



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Determinación de la capacidad
antioxidante del gel de
Aloe vera

TESIS

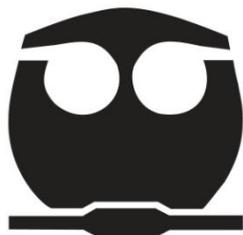
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

ROSA MARINA ZAVALETA ROMERO

MÉXICO, D.F., 2012.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Perla Carolina Castañeda López.

VOCAL: Dra. Sobeida Sánchez Nieto.

SECRETARIO: Dr. José Pedraza Chaverrí.

1er. SUPLENTE: Dra. María Elena Bravo Gómez.

2° SUPLENTE: Dra. Vanessa Rebeca Maya Ampudia.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 209 EDIF. "F", FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. José Pedraza Chaverrí.

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Omar Noel Medina Campos.

SUSTENTANTE:

Rosa Marina Zavaleta Romero.

CONTENIDO

CAPÍTULO 1.	INTRODUCCIÓN	11
	1.1. Especies reactivas de oxígeno	11
	1.2. Estrés oxidante.....	13
	1.3. Antioxidantes	15
	1.4. <i>Aloe vera</i>	17
CAPÍTULO 2.	ANTECEDENTES	20
	2.1. El <i>Aloe</i> como antioxidante.....	20
	2.2. Estudios en animales	20
	2.3. Estudios <i>in vitro</i>	20
CAPÍTULO 3.	JUSTIFICACIÓN	23
CAPÍTULO 4.	OBJETIVOS	23
	4.1. Objetivo general	23
	4.2. Objetivos particulares	23
CAPÍTULO 5.	HIPÓTESIS	23
CAPÍTULO 6.	MATERIALES Y MÉTODOS	24
	6.1. Reactivos	24
	6.2. Métodos	24
	6.2.1. Determinación de la concentración del gel de <i>Aloe vera</i>	24
	6.2.2. Neutralización de ROO [•]	25
	6.2.3. Inactivación de ¹ O ₂	27
	6.2.4. Atrapamiento de O ₂ ^{•-}	28
	6.2.5. Reducción de DPPH [•]	29
	6.2.6. Atrapamiento de HOCl	30
	6.2.7. Atrapamiento de OH [•]	31
	6.2.8. Neutralización de ONOO ⁻	32

CAPÍTULO 7.	RESULTADOS	33
	7.1. Concentración del gel de <i>Aloe vera</i>	33
	7.2. Neutralización de ROO [•]	34
	7.3. Inactivación de ¹ O ₂	35
	7.4. Atrapamiento de O ₂ ^{-•}	37
	7.5. Reducción de DPPH [•]	39
	7.6. Atrapamiento de HOCl	41
	7.7. Atrapamiento de OH [•]	41
	7.8. Neutralización de ONOO ⁻	41
CAPÍTULO 8.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	43
	8.1. Neutralización de ROO [•]	43
	8.2. Atrapamiento de O ₂ ^{-•}	44
	8.3. Reducción de DPPH [•]	44
	8.4. Inactivación de ¹ O ₂	44
	8.5. Atrapamiento de HOCl	44
	8.6. Atrapamiento de OH [•]	45
	8.7. Neutralización de ONOO ⁻	45
CAPÍTULO 9.	CONCLUSIONES	46
CAPÍTULO 10.	PERSPECTIVAS	46
CAPÍTULO 11.	REFERENCIAS	47

LISTA DE ABREVIATURAS

¹O₂ : oxígeno singlete	GPx : glutatión peroxidasa
AAPH : dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)	GR : glutatión reductasa
ABTS : ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)	GSH : glutatión (forma reducida)
Arg : arginina	GSSG : glutatión (forma oxidada)
ABC : área bajo la curva	GST : glutatión S-transferasa
CAT : catalasa	H⁺ : protón
CI₅₀ : concentración inhibitoria 50	HO : hemo oxigenasa
DCF : diclorofluoresceína	iNOS : sintasa del óxido nítrico
DCDHF : diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína	NADG : ácido nordihidroguayarático
DFBF : 1,3-difenil-isobenzofurano	NADH : Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
DMTU : N,N-dimetiltiourea	NADPH : Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
DNA : ácido desoxirribonucleico	NBT : nitroazul de tetrazolio
DO : densidad óptica	NQO1 : NADPH quinona óxidoreductasa 1
DPPH[•] : radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo	O₂ : dióxígeno
DTNB : ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico)	O₂^{•-} : anión superóxido
DTPA : ácido dietilentriaminopentaacético	OH[•] : radical hidroxilo
e⁻ : electrón	OH⁻ : anión hidroxilo
EDTA : ácido etilendiaminotetraacético	ONOO⁻ : anión peroxinitrito
ER : especie reactiva	ORAC : capacidad de absorber radicales derivados del oxígeno
ERN : especie reactiva de nitrógeno	SOD : superóxido dismutasa
ERO : especie reactiva de oxígeno	PRx : peroxirredoxinas
FRAP : poder antioxidante de reducir al ion férrico.	TBARS : sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
	TNB : ácido 5-tio-2-nitrobenzoico
	XO : xantina oxidasa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Producción de especies reactivas de oxígeno a partir del dióxígeno.

Figura 2. Interacción de especies reactivas de oxígeno con algunos antioxidantes.

Figura 3. Estructura química de algunas de las sustancias presentes en el gel de *Aloe vera*.

Figura 4. Oxidación de la fluoresceína por el radical peroxilo, producción del radical fluorescenil y dimerización del radical a productos propuestos (Bisby *et al.*, 2008).

Figura 5. Generación de oxígeno singulete.

Figura 6. Oxidación del 1,3-difenil-isobenzofurano por el oxígeno singulete (Howard y Mendenhall, 1975).

Figura 7. Generación de anión superóxido por medio del sistema xantina-xantina oxidasa y su detección por medio de la reducción del nitroazul de tetrazolio.

Figura 8. Reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (Villaño *et al.*, 2007).

Figura 9. Oxidación del ácido 5-tio-2-nitrobenzoico por el ácido lipoico (Landino *et al.*, 2008).

Figura 10. Reacción de Fenton.

Figura 11. Producción de 2-hidroxitereftalato a partir de tereftalato y el radical hidroxilo (Qu *et al.*, 2000).

Figura 12. Producción de diclorofluoresceína por la oxidación del diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína por el anión peroxinitrito (Crow, 1997).

Figura 13. Determinación de la capacidad del gel de *Aloe vera* y de Trolox de neutralizar al radical peroxilo.

Figura 14. Determinación de la capacidad del gel de *Aloe vera* de inactivar al oxígeno singulete.

Figura 15. Determinación de la capacidad del ácido nordihidroguayarético de inactivar al oxígeno singulete.

Figura 16. Efecto del gel de *Aloe vera* sobre la generación de ácido úrico en el sistema xantina-xantina oxidasa.

Figura 17. Determinación de la capacidad del gel de *Aloe vera* de atrapar al anión superóxido.

Figura 18. Determinación de la capacidad del ácido ascórbico de atrapar al anión superóxido.

Figura 19. Determinación de la capacidad del gel de *Aloe vera* para reducir al radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.

Figura 20. Determinación de la capacidad del ácido ascórbico para reducir al radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los antioxidantes (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Tabla 2. Componentes del gel de *Aloe vera* (Calderón-Oliver *et al.*, 2011).

Tabla 3. Propiedades antioxidantes del gel de *Aloe vera*.

Tabla 4. Determinación de la concentración del gel de *Aloe vera*.

Tabla 5. Atrapamiento máximo del gel de *Aloe vera* sobre especies reactivas de oxígeno en las cuales no se alcanzó un mínimo de 50% de atrapamiento.

Tabla 6. Concentración inhibitoria 50 (CI50) del gel de *Aloe vera* y de antioxidantes de referencia sobre diferentes especies reactivas de oxígeno.

RESUMEN

Debido a que en México se tiene un alto índice de patologías derivadas del desbalance redox y a los elevados costos de sus tratamientos, es necesaria la búsqueda de sustancias naturales y de bajo costo que contrarresten el estrés oxidante y que prevengan o atenúen la magnitud de las patologías asociadas a esta condición.

