para los polifruktanos que debieran tener un $GP > 10$. Para entender estos valores bajos de GP de los fructanos, hay que considerar los resultados de TLC obtenidos previamente (Figuras 14 al 17 y Tablas 1 y 2). Tanto en las placas de TLC para los oligofruktanos (Figuras 14 y 15) como para los polifruktanos (Figuras 16 y 17) se aprecia una gran cantidad de fructosa y de sacarosa, y en menor cantidad están las bandas correspondientes a los fructanos que aparecen con un R_f menor al disacárido. Debido a la gran cantidad de sacarosa presente en las muestras de fructanos, al metilar y luego derivatizar las muestras de Aloe vera, este azúcar va a

conformar gran parte de los PMAA obtenidos y hará que el GP promedio que se calcula sea mucho más bajo del esperado. Una posibilidad para obtener un GP promedio de las muestras de fructanos mayor sería purificar a los polifruktanos dejándolos libres de sacarosa y fructosa y oligofruktanos presentes en el extracto. Esto se podría hacer mediante diálisis de los fructanos al usar una membrana cuyo tamaño de poro permitiese eliminar la fructosa, sacarosa y oligosacáridos pequeños (Ravenscroft y col. 2009). Este protocolo de separación ha sido usado en otros trabajos con fructanos previo a la generación de los PMAA.

Como se había mencionado previamente, las cromatografías de TLC muestran que tanto los extractos de oligofruktanos como los de polifruktanos tienen una gran cantidad de fructosa, además de sacarosa. Sin embargo, debido a que la fructosa se metila completamente en todos los grupos hidroxilos de la molécula, su gran volatilidad a las altas temperaturas del análisis de GC-MS (160°-270° C) hace que la fructosa presente en las muestras de fructanos no aparezca en el análisis. La fructosa metilada se volatiliza en la inyección de la muestra, es decir inmediatamente al entrar en la columna GC. De esta forma en el rango de tiempo de retención analizado (10 a 22 min) no aparece la señal correspondiente a la fructosa libre completamente metilada, pero sí la sacarosa metilada (Carpita y Shea 1989).

Las modificaciones estructurales de los fructanos en hojas de plantas con menor irrigación (T3 y T4), demuestran que los tipos de fructanos que se van sintetizando y acumulando en ambos extremos de la hoja del Aloe vera son mucho más complejos estructuralmente que los presentes en T1 y T2. El incremento de las concentraciones de

los fructanos en plantas que han sido sometidas a diversos estreses abióticos y en particular a sequía, ha sido descrito anteriormente en diversos estudios (Hendry 1993, Pilon-Smits y col. 1995, Pilon-Smits y col. 1999, Schellenbaum y col. 1999, De Roover y col. 2000, Li y col. 2007), pero nunca se había establecido que el déficit hídrico al cual estuviese sometida una planta pudiese afectar la estructura de los fructanos acumulados. Estas modificaciones del GP y una estructura más ramificada de tipo neo-fructano en plantas sometidas a déficit hídrico podrían explicarse por el rol fisiológico de protección de membranas y proteínas que tienen los azúcares y los fructanos en particular. Esta protección ante la desecación se ha visto para monosacáridos (glucosa y fructosa), disacáridos (sacarosa y trehalosa) y oligo y polisacáridos (fructanos) (Jeong & Housley, 1990, Tognetti y col. 1990, Hoekstra y col. 2001, Híncha y col. 2002, Vereyken y col. 2003, Valluru & Van den Ende 2008, del Viso y col. 2009). El efecto hidrofóbico es crucial para la organización celular, ya que es el agua la que impulsa a los fosfolípidos hacia la formación de membranas biológicas y también contribuye en la conformación tridimensional de las proteínas (Hoekstra y col. 2001). Al perderse el agua desde el interior de las células, entonces se está eliminando esta fuerza impulsora de la organización celular, induciendo cambios estructurales en las membranas lipídicas y desnaturación de las proteínas (Livingston III y col. 2009). Los azúcares y los fructanos en especial, mediante sus grupos hidroxilo, son capaces de interactuar con las cabezas polares de los fosfolípidos de las membranas y con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas mediante la formación de puentes de hidrógeno (Hoekstra y col. 2001, Vereyken y col. 2001, Livingston III y col. 2009). Los fructanos y azúcares solubles pueden llegar a reemplazar a las moléculas de agua que estaban interactuando con las

membranas lipídicas o con las proteínas cuando ocurre una desecación severa de la célula. Estos puentes de hidrógeno que se establecen entre los azúcares y las macromoléculas, contribuyen a mantener las propiedades fisicoquímicas de membranas y proteínas sin alterar en forma irreversible el funcionamiento celular (Hoekstra y col. 2001, Vereyken y col. 2001, Livingston III y col. 2009).

