

Análisis microbiológico de muestras de gel de *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) almacenado a diferente temperatura

D.L. Cortez Sánchez-Álvarez, M. Villarreal-Agüero, M.A. Sáenz-Esqueda, J.J. Martínez-García, R. Minjares-Fuentes

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Av. Artículo 123 s/n, Fracc. Filadelfia, 35010, Gómez Palacio Durango, México. Correo: meliviag@gmail.com

RESUMEN: El gel de *Aloe vera*, considerado una de las materias primas más importantes en la industria de alimentos, farmacéutica y cosmética, es comúnmente contaminado por microorganismos que degradan sus compuestos bioactivos. Es por ello, que el principal objetivo de este estudio es el de analizar microbiológicamente el gel de *Aloe vera*, sin procesamiento, almacenado a diferentes temperaturas. Para esto, se usaron hojas sanas de *Aloe vera* y el gel fue extraído manualmente y envasado en frascos estériles durante 7 días a dos temperaturas: 4 y 26 °C. Las bacterias encontradas fueron analizadas mediante tinción de Gram y las pruebas bioquímicas de catalasa, coagulasa y oxidasa. Al terminar el almacenamiento, se observó crecimiento en el gel. El crecimiento observado fue principalmente de bacterias de tipo *Gram* positivas. Interesantemente se identificaron tres colonias en el gel almacenado a 4 °C mientras que en el gel almacenado a 26 °C solo se encontraron dos. De manera interesante, solo una colonia fue positiva para más de una prueba bioquímica (catalasa y oxidasa), mientras que el resto solo fue positivo para una prueba (catalasa u oxidasa). Estos resultados sugieren la presencia de *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Streptococcus*. Sin embargo, es necesario realizar más pruebas para identificar con mayor certeza las bacterias encontradas.

Palabras clave: Gel de *Aloe vera*, microorganismos, almacenamiento.

ABSTRACT: *Aloe vera* gel, one of the most important raw materials in the food, family and cosmetics industry, is commonly contaminated by microorganisms, which degrade its bioactive compounds. Thus, the main aim of this study is the microbiological analysis of *Aloe vera* gel, without processing, stored at different temperatures. For this, *Aloe vera* leaves were used as a raw material and the gel was extracted manually and packed in sterile bottles for 7 days at two temperatures: 4 and 26 °C. The resulting bacteria were subjected to Gram stain and biochemical (catalase, coagulase and oxidase) tests. At the end of storage, microbial growth in the gel has been observed. The growth originated mainly from *Gram*-positive bacteria. Interestingly, three colonies were identified in the gel stored at 4 °C whereas in the gel stored at 26 °C only two are found. Interestingly, only one colony was positive for a biochemical test (catalase and oxidase), while the rest was a positive test for a test (catalase or oxidase). These results suggested the occurrence of *Staphylococcus*, *Micrococcus* and *Streptococcus*. Further studies are required in order to give an accurate microbial identification.

Key words: *Aloe vera* gel, microorganisms, storage.

Área: Microbiología y biotecnología

INTRODUCCIÓN

El *Aloe vera* ha disfrutado de una larga historia proporcionando una gran variedad de beneficios para la salud, siendo uno de los remedios herbales más utilizados en todo el mundo (Guo y Mei, 2016; Pothuraju *et al.*, 2015). Hay más de 400 especies de *Aloe vera*, pero la más popular y ampliamente utilizada es *Aloe Barbadensis* Miller. El gel de *Aloe vera* contiene entre el 98.5 y 99.5% de agua, y el resto son más de 200 diferentes ingredientes sólidos, que incluyen una combinación de polisacáridos y sus derivados acetilados, glucoproteínas, antraquinonas fenólicas, flavonoides, enzimas, minerales, aminoácidos, esteroides, saponinas y vitaminas (Minjares-Fuentes y Femenia, 2016; Reyes *et al.*, 2012; Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2010). Consecuentemente el *Aloe vera* se ha convertido en una de las materias primas más importantes en la industria alimentaria, debido que es una gran fuente de componentes bioactivos y a la gran cantidad de efectos benéficos en la salud humana atribuidos a su

consumo, por tanto, su uso potencial se enfoca principalmente a el desarrollo de alimentos funcionales (Minjares-Fuentes y Femenia, 2016; Reyes *et al.*, 2012).