Dentro de la medicina tradicional se han utilizado productos naturales para el tratamiento y profilaxis de diversas afecciones. Uno de estos productos es el *Aloe vera*, el cual presenta actividad antiinflamatoria, hipoglucémica y antioxidante, entre otras. Sin embargo, aún no se ha caracterizado su actividad antioxidante específica sobre las especies reactivas (ER) oxígeno singulete, ácido hipocloroso y anión peroxinitrito.

En este trabajo se determinó la capacidad de neutralización o inactivación así como la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) del *Aloe vera* sobre las ER anión superóxido, oxígeno singulete, radical difenil-1-picrilhidrazilo, radical hidroxilo, ácido hipocloroso y anión peroxinitrito, además del atrapamiento de radicales peroxilo mediante ensayos en los que se agregaron o generaron dichas ER.

Las CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) resultantes fueron las siguientes: oxígeno singulete: 17.17 ± 1.15 , anión superóxido 163.03 ± 2.57 y radical difenil-1-picril hidrazilo: 2897.32 ± 201.16 . Se obtuvo una equivalencia de 1.17 ± 0.12 mg de Trolox/mg de gel de *Aloe vera* (peso seco) sobre la capacidad de inactivar al radical peroxilo. Para las ER radical hidroxilo, ácido hipocloroso y anión peroxinitrito, no se alcanzó un mínimo de 50% de atrapamiento, por lo que no fue posible calcular sus CI_{50} .

Se concluye que el gel de *Aloe vera* es un antioxidante que puede neutralizar o inactivar ER, por lo que puede ser utilizado como auxiliar en la profilaxis o en el tratamiento de enfermedades que resultan del estrés oxidante.

INTRODUCCIÓN

1.1. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

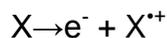
Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son moléculas más reactivas que el oxígeno que se generan en los organismos aerobios como producto del metabolismo celular y desempeñan un papel fisiológico importante en la señalización celular (Fialkow *et al.*, 2007) aunque su sobreproducción puede causar daño a diversas biomoléculas (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverrí, 2006).

La generación de ERO se puede llevar a cabo de manera enzimática y no enzimática; entre las enzimas que participan en la producción de ERO se encuentran la NADPH oxidasa, la mieloperoxidasa, la forma inducible de la sintasa del óxido nítrico (iNOS), las oxigenasas dependientes de citocromo P-450 y la xantina oxidasa (XO) (de Vries *et al.*, 2008). La generación no enzimática de ERO ocurre principalmente en la mitocondria, particularmente en los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones (Turrens, 2003).

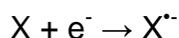
Las ERO incluyen radicales libres (como el anión superóxido) y no radicales libres (como el peróxido de hidrógeno). La alta reactividad de las ERO se debe a que son moléculas incompletamente reducidas o a que tienen una distribución electrónica diferente a la del oxígeno en su estado basal.

Un radical libre puede definirse como cualquier especie química capaz de existir independientemente y que posea uno o más electrones desapareados (que ocupen un orbital molecular o atómico por sí mismos). Esto provoca que sean altamente reactivos además de ser ligeramente atraídos a un campo magnético.

Los radicales libres pueden formarse por la pérdida de un electrón (e^-) de una especie no radical:



O por la ganancia de un e^- de una especie no radical (Halliwell y Gutteridge, 2007):



La adición secuencial de e^- al oxígeno molecular (dioxígeno) origina ERO (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverrí, 2006); la adición de un e^- al dioxígeno

1.2. ESTRÉS OXIDANTE

El estrés oxidante es una alteración en el equilibrio entre las moléculas oxidantes y las antioxidantes a favor de las primeras y tiene el potencial de inducir daño celular mediante la interacción de las moléculas oxidantes con biomoléculas, tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Halliwell y Gutteridge, 2007).

En condiciones fisiológicas los niveles celulares de ERO se encuentran en equilibrio con los de las sustancias antioxidantes, sin embargo, cuando las células están expuestas continuamente a una cantidad de ERO mucho más alta que aquella que su capacidad antioxidante puede neutralizar, se producen efectos deletéreos en sus componentes, conduciéndolas a necrosis o apoptosis (van Muiswinkel y Kuiperij, 2005; revisado por de Vries *et al.*, 2008).

Para contrarrestar los efectos de las ERO, las células poseen mecanismos de defensa tales como la síntesis de moléculas antioxidantes no enzimáticas entre las que se incluyen bilirrubina (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverrí, 2006) y glutatión (GSH) y la síntesis de enzimas como glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión-S-transferasa (GST), glutatión reductasa (GR) y hemo oxigenasa (HO) (Tabla 1), que inactivan o transforman a las ERO en productos menos tóxicos para facilitar su degradación, regenerar antioxidantes o generar compuestos oxidantes a partir de moléculas orgánicas tales como el peróxido orgánico (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverrí, 2006).

La actividad de estas enzimas modula la concentración de ERO y por lo tanto el estrés y el daño oxidante. Un ejemplo de esto es la conversión de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 y O_2 por medio de las isoformas de la SOD (una dependiente de manganeso y otra dependiente de cobre y de zinc) (Fridovich, 1995), a su vez, el H_2O_2 es convertido a agua por medio de peroxidasas como la GPx, la CAT y las peroxirredoxinas (PRx) o puede difundirse libremente a través de las membranas biológicas y causar daño severo a las macromoléculas celulares, pues en presencia de metales de transición como el hierro y el cobre, favorece la generación de OH^{\cdot} (Gilbert *et al.*, 1997), que se considera como una de las moléculas oxidantes más

potentes y reactivas en la naturaleza (Gilbert *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 2005). Cabe mencionar que aún no se conocen enzimas que neutralicen a esta ER de manera específica. Otro ejemplo de esto es la regeneración de la forma reducida del GSH a partir de su forma oxidada (GSSG) por la GR, utilizando NADPH como fuente de poder reductor (**Figura 2**).

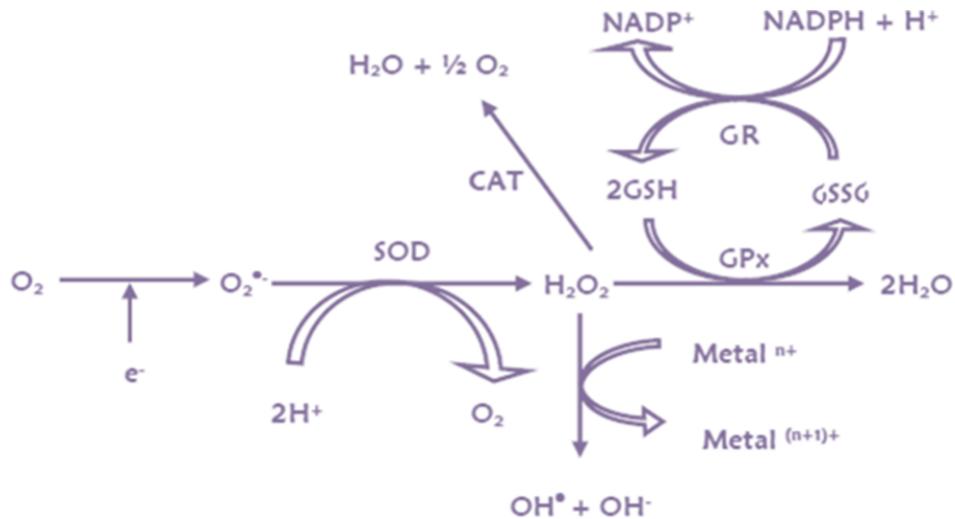


FIGURA 2. INTERACCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO CON ALGUNOS ANTIOXIDANTES.

CAT: catalasa, e^- : electrón, GPx: glutatión peroxidasa, GR: glutatión reductasa, GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado, H^+ : protón, H_2O : agua, H_2O_2 : peróxido de hidrógeno, n: número de oxidación, NADP⁺: nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada), NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida), O_2 : dióxígeno, $O_2^{\bullet-}$: anión superóxido, OH^- : anión hidroxilo, OH^{\bullet} : radical hidroxilo, SOD: superóxido dismutasa.