También se ha visto una correlación entre el GP de los fructanos y sus funciones de protección de las membranas lipídicas ante la desecación. En particular se ha encontrado que los fructanos que presentan una mayor longitud, o sea, un mayor GP protegen la estabilidad de las membranas lipídicas de una forma más efectiva que aquellas moléculas de menor GP ante daños causado por la desecación. Incluso se ha visto que mezclas de fructanos de alto GP con fructanos de cadenas más cortas serían más efectivos que los fructanos de GP altos solos (Vereyken y col. 2003, Hinch y col. 2007). Debido a esto, pensamos que la presencia de una gran variedad de fructanos en plantas de Aloe vera sometidas a la condición de mayor estrés hídrico como es T4, se debe a una respuesta fisiológica adaptativa que desarrolló la planta para su protección ante estas condiciones. Por lo tanto, el incremento de los neo-fructanos de un mayor GP y con una estructura más ramificada ayudaría a las células vegetales ante la pérdida de agua, al contribuir con una mayor superficie de interacción con las membranas y proteínas. De esta forma se evita la pérdida de sus propiedades fisicoquímicas producto de la pérdida de moléculas de agua, al formar en reemplazo los puentes de hidrógeno necesarios con las moléculas de fructanos.

Mis resultados demostraron que el estrés hídrico genera un incremento significativo de los azúcares totales, y en particular de los oligo y polifruktanos en las hojas de las plantas de *Aloe barbadensis* Miller. Este incremento de los carbohidratos sería un mecanismo de respuesta fisiológica de ajuste osmótico eficiente de la planta ante la falta de agua y con el fin de mantener un funcionamiento normal de las células vegetales. Además en estudios llevados a cabo por otros investigadores de nuestro grupo, se ha visto que la planta presenta un incremento en la eficiencia del uso de agua (EUA) en los tratamientos T4 respecto a T1. En cuanto al rendimiento de las plantas, particularmente del gel de las hojas, se encontró que en las condiciones de cultivo T2, es decir, a un 75% CC se obtuvo los valores más altos de gel por hectárea de terreno cultivado (Salinas y col. 2010). Además se encontró que en las condiciones de T4, otras respuestas fisiológicas de la planta ante el estrés hídrico como la síntesis y acumulación de proteínas de shock térmico (HSP), ubiquitina y superóxido dismutasa (SOD) eran menores que en T3, donde se registró la mayor acumulación (Salinas y col. 2010).

4.3. Proyecciones.

Algunas proyecciones que se pueden hacer a partir de este trabajo son el estudio la actividad enzimática de las fructosiltransferasas del Aloe vera y determinar si el estrés hídrico afecta la actividad enzimática. También sería interesante conocer las secuencias nucleotídicas de los mRNA de los genes que codifican para las fructosiltransferasas 1-SST, 6G-FFT y 1-FFT, ya que de esta forma luego se podría analizar de la expresión de los mensajeros mediante RT-PCR en tiempo real bajo las distintas condiciones de riego usadas. Con estos ensayos se podría complementar el esquema de la síntesis de fructanos en Aloe vera, lo cual sería un modelo innovador de estudio para los fructanos.

En el futuro sería también interesante analizar las propiedades como prebióticos de los fructanos obtenidos desde las plantas de Aloe vera en las condiciones de mayor estrés hídrico. En caso que los neo-fructanos obtenidos de Aloe puedan estimular de forma selectiva a las bacterias beneficiosas del sistema digestivo, como son los bifidobacterium, lactobacilos y ciertos tipos de bacteroides, podría ser empleado como una nueva fuente de extracción de estos tipos de moléculas prebióticas. De esta forma sería posible cultivar las plantas de Aloe vera en regiones de Chile más áridas en donde no se cultivan otras especies productoras de fructanos. Siendo este el caso de la achicoria que es cultivada en la región del Biobío y de la cual se extrae actualmente fructanos del tipo inulina solamente.

5. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este seminario de título, es posible establecer las siguientes conclusiones:

1. Las cantidades de los azúcares totales y solubles se incrementaron significativamente en las hojas de Aloe vera sometidas a condiciones de déficit hídrico (T4). Este incremento se registró tanto en las puntas como en las bases de las hojas de las plantas de Aloe vera, siendo mayor en las bases de las hojas.
2. Este seminario de título reporta por primera vez la presencia de fructanos en *Aloe barbadensis* Miller.
3. Aloe vera incrementa en forma significativa las cantidades de estos polímeros bajo condiciones de estrés hídrico.
4. El incremento de azúcares totales, solubles y de los fructanos en las hojas en condiciones de mayor déficit hídrico (T4 ó 25% CC), corresponde a un eficiente AO que realiza la planta con el fin de disminuir la pérdida de agua y de mantener la turgencia de las células.
5. La cuantificación por espectrofotometría y por GC-MS de los fructanos revelaron que las puntas de las hojas del Aloe vera tienen menos fructanos que las bases en todos los tratamientos analizados, pero se incrementó en forma significativa la cantidad de fructanos en estas zonas de las hojas cuando aumentó el déficit hídrico.
6. La composición de los fructanos obtenido por TLC mostró un incremento en el GP de los oligo y polifruktanos provenientes de las puntas y las bases de las hojas de las plantas de T3 y T4. Estos resultados fueron posteriormente corroborados por el análisis

de los PMAA por GC-MS, determinándose que efectivamente hay un incremento en el GP de los fructanos asociado a las condiciones de mayor falta de agua.

7. Además de incrementar el GP de los fructanos acumulados en Aloe vera, los análisis de GC-MS permitieron concluir que a mayor déficit hídrico los fructanos sintetizados son en mayor cantidad de tipo neo-fructanos y menor cantidad de tipo inulina, con una estructura más ramificada.

8. Las modificaciones en el GP y en la estructura de los fructanos en las hojas de Aloe vera de las plantas en mayor sequía serían una respuesta molecular de la planta para mantener el funcionamiento normal de las membranas y de las proteínas del interior de las células vegetales.

9. Finalmente es posible establecer que se ha logrado cumplir con los objetivos establecidos en el presente seminario de título y que la hipótesis planteada es válida, es decir, que en las plantas de *Aloe barbadensis* Miller el estrés hídrico incrementa significativamente los carbohidratos y en particular los fructanos, induciendo incluso modificaciones estructurales en los fructanos en plantas T4.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Akherj M., Hamilton K. y Smith F.** 1951. The Reduction of Sugars with Sodium Borohydride. *Journal of the American Chemical Society* **73**: 4691-4692.
- Amiard V., Morvan-Bertrand A., Billard J.P., Huault C., Keller F. y Prud'homme M.P.** 2003. Fructans, But Not the Sucrosyl-Galactosides, Raffinose and Loliose, Are Affected by Drought Stress in Perennial Ryegrass. *Plant Physiology*. **132**: 2218-2229.
- Arrizon J., Morel S., Gschaedler A. y Monsan P.** 2010. Comparison of wáter-soluble carbohydrate composition and fructan structures of *Agave tequilana* plants of different ages. *Food Chemistry*. **22**: 123-130.
- Bastide B., Sipes D., Hann J. y Ting I.P.** 1993. Physiological and Biochemical Responses of Succulent Plants with Crassulacean Acid Metabolism to Severe Water Stress. *En* T.J. Close y E.A. Bray (eds.), *Plant Responses to Cellular Dehydration during Enviromental Stress*. pp 79-90. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA.
- Beylot M.** 2005. Effects of inulin-type fructans on lipid metabolism in man and in animal models. *British Journal of Nutrition*. **93**: Suppl. 1, S163-S168.
- Bieleski R.** 1993. Fructan Hydrolysis Drives Petal Expansion in the Ephemeral Daylily Flower. *Plant Physiology*. **103**: 213-219.
- Bouhnik Y., Raskineb L., Champion K., Andrieux C., Penven S., Jacobs H. y Simoneau G.** 2007. Prolonged administration of low-dose inulin stimulates the growth of bifidobacteria in humans. *Nutrition Research*. **27**: 187- 193.
- Bridges R. R.** 1952. Quantitative Determination of Pentoses with Anthrone. *Analytical Chemistry*. **24**: 2004-2005.
- Brighenti F.** 2007. Dietary Fructans and Serum Triacylglycerols: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Journal of Nutrition*. **137**: 2552S-2556S.
- Burg M.B. y Ferraris J.D.** 2008. Intracellular Organic Osmolytes: Function and Regulation. *The Journal of Biological Chemistry*. **283**: 7309-7313.
- Cairns A.J., Pollock C.J.** 1988. Fructan biosynthesis in excised leaves of *Lolium temulentum* L. I. Chromatographic characterization of oligofructans and their labelling patterns following ¹⁴CO₂ feeding. *New Phytologist*. **109**: 399 - 405.
- Cardemil L. y Reinero A.** 1982. Changes of *Araucaria araucana* reserves during germination and early seedling growth. *Canadian Journal of Botany*. **60**: 1629-1638.