El acemanano es el principal polisacárido encontrado en el *Aloe vera* y está compuesto por largas cadenas de manosa parcialmente acetiladas, seguidas de glucosa y galactosa en menor medida (Chokboribal *et al.*, 2015; Chow *et al.*, 2005; Femenia *et al.*, 1999; Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2011; Talmadge *et al.*, 2004). Estos grupos acetilados tienen un papel clave en la propiedades fisicoquímicas y actividad biológica del *Aloe vera* ya que están involucrados en la interacción del polímero con otras biomoléculas, por lo que el acemanano se reporta como la principal sustancia bioactiva presente en el *Aloe vera* (Chokboribal *et al.*, 2015; Minjares-Fuentes y Femenia, 2016). No obstante, el acemanano es inherentemente inestable y puede ser degradado fácilmente por diversos factores fisicoquímicos como cambios en el pH, exposición a altas temperaturas, contaminación bacteriana o actividad enzimática (Javed y Rahman, 2014; Minjares-Fuentes y Femenia, 2016). No obstante, durante la extracción, el procesamiento, o un mal almacenamiento, el gel de *Aloe vera* puede contaminarse con microorganismos normalmente presentes en las hojas, cuyo crecimiento y actividad pueden afectar negativamente la calidad y vida de anaquel del producto terminado al degradar el acemanano (Reyes *et al.*, 2012). En la industria del aloe, la presencia de *Lactobacillus* en las materias primas, en particular en el material mucilaginoso, representa un grave problema, ya que son responsables de la degradación de los polisacáridos de aloe en los jugos frescos (Alvarado-Morales *et al.*, 2019), además gracias a esta fermentación, el acemanano se desacetila dando como resultado la producción de ácido acético. El ácido láctico, componente no natural del *Aloe vera*, es el producto final de la fermentación de *Lactobacillus*. Por lo tanto, un alto contenido de ácido láctico es una característica de calidad negativa de las materias primas de aloe (Bozzi *et al.*, 2007). Sin embargo, no se tiene constancia de que dicho proceso degradativo sea propiciado por bacterias del género *Lactobacillus*, por lo que el principal objetivo de este trabajo fue realizar un análisis microbiológico, preliminar, del gel de *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) almacenado a diferente temperatura y sin ningún procesamiento térmico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la muestra

Se seleccionaron hojas de *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) con un largo de entre 40 y 50 cm, sin daño externo para este estudio. Las hojas fueron lavadas y desinfectadas con detergente. La epidermis fue separada del gel, que fue extraído y homogenizado en una licuadora. El extracto se filtró con un tamiz y se estabilizó durante 8 h a 4 °C. Posteriormente, el extracto fue envasado en frascos estériles de plástico (100 mL) y almacenado durante 7 días a diferente temperatura; 4 ± 1 °C (refrigeración) y 26 °C ± 2 °C (ambiente).

Análisis microbiológico

El análisis microbiológico se llevó a cabo según la norma ISO 4833-1:2013. Para esto, se realizaron diluciones decimales homogenizadas con agua peptonada y se inocularon por duplicado en medio agar cuenta estándar y se incubaron a 37 °C por 48 h. Se analizaron las morfologías coloniales, se realizó el conteo en placa y se identificaron los microorganismos mediante pruebas bioquímicas según tinción de Gram.

Pruebas bioquímicas

Oxidasa: La prueba se realizó con tiras de oxidasa. Con un asa calibrada se tomó el microorganismo a identificar, se colocó en la tira el microorganismo y se esperó a que se tiñera expresando oxidasa positiva u oxidasa negativa.