1.3. ANTIOXIDANTES

Un antioxidante es cualquier sustancia que retarda o previene significativamente la oxidación de un sustrato (Halliwell y Gutteridge, 2007) por medio de la inhibición de la iniciación o propagación de esta reacción, actuando por uno o más de los siguientes mecanismos: atrapamiento de la ER, quelando a un ion metálico, reduciendo o inactivando a la ER.

Los antioxidantes pueden clasificarse de acuerdo a su función (**Tabla 1**) o a su participación en la inhibición del proceso de oxidación.

TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES (HALLIWELL Y GUTTERIDGE, 2007).

Tipo de antioxidante	Ejemplos
Agentes que catalíticamente remueven ER.	SOD, CAT, peroxidasas y antioxidantes específicos para el grupo tiol.
Proteínas que abaten la disponibilidad de pro-oxidantes tales como los iones Fe(II), Cu(II) y el grupo hemo.	Transferrina, ferritina, haptoglobinas, hemopexina, metalotioneína y ceruloplasmina.
Proteínas que protegen biomoléculas contra el daño por otros mecanismos.	Proteína de choque térmico
Agentes de bajo peso molecular que atrapan ERO y ERN.	Glutación, α -tocoferol, bilirrubina, ácido úrico, ácido ascórbico (vitamina C).

CAT: catalasa, ER: especie(s) reactiva(s), ERO: especie(s) reactiva(s) de oxígeno, ERN: especie(s) reactiva(s) de nitrógeno, SOD: superóxido dismutasa.

De acuerdo a la participación de los antioxidantes en el proceso de oxidación de un sustrato, estos pueden clasificarse en primarios o secundarios:

Los antioxidantes primarios son aquellos que inhiben o retardan la oxidación atrapando ER tales como OH^\bullet , O_2^\bullet , NO, grupos tiol (R-SH) y el radical peroxilo (ROO^\bullet); a las cuales el antioxidante les dona H^+ o e^- , lo que convierte a estas ER en productos más estables.

Por otro lado, los antioxidantes secundarios actúan mediante diversos mecanismos, entre los que se incluyen la conversión de H_2O_2 en especies no radicales, la absorción de radiación ultravioleta, la desactivación de $^1\text{O}_2$, o el enlace con un ion metálico (Maisuthisakul *et al.*, 2007)

La actividad antioxidante de una sustancia se determina por medio de reacciones que se llevan a cabo por la mezcla de

- a) concentraciones crecientes del compuesto o extracto de prueba,
- b) la ER a inhibir (o un sistema generador de la misma) y
- c) un sistema para detectar a la ER.

Existen muchas técnicas para detectar ER, entre las que se encuentran la reducción del citocromo c o del nitroazul de tetrazolio (NBT), la resonancia del espín electrónico, la fluorescencia, la quimioluminiscencia, la hidroxilación de salicilatos y la nitración de fenilalanina (Halliwell y Gutteridge, 2007).

La actividad antioxidante de una sustancia se hace evidente cuando su presencia disminuye la concentración de la ER. La capacidad antioxidante de un compuesto puede ser directa o indirecta. La directa se refiere a que el compuesto reacciona y neutraliza a la ER, mientras que la indirecta indica el efecto de inducir la expresión de enzimas que inactivan a la ER o que participan en la síntesis de antioxidantes no enzimáticos.

1.4. ALOE VERA

El *Aloe vera* Linné, también conocida como *Aloe barbadensis* Miller o *Aloe vulgaris* Lamark y comúnmente llamado sábila, es una planta perteneciente a la familia *Aloaceae* y es originaria de las regiones áridas de África, Asia, Europa del este y del Mediterráneo (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2010; Reynolds, 2004) y su cultivo se ha implementado en México, China y Estados Unidos, entre otros países (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2010).

Desde generaciones atrás, en la medicina tradicional se han utilizado productos naturales como profiláctico y tratamiento de diversas enfermedades, lesiones y trastornos (OMS, 2005); entre estos productos se encuentra el *Aloe*. En estudios recientes se ha determinado que el *Aloe* tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antibacterianas e hipoglucémicas, entre otras (Calderón-Oliver *et al.*, 2011), y se ha descrito la composición y estructura química de algunos de los compuestos presentes en diversas especies de *Aloe* (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2010; Reynolds, 2004) así como su mecanismo de acción sobre diversas afecciones (Pandey y Mishra, 2010; Park *et al.*, 2009).

En diferentes trabajos se ha demostrado que el *Aloe* es benéfico en el tratamiento de la diabetes, la obesidad, problemas gástricos, quemaduras, heridas, daños en la piel, problemas bucales y hepáticos, enfermedades oculares y cáncer; y se ha propuesto que el consumo de *Aloe vera* disminuye la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina (un compuesto usado en tratamientos contra el cáncer), los síntomas del síndrome de ovario poliquístico, el crecimiento de diferentes cepas de *Mycobacterium*, la infiltración mononuclear en el sistema nervioso central y los niveles de óxido nítrico y de interferón gama en la esclerosis múltiple y que aumenta la viabilidad de los macrófagos en presencia de *Candida albicans* (revisado por Calderón-Oliver *et al.*, 2011). Además se ha informado que el gel de *Aloe vera* contiene enzimas antioxidantes tales como SOD, CAT, GPx y otras peroxidasa (Sabeh *et al.*, 1993; Sabeh *et al.*, 1996; Esteban *et al.*, 2000), lo cual podría tener un papel importante en la disminución del estrés oxidante al aplicar el gel de *Aloe vera* de manera local en heridas o lesiones.

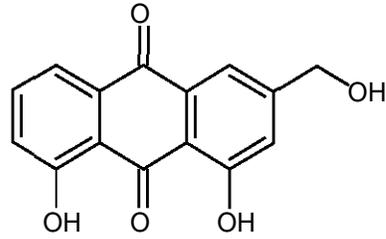
Actualmente se han descrito los efectos medicinales de solo algunas de las más de 360 especies de *Aloe*; entre ellas: *Aloe arborescens* Miller, *Aloe perryi* Baker, *Aloe ferox* Miller o *Aloe capensis* y *Aloe vera* Linné (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2010). De todas ellas, el *Aloe vera* es la especie más estudiada y utilizada en preparaciones farmacéuticas, medicamentos y suplementos alimenticios.

En la mayoría de los estudios del *Aloe* se hace referencia al gel de *Aloe*, un extracto obtenido de las hojas de *Aloe* que contiene de 98.5% a 99.5% de agua con un pH de 4.4 a 4.7 y de 0.5% a 1.5% de una mezcla de antracenos, cromonas (aloesona, aloesol, aloesina), antraquinonas (aloe-emodina), glucomananos, acemananos, monosacáridos libres, ácido salicílico, minerales y flavonoides (aloenina, naringenina, apigenina) (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2010; Anilakumar *et al.*, 2010) (Tabla 2 y Figura 3).

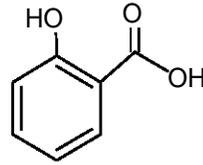
TABLA 2. COMPONENTES DEL GEL DE ALOE VERA (CALDERÓN-OLIVER *et al.*, 2011).

Componente	Porcentaje y características
Agua/humedad	98.5-99.5%, pH 4-5
Carbohidratos	0.25% (25-50% en peso seco)
Polisacáridos solubles	Glucomananos y acemananos
Monosacáridos libres	Manosa, glucosa, galactosa
Contenido de nitrógeno	0.013%
Aminoácidos	18 (7 de los 8 esenciales; 20% Arg)
Lectinas	Aloctina A, aloctina B
Enzimas	Bradicianasa, carboxipeptidasa, SOD, CAT y GPx
Glicoproteínas	
Vitaminas	Ácido ascórbico, complejo B, carotenoides, tocoferoles
Minerales y elementos traza	24-25% en peso seco. K, Cl, Ca, Mg, P, Fe, Cu, Zn, Mn, Al, Se, Cr
Ácidos orgánicos	Ácido salicílico, málico, láctico, acético y succínico
Compuestos fenólicos	Antraquinonas, aloína A y B, aloe-emodina, aloenina, aloesina, aloeresina, entre otras.
Fitoesteroles.	β -sitosterol, campesterol
Otros compuestos	Hidrocarburos alifáticos, ésteres de cadena larga, compuestos volátiles (cetonas y aldehídos)

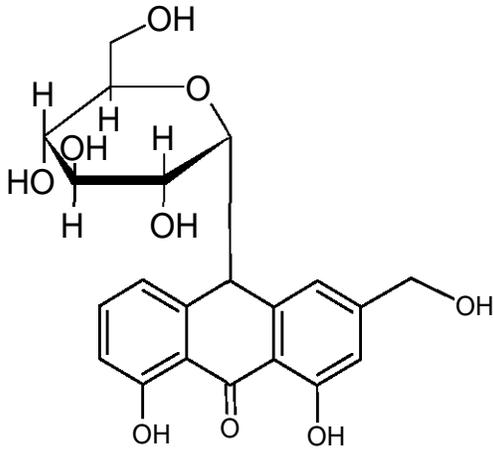
Arg: arginina, CAT: catalasa, SOD: superóxido dismutasa, GPx: glutatión peroxidasa.