Carpita N.C. y Shea E.M. 1989. Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol acetates. *En* C.J. Biermann y G.D. McGinnis (eds.), *Analysis of Carbohydrates by GLC and MS*. pp 157-216. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Cerning-Beroard J. 1975. A note on Sugar Determination by the Anthrone Method. *Cereal Chemistry*. **52**: 857-860.

Chimenti C.A., Pearson J. y Hall A.J. 2002. Osmotic Adjustment and yield maintenance under drought in sunflower. *Field Crops Research*. **75**: 235-246.

Ciucanu I. 2006. Per-*O*-methylation reaction for structural analysis of carbohydrates by mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. **576**: 147-155.

Chase M.W. 2004. Monocot Relationships: An overview. *American Journal of Botany*. **91**: 1645-1655.

Chase M.W., Reveal J.L. y Fay M.F. 2009. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **161**: 132-136.

Chaves M.M. y Oliveira M.M. 2004. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany*. **55**: 2365-2384.

Chow J.T., Williamson D.A., Yates K.M. y Goux W.J. 2005. Chemical characterization of the immunomodulating polysaccharide of *Aloe vera* L. *Carbohydrate Research*. **340**: 1131-1142.

Christopher, J.T. y Holtum J.A. 1996. Patterns of Carbon Partitioning in Leaves of Crassulacean Acid Metabolism Species during Deacidification. *Plant Physiology* **112**: 393-399.

Chun-hui L., Chang-hai W., Zhi-liang X. y Yi W. 2007. Isolation, chemical characterization and antioxidant activities of two polysaccharides from the gel and the skin of *Aloe barbadensis* Miller irrigated with sea water. *Process Biochemistry*. **42**: 961-970.

Coudray C., Tressol J.C., Gueux E., Rayssiguier Y. 2003. Effects of inulin-type fructans of different chain length and type of branching on intestinal absorption and balance of calcium and magnesium in rats. *European Journal of Nutrition*. **42**: 91-98.

Crowe J.H., Crowe L.M., Carpenter J.F., Rudolph A.S., Wistrorn C.A., Spargo B.J. y Anchordoguy T.J. 1988 .Interactions of sugars with membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **947**: 367-384.

Cushman J.C. 2001. Crassulacean Acid Metabolism. A Plastic Photosynthetic Adaptation to Arid Environments. *Plant Physiology*. **127**: 1439–1448.

Cushman J.C. y Borland A.M. 2002. Induction of Crassulacean acid metabolism by water limitation. *Plant, Cell and Environment*. **25**: 295–310.

de Halleux S, Van Cutsem P. 1997. Cloning and sequencing of the 1-SST cDNA from chicory root. *Plant Physiology*. **113**: 1003.

De Roover J., Vandenbranden K., Van Laere A. y Van den Ende W. 2000. Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose: sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Cichorium intybus* L.). *Planta*. **210**: 808-814.

Delatorre-Herrera J., Delfino I., Salinas C., Silva H. y Cardemil L. 2010. Irrigation restriction effects on water use efficiency and osmotic adjustment in Aloe vera plants (*Aloe barbadensis* Miller). *Agricultural Water Management*. **97**: 1564-1570.

del Viso F., Puebla A.F., Fusari C.M., Casabuono A.C., Couto A.S., Pontis H.G., Hopp H.E. y Heinz R.A. 2009. Molecular Characterization of a Putative Sucrose:Fructan 6-Fructosyltransferase (6-SFT) of the Cold-Resistant Patagonian Grass *Bromus pictus* Associated With Fructan Accumulation Under Low Temperatures. *Plant Cell Physiology*. **50**: 489–503.

Denius H.R. y Homann P.H. 1972. The Relation between Photosynthesis, Respiration, and Crassulacean Acid Metabolism in Leaf Slices of *Aloe arborescens* Mill. *Plant Physiology*. **49**: 873-880.

Dische R. 1962. Color reactions of carbohydrates. *En* R.L. Whistler y M.L. Wolfrom (eds.), *Methods in Carbohydrate Chemistry*. pp 477- 512. Academic Press, New York, USA.

Dreywood R. 1946. *Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition*. **18**: 499.

Flickinger E.A., Schreijen E.M.W.C., Patil A.R., Hussein H.S., Grieshop C.M., Merchen N.R. y Fahey Jr G.C. 2003. Nutrient digestibilities, microbial populations, and protein catabolites as affected by fructan supplementation of dog diets. *Journal of Animal Science*. **81**: 2008–2018.