Catalasa: Esta prueba se realizó en láminas colocando 0.5 mL de peróxido de hidrogeno al 10%, con la ayuda de un asa calibrada se tomó el microorganismo a identificar y se mezcló con el peróxido. Se expresa como positivo si hay un desprendimiento de burbujas y negativo si no las hay.

Coagulasa: La prueba se realizó extrayendo suero sanguíneo de tubos con anticoagulante (EDTA). En un tubo roscado de 13 x 150 mL se puso 0.5 mL del suero sanguíneo y con un asa calibrada se colocó el microorganismo a identificar. Se incubó la muestra a 37°C por un lapso de 24 h; se realizaron lecturas a los 15, 30 y 45 min; la formación coagulo se expresó como coagulasa positiva, en caso contrario se leyó a 24 h. La ausencia de coagulo se indicó como coagulasa negativo (-).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **Tabla 1** muestra los resultados obtenidos del aislamiento de diferentes colonias encontradas en el gel de *Aloe vera* almacenada a diferente temperatura. Como se puede observar, el gel que fue almacenado en refrigeración presentó 3 diferentes colonias mientras que la muestra almacenada a temperatura ambiente solo se observó el crecimiento de dos colonias diferentes. Cabe señalar que las observaciones bajo el microscopio, así como la tinción de *Gram*, reveló la presencia de bacterias de tipo Cocos positivos (Ver **Figura 1**). Es importante destacar que no se detectó la presencia de hongos en las muestras durante el tiempo estudiado. Estos resultados son similares a los obtenidos por Vega-Gálvez *et al.*, (2012) quienes solo observaron crecimiento de bacterias y ausencia de hongos.

Por otra parte, los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas mostraron una amplia variedad de resultados, sugiriendo la presencia de diferentes tipos de bacterias *Gram* positivas. Respecto a esto, se observó que al menos una de las colonias encontradas en el gel almacenado en refrigeración fue positiva solamente a la prueba de la oxidasa. Así mismo, al menos una de las colonias encontradas en la misma muestra mostro resultado positivo para catalasa, siendo negativa para las otras dos pruebas restantes. Finalmente, solo una colonia mostró ser resultados positivos para catalasa y oxidasa.

Tabla 1. Descripción de los microorganismos presentes en gel de *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) almacenado a diferente temperatura.

Temperatura	Morfología	No. de colonias (UFC /mL)	Tinción de <i>Gram</i> (+ / -)	Catalasa (+ / -)	Coagulasa (+ / -)	Oxidasa (+ / -)
4 °C	Fusiforme, Plana, Entera, Crema	47 x 10 ⁴	cocos +	-	-	+
	Circular, Plana, Entera, Amarilla	19 x 10 ³	cocos +	+	-	-
	Puntiforme, Convexa, Entera, Blanca	38 x 10 ⁴	cocos +	+	-	+
26 °C	Fusiforme, Plana, Entera, Crema	36 x 10 ⁵	cocos +	-	-	+

Puntiforme, Convexa, Entera, Blanca	33 x 10 ⁵	cocos +	+	-	+
--	----------------------	---------	---	---	---