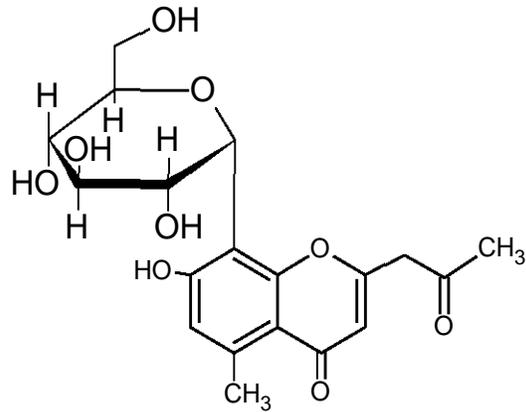
Aloe-emodina



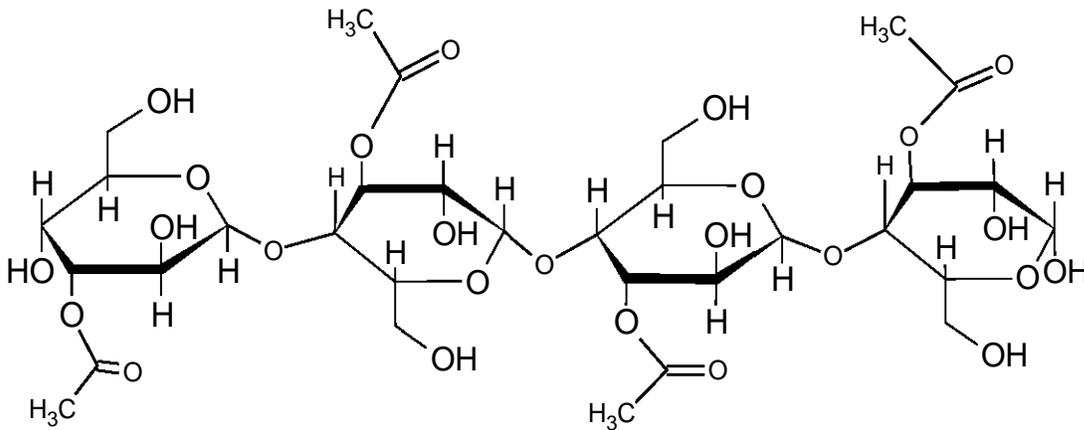
Ácido salicílico



Aloína o barbaloina



Aloesina o aloeresina



Acemanano

FIGURA 3. ESTRUCTURA QUÍMICA DE ALGUNAS DE LAS SUSTANCIAS PRESENTES EN EL GEL DE *ALOE VERA*.

ANTECEDENTES

2.1. EL *ALOE* COMO ANTIOXIDANTE

Diversos estudios tanto *in vitro* como en animales de experimentación, evidencian que el *Aloe vera* puede disminuir o prevenir el estrés oxidante y el daño celular consecuente, debido a su capacidad antioxidante directa o indirecta.

2.2. ESTUDIOS EN ANIMALES

El consumo del extracto de *Aloe* (30 y 60 $\mu\text{L}/\text{día}/14$ días) en ratones, aumenta la cantidad del antioxidante GSH y la actividad de las enzimas antioxidantes GST, NADPH quinona óxido reductasa 1 (NQO1), SOD, CAT, GPx y GR en hígado y GST, SOD y CAT en pulmón, riñón y estómago de ratones (Singh *et al.*, 2000). El consumo de una dieta suplementada con un extracto etanólico de *Aloe vera* al 2% previene alteraciones en las enzimas antioxidantes GPx, GR y SOD en el hígado de ratas, además de aumentar la actividad de dichas enzimas (Anilakumar *et al.*, 2010). También se ha demostrado que la administración oral del gel de *Aloe vera* (100 y 200 mg/kg/10 días) a ratas disminuye la oxidación de los lípidos del tejido cardíaco inducida por doxorubicina y previene los cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT y de los niveles de GSH en corazón y plasma (Kaithwas *et al.*, 2011) (**Tabla 3**).

2.3. ESTUDIOS *IN VITRO*

El análisis de la capacidad antioxidante del gel de *Aloe vera* mediante la inactivación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH^{*}) hizo evidente que el gel de *Aloe vera* es más efectivo (72.19%) que otros antioxidantes tales como el butilhidroxitolueno (70.52%) (un antioxidante sintético utilizado en un amplio rango de productos con contenido graso para prevenir la rancidez) y el α -tocoferol (65.20%) (un antioxidante natural) (Hu *et al.*, 2003).

Se ha propuesto que esto se debe a la presencia de algunos compuestos como las coumaroilaloesinas, feruloilaloesinas (Beppu *et al.*, 2003), barbaloína, aloesina e isorabaicromona (Yagi *et al.*, 2002).

Mediante este mismo ensayo se ha demostrado la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos y acuosos de la hoja de *Aloe vera* (Kammoun *et al.*, 2011), así como de los extractos de otras especies de *Aloe*, como el *Aloe harlana* Reynolds que redujo al DPPH' con una CI_{50} de 26 mM debido a la presencia de los compuestos metilaloeresina y aloína (Asamenew *et al.*, 2011) (**Tabla 3**).

TABLA 3. PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DEL GEL DE *ALOE VERA*.

Efecto del extracto o compuesto del <i>Aloe</i>	Dosis y/o concentración
ESTUDIOS EN ANIMALES	
El gel de <i>Aloe vera</i> al 30% disminuye la lipoperoxidación y previene la disminución de CAT y SOD en sangre y en tejido cardiaco y aumenta el contenido de GSH en tejido cardiaco de ratas albinas tratadas con estreptozotocina.	200 mg/kg/día/20 días, vía oral (Jain <i>et al.</i> , 2010).
El gel de <i>Aloe vera</i> disminuye la lipoperoxidación y previene la disminución de la actividad de SOD, CAT y GSH en sangre y en tejido cardiaco de ratones tratados con doxorubicina.	100 y 200 mg/kg/día/10 días, vía oral (Kaithwas <i>et al.</i> , 2011).
El extracto de la hoja de <i>Aloe vera</i> previene la lipoperoxidación y la disminución de la actividad de CAT y SOD y del nivel de GSH en hígado y en sangre de ratones albinos radiados.	1 g/kg/día /15 días, vía oral (Goyal y Gehlot, 2009).
El gel de <i>Aloe vera</i> disminuye el estrés oxidante (formación de lipoperoxidos y dienos conjugados) y previene la disminución en la actividad de CAT, SOD y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en hígado de ratas tratadas con azoximetano.	Dieta con 2% de extracto de <i>Aloe vera</i> /día/30 días (Anilakumar <i>et al.</i> , 2010).
El extracto fresco de la pulpa de la hoja <i>Aloe vera</i> induce la actividad de GST, NQO1, SOD, CAT, GPx y GR en hígado, pulmón, riñón y estómago de ratones.	30 y 60 µL/día/14 días (Singh <i>et al.</i> , 2000).
El extracto de la pulpa y del gel de la hoja de <i>Aloe vera</i> disminuyen la lipoperoxidación, la glicosilación no enzimática y previenen la disminución en los niveles de GSH en hígado de ratas tratadas con estreptozotocina.	Extracto de la pulpa de la hoja: 500 mg/kg/día/15 días, vía oral. Extracto del gel de la hoja: 63 mg/kg/día/15 días, vía oral (Can <i>et al.</i> , 2004).

ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	
Los extractos de la piel de la hoja hervida y no hervida de <i>Aloe arborescens</i> , reducen al DPPH [•] y neutralizan O ₂ ^{•-} y OH [•] en cultivos primarios de islotes pancreáticos.	DPPH [•] (mM Trolox/g): Hoja completa: 48.2±0.6 Piel de la hoja: 35±0.8 Piel de la hoja hervida: 61.6±0.3 (Beppu <i>et al.</i> , 2003).
El extracto etanólico del gel y el gel liofilizado de la hoja de <i>Aloe ferox</i> presentan capacidad antioxidante mediante los métodos ORAC y FRAP.	ORAC (μmol Trolox/g): Gel liofilizado: 1.83±0.04 Extracto etanólico: 0.31±0.006 FRAP (μmol/g): Gel liofilizado: 0.17±0.08 Extracto etanólico: 0.05±0.001 (Loots <i>et al.</i> , 2008).
Los compuestos aloesina, aloeresina A, aloeresina B, barbaloina e isorabaicromona, presentes en el <i>Aloe vera</i> , atrapan O ₂ ^{•-} y reducen al DPPH [•] .	CI ₅₀ (μM) DPPH [•] : Aloesina: 20±0.3 Aloeresina A: 26±0.9 Aloeresina B: 26±0.2 Isorabaicromona: 4±0.1 Barbaloina: 68±0.9 CI ₅₀ (μM) O ₂ ^{•-} : Aloesina, Aloeresina A, Aloeresina B y barbaloina: >100; Isorabaicromona: 7±0.2 (Yagi <i>et al.</i> , 2002).
El extracto acuoso de la piel de la hoja de <i>Aloe vera</i> reduce al DPPH [•] , atrapa O ₂ ^{•-} y ABTS y disminuye la oxidación de liposomas de fosfatidilcolina.	CI ₅₀ (mg/mL) ABTS: 34.77±0.41 DPPH [•] : 41.81±0.55 O ₂ ^{•-} : 5.76±0.19 (Ozsoy <i>et al.</i> , 2009).
El extracto etanólico de <i>Aloe saponaria</i> reduce al DPPH [•] y atrapa O ₂ ^{•-} .	CI ₅₀ (μg/mL) O ₂ ^{•-} : 85 DPPH [•] : 73 (Yoo <i>et al.</i> , 2008).
Los compuestos aloina y metilaloeresina del látex del <i>Aloe harlana</i> Reynols reducen al DPPH [•] .	CI ₅₀ : 26 μM (Asamenew <i>et al.</i> , 2011).
Los diferentes extractos de la piel de la hoja de <i>Aloe vera</i> reducen al DPPH [•] .	CI ₅₀ (mg/mL): Hexano: 0.366 Acetato de etilo: 0.326 Cloroformo-etanol: 0.274 Butanol: 0.635 Agua: >1 (Kammoun <i>et al.</i> , 2011).
El extracto etanólico de la hoja completa de <i>Aloe vera</i> reduce al DPPH y su efecto es comparable con otros antioxidantes como el α-tocoferol y el butilhidroxitolueno.	<i>Aloe</i> : 72.19±0.98% Butilhidroxitolueno: 70.52±0.89% α-tocoferol: 65.20±1.32% (Hu <i>et al.</i> , 2003).
El extracto etanólico del gel de la hoja de <i>Aloe vera</i> disminuye la lipoperoxidación, la cantidad de hidroperóxidos e incrementa los niveles de GSH en plasma e hígado de ratas tratadas con estreptozotocina.	300 mg/kg/día/21 días, vía intragástrica (Rajasekaran <i>et al.</i> , 2005).

CAT: catalasa, DPPH[•]: radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, FRAP: Poder antioxidante de reducir al ion férrico, GPx: glutatión peroxidasa, GR: glutatión reductasa, GSH: glutatión reducido; GST: glutatión S-transferasa, CI₅₀: concentración inhibitoria 50, NADPH: Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato reducido, NQO1: NADPH quinona oxidoreductasa 1, ORAC: capacidad de absorber radicales derivados del oxígeno, SOD: superóxido dismutasa.

JUSTIFICACIÓN

Diversos estudios científicos informan que el *Aloe vera* presenta actividad antioxidante sobre el radical del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), ROO[•], OH[•], O₂^{•-}, DPPH[•] y sobre el ion férrico; sin embargo, aún no se conocen las propiedades antioxidantes específicas del *Aloe vera* sobre otras ER.

OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar si el gel de *Aloe vera* presenta actividad antioxidante en sistemas *in vitro*.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar si el gel de *Aloe vera* presenta actividad antioxidante sobre las ERO: HOCl, ONOO⁻ y ¹O₂.
- Establecer la efectividad relativa de atrapamiento (en términos de CI₅₀) de las ER: ROO[•], O₂^{•-}, DPPH[•], ¹O₂, OH[•], HOCl y ONOO⁻ por el gel de *Aloe vera*.

HIPÓTESIS

Debido a que el *Aloe vera* contiene diversas enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx), además de sustancias antioxidantes (tocoferoles, carotenoides, ácido ascórbico, entre otras) y a que se ha documentado la actividad antioxidante *in vivo* del gel de este producto natural, se plantea la hipótesis de que dicha actividad se debe a la capacidad del gel de neutralizar ER tales como HOCl, ONOO⁻, ¹O₂, OH[•], ROO[•], O₂^{•-} y DPPH[•].

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. REACTIVOS

Los siguientes reactivos se compraron a **Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)**: Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH^{*}), ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico) (DTNB), borohidruro de sodio (NaBH₄), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido nordihidroguayarético (NADG), fluoresceína sódica, dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH), 1,3-difenil-isobenzofurano (DFBF), ácido tereftálico, cloruro de hierro (III) (FeCl₃), N,N-dimetiltiourea (DMTU), xantina, xantina oxidasa, nitroazul de tetrazolio (NBT), penicilamina, ácido ascórbico y ácido lipoico.

El peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el metanol (CH₃OH), el hipoclorito de sodio (NaOCl), el carbonato de sodio (Na₂CO₃) y el hidróxido de sodio (NaOH) se adquirieron de **JT Baker (Xalostoc, Edo. de México, México)**.

El diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCDHF) se compró de **Cayman Chemical (San Diego, CA, EUA)**.

El Trolox se compró de **Calbiochem (La Jolla, CA, EUA)**.

El gel de *Aloe vera* fue proporcionado por **Aloe Vera de México S.A. de C.V. (Reserva territorial Atlixayotl, Puebla, México)**.

6.2. MÉTODOS

Para obtener el CI₅₀ de atrapamiento sobre cada ER, se hicieron diluciones en serie a partir del gel de *Aloe vera* concentrado.

6.2.1. Determinación de la concentración del gel de *Aloe vera*

Para determinar la concentración del gel de *Aloe vera*, se colocó 1 mL del gel en un tubo "ependorf" de 1.5 mL y se expuso a 60°C en un horno Thermolyne modelo "oven series 9000" hasta que el líquido se evaporó. La diferencia entre el peso del tubo vacío y el peso del tubo después de la evaporación fue el valor de la masa contenida por mL de gel de *Aloe vera* (**Tabla 4**).

6.2.2. Neutralización de ROO[•]

La neutralización de ROO[•] por el gel de *Aloe vera*, se determinó mediante su capacidad de absorber radicales derivados del oxígeno (ORAC), la cual se determinó en base a la metodología propuesta por Huang y cols., (2002). Este ensayo se fundamenta en la disminución de la fluorescencia de la fluoresceína por la reacción de esta sustancia con ROO[•] que a su vez se genera por la descomposición a 37°C del dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH) (Figura 4). En presencia de una sustancia antioxidante, la disminución de la fluorescencia es retrasada (Glazer, 1990). La sustancia antioxidante utilizada en este ensayo fue Trolox, un análogo soluble en agua de la vitamina E.