Gary N.D. y Klausmeier R.E. 1954. Colorimetric Determination of Ribose, Deoxyribose and Nucleic Acid with Anthrone. *Analytical Chemistry*. **26**: 1958-1960.

Gauntt C.J., Wood H.J., McDaniel H.R. y McAnalley B.H. 2000. Aloe Polymannose Enhances Anti-coxsackievirus Antibody Titres in Mice. *Phytotherapy Research*. **14**: 261-266.

Goblet J.P., Canon L. y Van Cutsem P.J. 1999. *Cichorium intybus* fructan:fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT) cDNA. (Número de acceso: U81520). No publicado.

Griffin I.J., Hicks P.M.D., Heaney R.P. y Abrams S.A. 2003. Enriched chicory inulin increases calcium absorption mainly in girls with lower calcium absorption. *Nutrition Research*. **23**: 901-909.

Griffin I.J. y Abrams S.A. 2005. Methodological considerations in measuring human calcium absorption: relevance to study the effects of inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition*. **93**: Suppl. 1, S105-S 110.

Hare P.D., Cress W.A. y van Staden J. 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment*. **21**: 535-553.

Hendry G. 1993. Evolutionary origins and natural functions of fructans — a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytologist*. **123**: 3 -14.

Hincha D.K., Zuther E., Hellwege E.M., Heyer A.G. 2002. Specific effects of fructo- and gluco-oligosaccharides in the preservation of liposomes during drying. *Glycobiology*, **12**: 103-110.

Hincha D.K., Livingston III D.P., Premakumar R., Zuther E., Obel N. Cacela C. y Heyer A.G. 2007. Fructans from oat and rye: Composition and effects on membrane stability during drying. *Biochimica et Biophysica Acta* **1768**: 1611-1619.

Hoekstra F.A., Golovina E.A. y Buitink J. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *TRENDS in Plant Science*. **6**: 431-438.

Im S.A., Lee Y.R., Lee Y.H., Lee M.K., Park Y.I., Lee S., Kim K. y Lee C.K. 2010. *In Vivo* Evidence of the Immunomodulatory Activity of Orally Administered *Aloe vera* Gel. *Archives of Pharmacal Research*. **33**: 451-456.

Jackson K.G., Taylor G., Clohessy A.M. y Williams C.M. 1999. The effect of the daily intake of inulin on fasting lipid, insulin and glucose concentrations in middle-aged men and women. *British Journal of Nutrition*. **82**: 23-30.

Jeong B.R. y Housley T.L. 1990. Fructan Metabolism in Wheat in Alternating Warm and Cold Temperatures. *Plant Physiology* **93**: 902-906.

Jermyn M.A. 1956. A new method for determining Ketohexoses in the presence of Aldohexoses. *Nature*. **177**: 38-39.

Jermyn M.A. 1975. Increasing the Sensitivity of the Anthrone Method for Carbohydrate. *Analytical Biochemistry*. **68**: 332-335.

Kawakami A., Sato Y. y Yoshida M. 2008. Genetic engineering of rice capable of synthesizing fructans and enhancing chilling tolerance. *Journal of Experimental Botany*. **59**: 793-802.

Kilian S., Kritzinger S., Rycroft C., Gibson G. y du Preez J. 2002. The effects of the novel bifidogenic trisaccharide, neokestose, on the human colonic microbiota. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. **18**: 637-644.

Kleessen B., Hartmann L. y Blaut M. 2001. Oligofructose and long-chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. *British Journal of Nutrition*. **86**: 291-300.

Koehler L.H. 1952. Differentiation of Carbohydrates by Anthrone Reaction Rate and Color Intensity. *Analytical Chemistry*. **24**: 1576- 1579.

Koster K.L., Webb M.S., Bryant G. y Lynch D.V. 1994. Interactions between soluble sugars and POPC (1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine) during dehydration: vitrification of sugars alters the phase behavior of the phospholipid. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1193**: 143-150.

Kruse H.P., Kleessen B. y Blaut M. 1999. Effects of inulin on faecal bifidobacteria in human subjects. *British Journal of Nutrition*, **82**: 375-382.

Lammens W., Le Roy K., Schroeven L., Van Laere A., Rabijns A. y Van den Ende W. 2009. Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. *Journal of Experimental Botany*. **60**: 727-740.