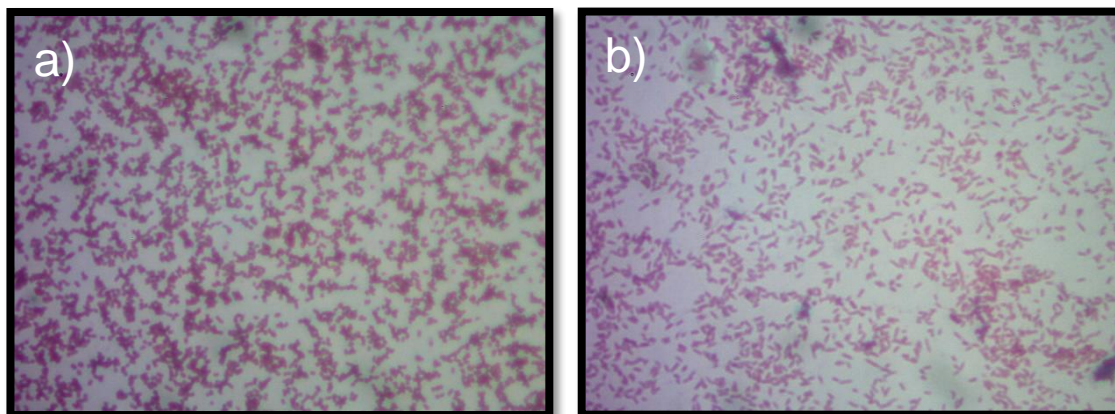
^aLa morfología fue descrita bajo los siguientes parámetros: Forma, Elevación, Margen y Color

Por el contrario, en el gel almacenado a temperatura ambiente, solo se detectaron dos tipos de colonias. Siendo solo una de ellas positiva a las pruebas de catalasa y oxidasa, mientras que la colonia restante solo fue positiva para la prueba de la oxidasa (**Tabla 1**).

Estos resultados sugieren la presencia de tres tipos de bacterias en el gel de *Aloe vera*: *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Streptococcus*. Estos resultados son similares a los observados por Reyes *et al.*, (2012) quienes reportaron un microorganismo en similitud con el encontrado en este extracto que resulta ser la colonia amarilla *Gram* positiva presuntamente *Micrococcus*. El presunto *Micrococcus* no se encontró en un ambiente cálido, además de haber tenido la menor cantidad de UFC en las condiciones expuestas. Por otra parte, los *Streptococcus* fueron los microorganismos más abundantes, presentándose en ambas condiciones. Los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos son coincidentes con los de Reyes *et al.*, (2012) ya que ellos reportan la predominancia de bacterias *Gram* positivas.

Por otra parte, Bozzi *et al.* (2007) sugirió que la producción de ácido láctico en el *Aloe vera* es producida por bacterias ácido lácticas, específicamente *Lactobacillus*, los cuales degradan el acemanano, no obstante, en el presente trabajo solo se encontraron diversos tipos de cocos, que también resultan ser bacterias fermentativas y posibles causantes de la degradación del acemanano a ácido acético.

Es por ello que González *et al.*, (2008) recomiendan someter el gel de *Aloe vera* a un tratamiento previo a su utilización con el objetivo de reducir la carga microbiológica, ya que las operaciones de lavado y desinfectado de las hojas de *Aloe vera* no es un método efectivo para contrarrestar los microorganismos presentes.



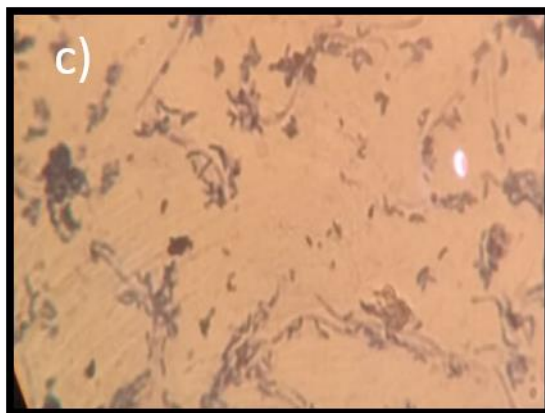


Figura 1. Imágenes obtenidas del microscopio óptico de las diferentes colonias de microorganismos presentes en el gel de *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) almacenado a diferente temperatura: (a) *Staphylococcus*; (b) *Micrococcus*; (c) *Streptococcus*