En una placa para estudios de fluorescencia (de 96 pozos, negra y de fondo opaco) se colocaron 25 µL de la muestra o de Trolox (4, 8, 20, 40, 60 y 80 µM), 150 µL de fluoresceína 40 nM y 25 µL de AAPH 153 mM. Inmediatamente después de la adición de AAPH, se obtuvieron los valores de fluorescencia cada minuto durante un total de 90 min, empleando longitudes de onda (λ) de excitación a 485 nm y de emisión a 535 nm en un espectrofluorómetro Synergy HT (Biotek Instruments Inc., VT, EUA) cuya aplicación "ORAC" proporciona los valores de área bajo la curva (ABC) de fluorescencia mediante la integración punto a punto de cada uno de los valores de fluorescencia. Las unidades del efecto protector de cada muestra se informaron como mg equivalentes de Trolox por mg de gel de *Aloe vera* (peso seco).

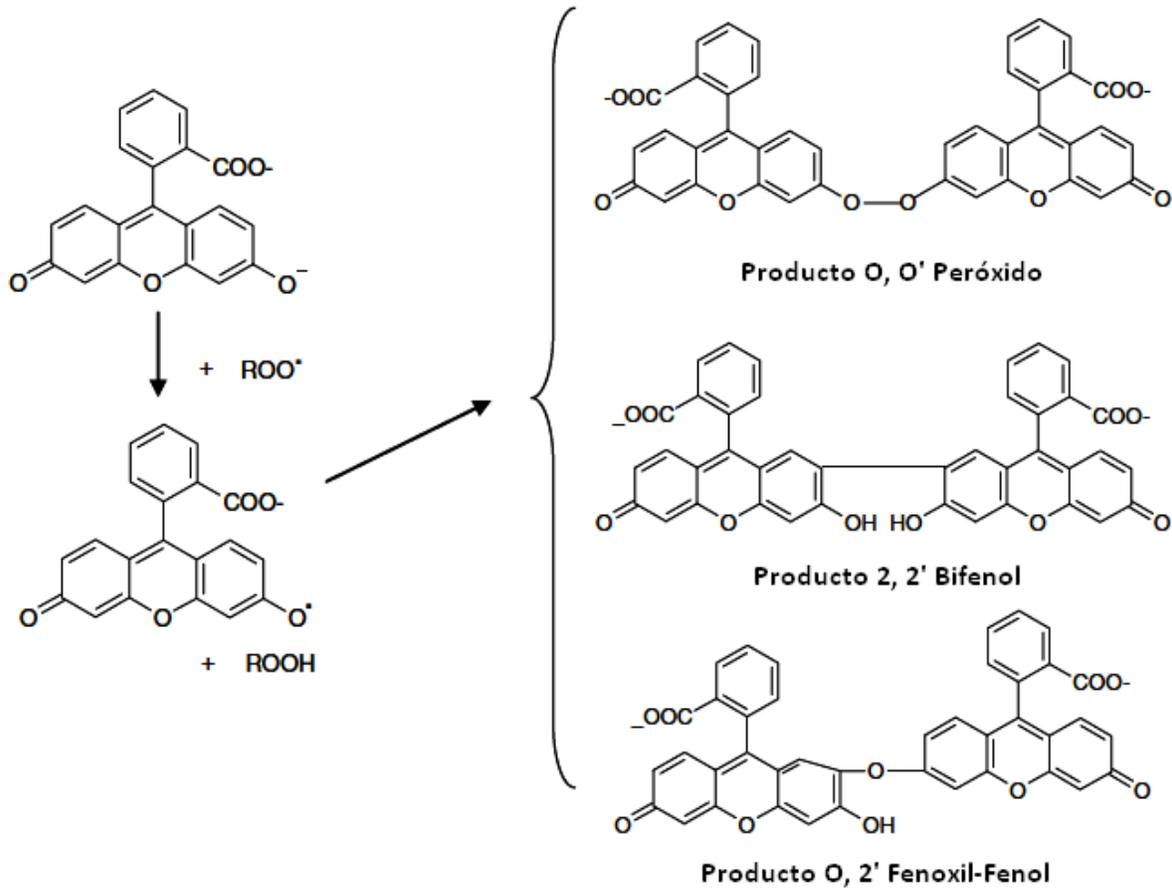


FIGURA 4. OXIDACIÓN DE LA FLUORESCÉINA POR EL RADICAL PEROXILO, PRODUCCIÓN DEL RADICAL FLUORESCENIL Y DIMERIZACIÓN DEL RADICAL A PRODUCTOS PROPUESTOS (BISBY *et al.*, 2008).

6.2.3. Inactivación de $^1\text{O}_2$

La inactivación de $^1\text{O}_2$ por el gel de *Aloe vera*, se determinó por un método fluorométrico basado en el trabajo de Wozniak y cols. (1991), en el cual se genera $^1\text{O}_2$ al mezclar hipoclorito de sodio (NaOCl) con H_2O_2 (Figura 5). Este método se fundamenta en la disminución de la fluorescencia del 1,3-difenil-isobenzofurano (DFBF) causada por $^1\text{O}_2$ (Figura 6). En presencia de una sustancia antioxidante la disminución de la fluorescencia es retrasada.

En una placa para estudios de fluorescencia se colocaron 25 μL de la muestra o del antioxidante de referencia, que en este caso fue el ácido nordihidroguayarático (NDGA) (Floriano-Sánchez *et al.*, 2006), 25 μL de H_2O_2 (10 mM), 25 μL de NaOCl (300 μM) y 25 μL de una solución etanólica de DFBF (10 μM) (la cual se mantuvo a 4°C y protegida de la luz). El blanco (0% atrapamiento), se preparó con 25 μL de agua destilada en vez de muestra o de antioxidante de referencia.

Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente (protegida de la luz) durante 10 min, y enseguida de la incubación, se agregaron 150 μL de etanol a la mezcla y se determinó su fluorescencia en un espectrofluorómetro Synergy HT (Biotek Instruments Inc., VT, EUA) a λ de excitación a 410 nm y de emisión a 455 nm. Los resultados se informaron como porcentaje de atrapamiento de $^1\text{O}_2$. La Cl_{50} de atrapamiento de $^1\text{O}_2$ por el gel de *Aloe vera*, se comparó con la del NDGA.



FIGURA 5. GENERACIÓN DE OXÍGENO SINGULETE.

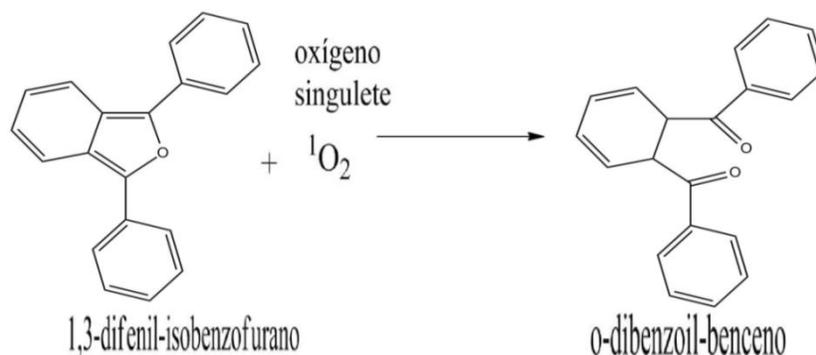


FIGURA 6. OXIDACIÓN DEL 1,3-DIFENIL-ISOBENZOFURANO POR EL OXÍGENO SINGULETE (HOWARD Y MENDENHALL, 1975).

6.2.4. Atrapamiento de $O_2^{\cdot-}$

Este ensayo se fundamenta en la generación de formazán, producto de la reducción del NBT causada por $O_2^{\cdot-}$ (Medina-Campos *et al.*, 2007; Floriano-Sánchez *et al.*, 2006). El $O_2^{\cdot-}$ a su vez se genera junto con ácido úrico por la acción de la XO sobre la xantina (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2006) (**Figura 7**). Este ensayo es útil solamente cuando las sustancias utilizadas no interfieren con la actividad de la XO, de manera que un compuesto que atrape $O_2^{\cdot-}$, deberá disminuir la reducción del NBT sin interferir con la producción de ácido úrico.