Lee J.K., Lee M.K., Yun Y.P., Kim Y., Kim J.S., Kim Y.S., Kim K., Han S.S. y Lee C.K. 2001. Acemannan purified from *Aloe vera* induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. *International Immunopharmacology* **1**: 1275-1284.

Leung M.Y.K., Liu C., Zhu L.F., Hui Y.Z., Yu B., y Fung K.P. 2004. Chemical and biological characterization of a polysaccharide biological response modifier from *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berg. *Glycobiology*. **14**: 501-510.

Li H.J., Yang A.F., Zhang X.C., Gao F. y Zhang J.R. 2007. Improving freezing tolerance of transgenic tobacco expressing sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase gene from *Lactuca sativa* . *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **89**: 37-48.

Livingston III D.P. y Henson C.A. 1998. Apoplastic Sugars, Fructans, Fructan Exohydrolase, and Invertase in Winter Oat: Responses to Second-Phase Cold Hardening. *Plant Physiology*. **116**: 403-408.

Livingston III D.P., Hinch D.K. y Heyer A.G. 2009. Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **66**: 2007-2023.

López M.G., Mancilla-Margalli N.A. y Mendoza-Díaz G. 2003. Molecular Structures of Fructans from *Agave tequilana* Weber var. *azul*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**: 7835-7840.

Love R.M. 1953. Spectroscopic Studies of Carbohydrates. 1. THE ACTION OF SULPHURIC ACID ON SUGARS. *Biochemical Journal*. **55**: 126-132.

Machado de Carvalho M.A. y Dietrich S.M.C. 1993. Variation in fructan content in the underground organs of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby at different phenological phases. *New Phytologist*. **123**: 735-740.

Mancilla-Margalli N.A. y López M.G. 2006. Water-Soluble Carbohydrates and Fructan Structure Patterns from *Agave* and *Dasyilirion* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**: 7832-7839.

Mandal G. y Das A. 1980. Structure of the glucomannan isolated from the leaves of *Aloe barbadensis* Miller. *Carbohydrate Research*. **87**: 249-256.

McCready R.M., Guggolz J., Silveira V. y Owens H.S. 1950. Determinación of starch and amylose in vegetables. *Analytical Chemistry*. **22**: 1156-1158.

Momose T., Ueda Y., Sawada K., y Sugi A. 1963. Organic Analysis VIII. Reaction Mechanism of Anthrone with Sugars. *Analytical Chemistry*. **35**: 31- 36.

Morgan J.M. 1984. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual Reviews of Plant Physiology*. **35**: 299-319.

Ni Y., Turner D., Yates K.M. y Tizard I. 2004. Isolation and characterization of components of *Aloe vera* L. leaf pulp. *International Immunopharmacology*. **4**: 1745 – 1755.

Mullet J.E. y Whitsitt M.S. 1996. Plant cellular responses to water deficit. *Plant Growth Regulation*. **20**: 119-124.

Ogburn M.R. y Edwards E.J. 2010. The Ecological Water-Use Strategies of Succulent Plants. *Advances in Botanical Research*. **55**: 179-225.

Pilon-Smits E.A.H., Ebskamp M.J.M., Paul M.J., Jeuken M.J.W., Weisbeek P.J. y Smeekens S.C.M. 1995. Improved Performance of Transgenic Fructan-Accumulating Tobacco under Drought Stress. *Plant Physiology*. **107**: 125-130.

Pilon-Smits E.A.H., Terrya N., Searsa T. y van Du K. 1999. Enhanced drought resistance in fructan-producing sugar beet. *Plant Physiology and Biochemistry*. **37**: 313–317.

Pollock C.J. y Cairns A.J. 1991. Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **42**: 77-101.

Pool-Zobel B.L. 2005. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. *British Journal of Nutrition*. **93**: Suppl 1:S73–90.

Puebla A.F., Salerno G.L. y Pontis H.G. 1997. Fructan metabolism in two species of *Bromus* subjected to chilling and water stress. *New Phytologist*. **136**: 123-129.

Ravenscroft N., Cescutti P., Hearshaw M.A., Ramsout R., Rizzo R. y Timme E.M. 2009. Structural Analysis of Fructans from *Agave americana* Grown in South Africa for Spirit Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **57**: 3995–4003.

Rekarte-Cowie I., Ebshish O.S., Mohamed K.S. y Pearce R.S. 2008. Sucrose helps regulate cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*. **59**: 4205–4217.

Reynolds T. y Dweck A.C. 1999. Aloe vera leaf gel: a review update. *Journal of Ethnopharmacology* **68**: 3–37.

Ritsema T. y Smeekens S. 2003. Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology*. **6**: 223-230.