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos de las pruebas realizadas reflejan la existencia y total prevalencia de microorganismos cocos *Gram* positivos. Estos resultados sugieren la presencia de bacterias tales como *Micrococcus*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*, siendo estos capaces de llevar a cabo un proceso fermentativo. No obstante, se requiere de más pruebas para corroborar dicha información.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado-Morales, G., Minjares-Fuentes, R., Contreras-Esquivel, J.C., Montañez, J., Meza-Velázquez, J.A., Femenia, A., 2019. Application of thermosonication for *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) juice processing: Impact on the functional properties and the main bioactive polysaccharides. *Ultrasonics Sonochemistry* 56, 125-133.
- Bozzi, A., Perrin, C., Austin, S., Arce Vera, F., 2007. Quality and authenticity of commercial *Aloe vera* gel powders. *Food Chemistry* 103, 22-30.
- Chokboribal, J., Tachaboonyakiat, W., Sangvanich, P., Ruangpornvisuti, V., Jettanacheawchankit, S., Thunyakitpibal, P., 2015. Deacetylation affects the physical properties and bioactivity of acemannan, an extracted polysaccharide from *Aloe vera*. *Carbohydrate Polymers* 133, 556-566.
- Chow, J.T.-N., Williamson, D.A., Yates, K.M., Goux, W.J., 2005. Chemical characterization of the immunomodulating polysaccharide of *Aloe vera* L. *Carbohydrate research* 340, 1131-1142.
- Femenia, A., Sánchez, E.S., Simal, S., Rosselló, C., 1999. Compositional features of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. *Carbohydrate polymers* 39, 109-117.
- González, B.A., Domínguez-Espinosa, R., Alcocer, B.R., 2008. Use of *Aloe vera* juice as substrate for growth of *Lactobacillus plantarum* and *L. casei*. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 6, 152-157.
- Guo, X., Mei, N., 2016. *Aloe vera* – A Review of Toxicity and Adverse Clinical Effects.
- Javed, S., Rahman, A.-u., 2014. *Aloe vera* Gel in Food, Health Products, and Cosmetics Industry, pp. 261-285.
- Minjares-Fuentes, J., Femenia, A., 2016. Effect of Processing on the Bioactive Polysaccharides and Phenolic Compounds from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller): From Plant to Gut, pp. 263-287.
- Pothuraju, R., Sharma, R.k., Onteru, S., Singh, S., Hussain, A., 2015. Hypoglycemic and Hypolipidemic Effects of *Aloe vera* Extract Preparations: A Review.
- Reyes, J.E., Guanoquiza, M.I., Tabilo-Munizaga, G., Vega-Galvez, A., Miranda, M., Pérez-Won, M., 2012. Microbiological stabilization of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) gel by high hydrostatic pressure treatment. *International Journal of Food Microbiology* 158, 218-224.
- Rodríguez-Gonzalez, V., Femenia, A., Gonzalez-Laredo, R., Rocha-Guzman, N., Gallegos-Infante, J., Candelas-Cadillo, M., Ramirez-Baca, P., Simal, S., Rossello, C., 2011. Effects of pasteurization on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from *Aloe barbadensis* Miller. *Carbohydrate polymers* 86, 1675-1683.
- Rodríguez-Rodríguez, E.M., Darias-Martín, J., Díaz, C., 2010. *Aloe vera* as a Functional Ingredient in Foods.

- Talmadge, J., Chavez, J., Jacobs, L., Munger, C., Chinnah, T., Chow, J.T., Williamson, D., Yates, K., 2004. Fractionation of *Aloe vera* L. inner gel, purification and molecular profiling of activity. *International Immunopharmacology* 4, 1757-1773.
- Vega-Gálvez, A., Giovagnoli, C., Pérez-Won, M., Reyes, J.E., Vergara, J., Miranda, M., Uribe, E., Di Scala, K., 2012. Application of high hydrostatic pressure to *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) gel: microbial inactivation and evaluation of quality parameters. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 13, 57-63.