Para la realización del ensayo, se utilizaron 800 μ L de la mezcla de reacción: xantina (166.67 μ M), Na_2CO_3 (88.89 μ M), NBT (33.33 μ M) y 100 μ L de muestra o de antioxidante de referencia (ácido ascórbico). Para el blanco (0% atrapamiento), se añadieron 100 μ L de agua destilada en vez de muestra o de antioxidante de referencia. La reacción se inició con la adición de 16 μ L de XO (168 U/L). Se midió la densidad óptica (DO) durante tres minutos (3 intervalos de un minuto cada uno) a λ de 295 nm (formación de ácido úrico) y de 560 nm (reducción de NBT) en un espectrofotómetro Beckman modelo "DU-640". Los resultados se informaron como porcentaje de atrapamiento de $O_2^{\cdot-}$. La Cl_{50} de atrapamiento de $O_2^{\cdot-}$ por el gel de *Aloe vera* se comparó con la del ácido ascórbico.

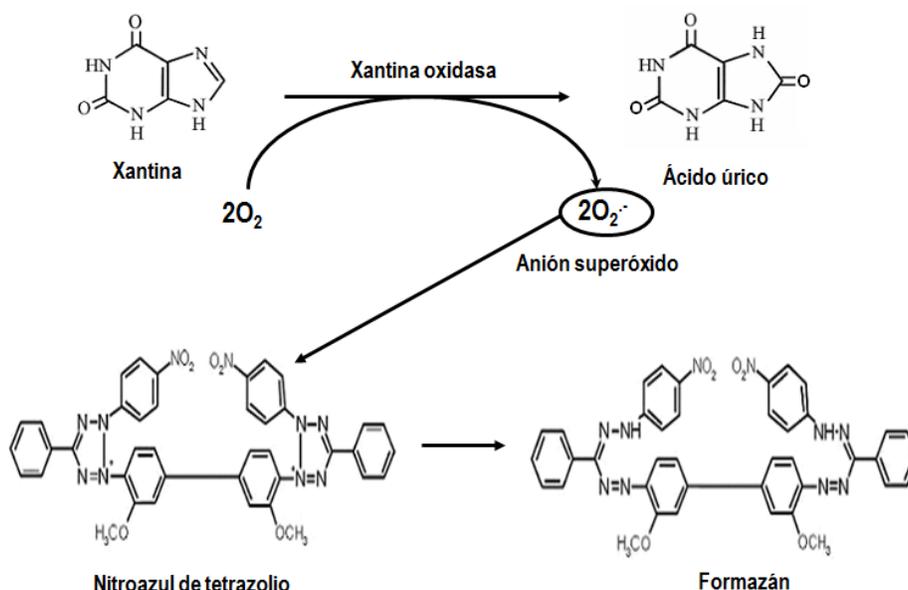


FIGURA 7. GENERACIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO POR MEDIO DEL SISTEMA XANTINA-XANTINA OXIDASA Y SU DETECCIÓN POR MEDIO DE LA REDUCCIÓN DEL NITROAZUL DE TETRAZOLIO.

6.2.5. Reducción de DPPH[•]

Este ensayo se fundamenta en la disminución de la DO de una solución de DPPH[•] debida a la reducción de este radical por la presencia de una sustancia antioxidante (**Figura 8**).

El ensayo de reducción de DPPH[•] se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Manojlovic y cols. (2011): a 250 μ L de una solución metanólica de DPPH[•] (80 μ g/mL) se le adicionaron 250 μ L de muestra o de antioxidante de referencia (ácido ascórbico). El blanco (0% de atrapamiento) se preparó con 250 μ L de agua destilada en lugar de muestra o de antioxidante de referencia.

Esta mezcla se incubó en la oscuridad y a temperatura ambiente durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se midió la DO de la mezcla a λ de 517 nm, usando un espectrofotómetro Beckman modelo "DU-640".

Los resultados de capacidad antioxidante, tanto del ácido ascórbico como del gel de *Aloe vera* se informaron como porcentaje de reducción de DPPH[•].

La Cl_{50} de atrapamiento de DPPH[•] por el gel de *Aloe vera*, se comparó con la del ácido ascórbico.

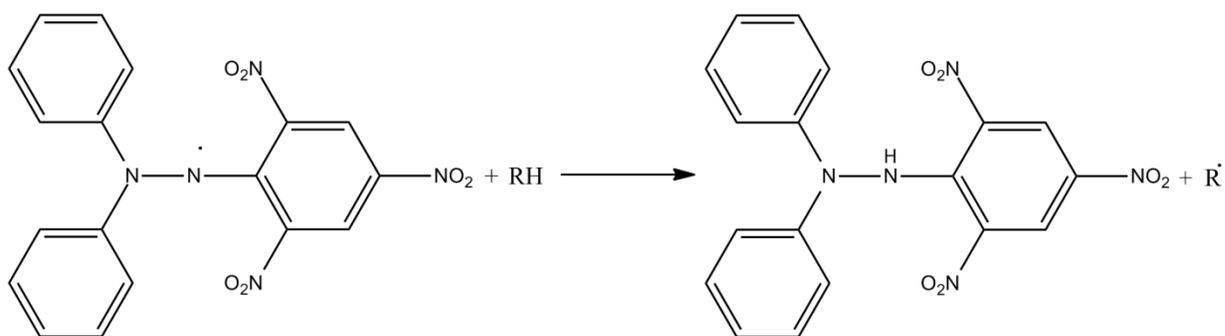


FIGURA 8. REDUCCIÓN DEL RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL (VILLAÑO et al., 2007).

6.2.6. Atrapamiento de HOCl

El HOCl, sustancia altamente reactiva y soluble en lípidos, es capaz de oxidar grupos R-SH y amino, así como de modificar las bases púricas del DNA añadiéndoles un átomo de cloro (Martínez, 2005).

El ensayo de atrapamiento de HOCl se fundamenta en la oxidación del ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) al ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico) (DTNB) causada precisamente por el HOCl (**Figura 9**).

Antes de comenzar el ensayo se midió la DO del TNB (70 μ M) y de la mezcla de TNB con HOCl (concentraciones finales 70 y 25 μ M respectivamente) a λ de 412 nm, lo que debe resultar en aproximadamente 1.0 y 0.5 respectivamente. Esto asegura que el HOCl oxida al TNB. La actividad atrapadora de HOCl se determina por la capacidad de inhibir la oxidación del TNB.

Para la realización de este ensayo se mezclaron 400 μ L de TNB (175 μ M), 500 μ L de amortiguador de potasio 50 mM (pH 6.6) y 100 μ L de muestra o de antioxidante de referencia (ácido lipoico). Para el blanco (0% de atrapamiento) se utilizaron 100 μ L de agua destilada en vez de muestra o de antioxidante de referencia. El TNB se preparó de acuerdo a Fernandes *et al.* (2003).

La oxidación del TNB se inició al agregar 500 μ L de HOCl (50 μ M) a la mezcla anterior. El HOCl se preparó y midió tal como lo describen Fernandes y cols. (2003) y Valentão y cols. (2002). Esta mezcla de reacción se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación, se midió la DO de la mezcla a λ de 412 nm por medio del espectrofotómetro Beckman modelo "DU-640". El efecto antioxidante del gel de *Aloe* sobre el HOCl se expresó en porcentaje de atrapamiento; el cual se comparó con el del antioxidante de referencia.

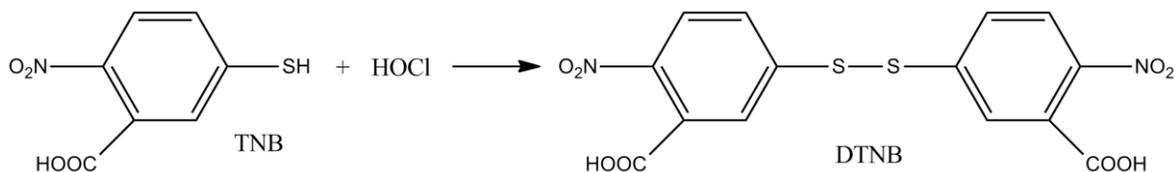


FIGURA 9. OXIDACIÓN DEL ÁCIDO 5-TIO-2-NITROBENZOICO POR EL ÁCIDO LIPOICO (LANDINO *et al.*, 2008).