- Roberfroid M.B.** 2002. Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*. **87**: Suppl. 2, S139–S143.
- Salinas C., Huerta C., Ramírez I., Freire M., Delatorre, J. y Cardemil L.** 2010. The effect of water availability and temperature on *Aloe barbadensis* Miller (Aloe vera) physiology, gel production and composition. V Reunión de Biología Vegetal. Olmué, Región de Valparaíso, Chile. 1 al 3 de Diciembre 2010.
- Sauer J., Richter K.K. y Pool-Zobell B.L.** 2007. Products formed during fermentation of the prebiotic inulin with human gut flora enhance expression of biotransformation genes in human primary colon cells. *British Journal of Nutrition*. **97**: 928-937.
- Schellenbaum L., Sprenger N., Schuepp H., Wiemken A. y Boller T.** 1999. Effects of drought, transgenic expression of a fructan synthesizing enzyme and of mycorrhizal symbiosis on growth and soluble carbohydrate pools in tobacco plants. *New Phytologist*. **142**: 67-77.
- Seki M., Umezawa T., Urano K. y Shinozaki K.** 2007. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*. **10**: 296–302.
- Sévenier R., Hall R.D., van der Meer I.M., Hakkert H.J.C., van Tunen A.J. y Koops A.J.** 1998. High level fructan accumulation in a transgenic sugar beet. *Nature Biotechnology* **16**: 843– 846.
- Simpson B.K., Egyankor, K.B. y Martin, A.M.** 1984. Extraction, purification and determination of pectin in tropical fruits. *Journal of Food Processing and Preservation*. **8**: 63–72.
- Sims I.M.** 2003. Structural diversity of fructans from members of the order Asparagales in New Zealand. *Phytochemistry*. **63**: 351–359.
- Smith D., Paulsen G.M., y Raguse C.A.** 1964. Extraction of Total Available Carbohydrates from Grass and Legume Tissue. *Plant Physiology*. **39**: 960-962.
- Spikner J.E. y Towne J.C.** 1962. Fluorometric Microdetermination of Alpha-Keto Acids. *Analytical Chemistry*. **34**: 1468-1471.
- Spollen W.G. y Nelson C.J.** 1988. Characterization of Fructan from Mature Leaf Blades and Elongation Zones of Developing Leaf Blades of Wheat, Tall Fescue, and Timothy. *Plant Physiology*. **88**: 1349-1353.
- Spollen W.G. y Nelson C.J.** 1994. Response of Fructan to Water Deficit in Growing Leaves of Tall Fescue. *Plant Physiology*. **106**: 329-336.

Sprenger N., Bortlik K., Brandt A., Boller T. y Wiemken A. 1995. Purification, cloning, and functional expression of sucrose: fructan 6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. **92**: 11652–11656.

Sprenger N., Schellenbaum L., van Dun K., Boller T. y Wiemken A. 1997. Fructan synthesis in transgenic tobacco and chicory plants expressing barley sucrose:fructan 6-fructosyltransferase. *FEBS Letters*. **400**: 355–358.

Tabaei-Aghdaei S.R., Pearce R.S. y Harrison P. 2003. Sugars regulate cold-induced gene expression and freezing-tolerance in barley cell cultures. *Journal of Experimental Botany*, **54**: 1565-1575.

Taper H.S. y Roberfroid M.B. 2000. Nontoxic Potentiation of Cancer Chemotherapy by Dietary Oligofructose or Inulin. *Nutrition and Cancer*. **38**: 1–5.

Taper H.S. y Roberfroid M.B. 2002. Inulin/oligofructose and anticancer therapy. *British Journal of Nutrition*. **87**: Suppl. 2, 283-286.

Tognetti J.A., Salerno G.L., Crespi M.D. y Pontis H.G. 1990. Sucrose and fructan metabolism of different wheat cultivars at chilling temperatures. *Physiologia Plantarum*. **78**: 554-559.

Tsvetkova N.M., Phillips B.L., Crowe L.M., Crowe J.H., y Risbud S.H. 1998. Effect of Sugars on Headgroup Mobility in Freeze-Dried Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayers: Solid-State ³¹P NMR and FTIR Studies. *Biophysical Journal*. **75**: 2947–2955.

Turula, Jr. V.E., Gore T., Singh S. y Arumugham R.G. 2010. Automation of the Anthrone Assay for Carbohydrate Concentration Determinations. *Analytical Chemistry*. **82**: 1786-1792.

Urias-Silvas J.E., Cani P.D., Delmeé E., Neyrinck A. y López M.G. 2008. Physiological effects of dietary fructans extracted from *Agave tequilana* Gto. and *Dasyilirion* spp. *British Journal of Nutrition*. **99**: 254–261.

Van den Ende W., De Coninck B. y Van Laere A. 2004. Plant fructan exohydrolases: a role in signaling and defense? *TRENDS in Plant Science*. **9**: 523-528.

van der Meer I., Koops A.J., Hakkert J.C. y van Tunen A.J. 1998. Cloning of the fructan biosynthesis pathway of Jerusalem artichoke. *The Plant Journal*. **15**: 489–500.

Van Handel E. 1967. Determination of fructose and fructose-yielding carbohydrates with cold anthrone. *Analytical Biochemistry*. **19**: 193-194.

Valluru R. y Van den Ende W. 2008. Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. *Journal of Experimental Botany*. **59**: 2905–2916.

Vega A., Ampuero N., Díaz L. y Lemus R. 2005. El Aloe Vera (*Aloe Barbadensis* Miller) como componente de alimentos funcionales. *Revista Chilena de Nutrición* (online). **32**: 208-214. [citado 08-07-2011.]

Disponibile en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182005000300005&lng=es&nrm=iso

Verdonk J.M.A.J., Shim S.B., van Leeuwen P. y Verstegen M.W.A. 2005. Application of inulin-type fructans in animal feed and pet food. *British Journal of Nutrition*. **93**: Suppl. 1, S125-S138.

Vereyken I.J, Chupin V., Demel R.A., Smeekens S.C.M. y de Kruijff B. 2001. Fructans insert between the headgroups of phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1510**: 307-320.

Vereyken I.J., van Kuik J.A., Evers, Rijken P.J. y de Kruijff B. 2003. Structural Requirements of the Fructan-Lipid Interaction. *Biophysical Journal*, **84**: 3147–3154.

Vijn I. y Smeekens S. 1999. Fructan: More Than a Reserve Carbohydrate? *Plant Physiology*, **120**: 351–359.

Vijn I., van Dijken A., Luscher M., Bos A., Smeets E., Weisbeek P., Wiemken A., y Smeekens S. 1998. Cloning of sucrose:sucrose 1- fructosyltransferase from onion and synthesis of structurally defined molecules from sucrose. *Plant Physiology*. **117**: 1507–1513.

Vijn I., van Dijken A., Sprenger N., van Dun K., Weisbeek P., Wiemken A. y Smeekens S. 1997. Fructan of the inulin neoseries is synthesized in transgenic chicory plants (*Cichorium intybus* L.) harbouring onion (*Allium cepa* L.) fructan:fructan 6G-fructosyltransferase. *The Plant Journal*. **11**: 387–398.

Vinocur B. y Altman A. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*. **16**: 123–132.

Wack M. y Blaschek W. 2006. Determination of the structure and degree of polymerisation of fructans from *Echinacea purpurea* roots. *Carbohydrate Research* **341**: 1147–1153.

Wang Y. 2009. Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Research International*. **42**: 8–12.

Weaver C.M., Martin B.R., Story J.A., Hutchinson I. y Sanders L. 2010. Novel Fibers Increase Bone Calcium Content and Strength beyond Efficiency of Large Intestine Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **58**: 8952–8957.

Wise C.S., Dimler R.J., Davis H.A. y Rist C.E. 1955. Determination of Easily Hydrolyzable Fructose Units in Dextran Preparations. *Analytical Chemistry*. **27**: 33-35.

Yang J.H., Cao X.H., Wang M., Wu X. y Sun C.X. 2002. Derivatization Reaction of Carbohydrates with Urea as the Reagent and Fluorimetric Determination of Carbohydrates. *Chinese Journal of Chemistry*. **20**: 51-56.

Yemm E.W. y Willis A.J. 1954. The estimation of Carbohydrates in Plant Extracts by Anthrone. *Biochemical Journal*. **57**: 508-514.

York W., Darvill A.G., McNeil M. y Albersheim P. 1985. 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (KDO) is a component of rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in the primary cell wall of plants. *Carbohydrate Research*. **138**: 109-126.

Yoshida Y., Kiyosue T., Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K. y Shinozaki K. 1997. Regulation of Levels of Proline as an Osmolyte in Plants under Water Stress. *Plant Cell Physiology*. **38**: 1095-1102.

Zhang J., Nguyen H. y Blum A. 1999. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Journal of Experimental Botany*. **50**: 291-302.

Página Web: <http://www.demochem.de/D-Fehling-e.htm> Revisado el 30-08-2011.