6.2.7. Atrapamiento de OH[•]

En este ensayo, el OH[•], se generó por medio de la reacción de Fenton (**Figura 10**). El ensayo de atrapamiento de OH[•] se fundamenta en la generación de 2-hidroxitereftalato, una sustancia fluorescente, producto de la reacción de tereftalato con OH[•] (**Figura 11**) (Qu *et al.*, 2000).

Para la realización de este ensayo se utilizaron 180 µL de mezcla de reacción y 20 µL de muestra o de antioxidante de referencia, que en este ensayo fue la N,N dimetiltiurea (DMTU) (Medina-Campos *et al.*, 2007).

La mezcla de reacción se preparó al añadir: 40 µL de ácido ascórbico (1 mM), 40 µL de FeCl₃ (1 mM), 40 µL de EDTA (1.04 mM), 20 µL de H₂O₂ (10 mM) y 40 µL de tereftalato (7 mM) a 40 µL de amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7.4). Para el control (0% de atrapamiento) se utilizaron 20 µL agua destilada en vez de muestra o antioxidante de referencia.

El OH[•] se generó al incubar la mezcla de reacción durante 30 min a temperatura ambiente. El 2-hidroxitereftalato se midió a λ de excitación a 326 nm y a 432 nm de emisión (Yan *et al.*, 2005; Qu *et al.*, 2000), por medio del espectrofluorómetro Synergy HT (Biotek Instruments Inc., VT, EUA). El porcentaje de atrapamiento de OH[•] por el gel de *Aloe vera* fue comparado con el del antioxidante de referencia



FIGURA 10. REACCIÓN DE FENTON.

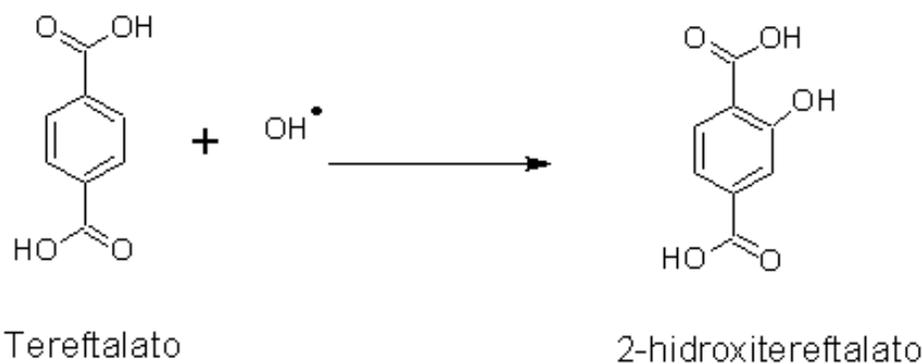


FIGURA 11. PRODUCCIÓN DE 2-HIDROXITEREFTALATO A PARTIR DE TEREFTALATO Y EL RADICAL HIDROXILO (QU *et al.*, 2000).

6.2.8. Neutralización de ONOO^-

Este ensayo se fundamenta en la producción de la sustancia fluorescente diclorofluoresceína (DCF) a partir de la oxidación del diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCDHF) por ONOO^- (Figura 12) (Crow, 1997; Kooy *et al.*, 1997). La presencia de una sustancia antioxidante inhibe la formación de DCF.

El ONOO^- se sintetizó de la manera descrita por Beckman y cols. (1994), y su concentración se determinó leyendo su DO a λ de 302 nm (Crow, 1997) mediante un espectrofotómetro Beckman modelo "DU-640" y la ecuación $A = \epsilon c l$, [A: absorbancia, c: concentración, l: dilución y ϵ : coeficiente de extinción molar ($1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)]. La oxidación de DCDHF se inició al agregar $6.66 \mu\text{L}$ de ONOO^- (0.63 mM) a la mezcla de $6.66 \mu\text{L}$ de ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) (1 mM), $6.66 \mu\text{L}$ de DCDHF (3.5 mM), $160 \mu\text{L}$ de agua destilada y $20 \mu\text{L}$ de la muestra o del antioxidante de referencia que en este caso fue penicilamina (Floriano-Sánchez *et al.*, 2006). Para el 0% de atrapamiento de ONOO^- se sustituyó la muestra o el antioxidante de referencia por agua destilada. La mezcla de reacción se incubó en oscuridad a 37°C durante 30 min. Una vez incubada la mezcla, se midió su fluorescencia mediante un espectrofluorómetro Synergy HT (Biotek Instruments Inc., VT, EUA) con λ de excitación a 488 nm y de emisión a 525 nm.

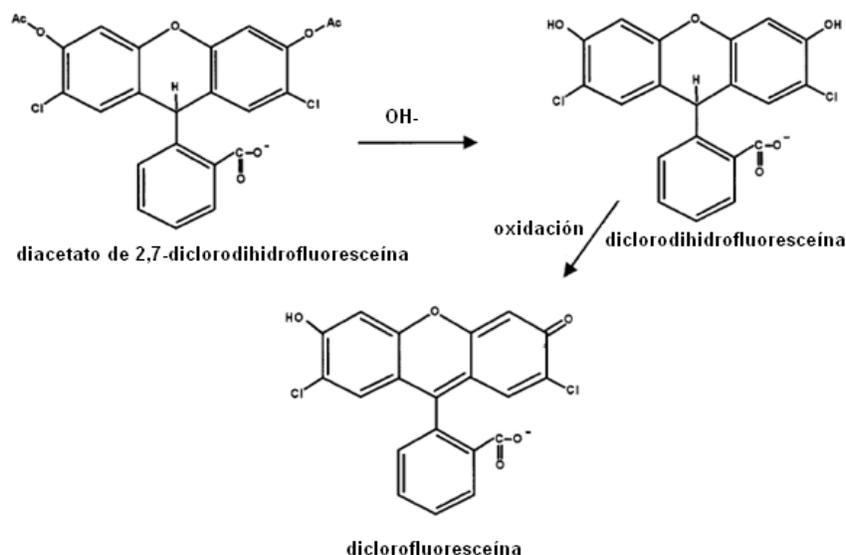


FIGURA 12. PRODUCCIÓN DE DICLOROFUORESCEÍNA POR LA OXIDACIÓN DEL DIACETATO DE 2',7'-DICLORODIHIROFLUORESCEÍNA POR EL ANIÓN PEROXINITRITO (CROW, 1997).

RESULTADOS

Los resultados de IC_{50} o de porcentaje de atrapamiento máximo se calcularon como el promedio de una serie de repeticiones de los ensayos realizados, la dispersión se tomó como el valor del error estándar.

7.1. CONCENTRACIÓN DEL GEL DE *ALOE VERA*

El valor de la concentración del gel de *Aloe vera* resultó de **8.6±0.0005 mg/mL**.

TABLA 4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL GEL DE *ALOE VERA*.

Tubo eppendorf vacío (mg)	Tubo eppendorf + 1 mL gel <i>Aloe vera</i>	Diferencia de masas (mg)
886.8	895.3	8.5
1026.4	1035.1	8.7
1029.2	1037.8	8.6
999.3	1007.8	8.5
Promedio		8.6 mg/mL
Error estándar		0.00005 mg/mL

7.2. NEUTRALIZACIÓN DE ROO[•]

El efecto protector de Trolox y del gel de *Aloe vera* ante ROO[•] se presentan en la **Figura 13**. Este efecto se traduce de la siguiente manera: un valor más alto de ABC indica una mayor duración de la fluorescencia (o menor presencia de la ER) y se observa que a mayor concentración de Trolox o de *Aloe vera*, mayor es el valor de ABC.

De la misma manera, se aprecia que el gel de *Aloe vera* es más eficaz que el Trolox para atrapar o neutralizar ROO[•], pues con menor cantidad (mg de peso seco) se logra el mismo efecto que el Trolox. Por ejemplo, a 0.38 mg de Trolox se alcanza una ABC de 25.00 y a 0.36 mg de peso seco de gel de *Aloe vera* se alcanza una ABC de 31.20.

La equivalencia de Trolox (mg Trolox/mg gel de *Aloe vera* [peso seco]) es de **1.17±0.12**, es decir, cada mg de gel de *Aloe vera* (peso seco), equivale a 1.17±0.12 mg de Trolox.

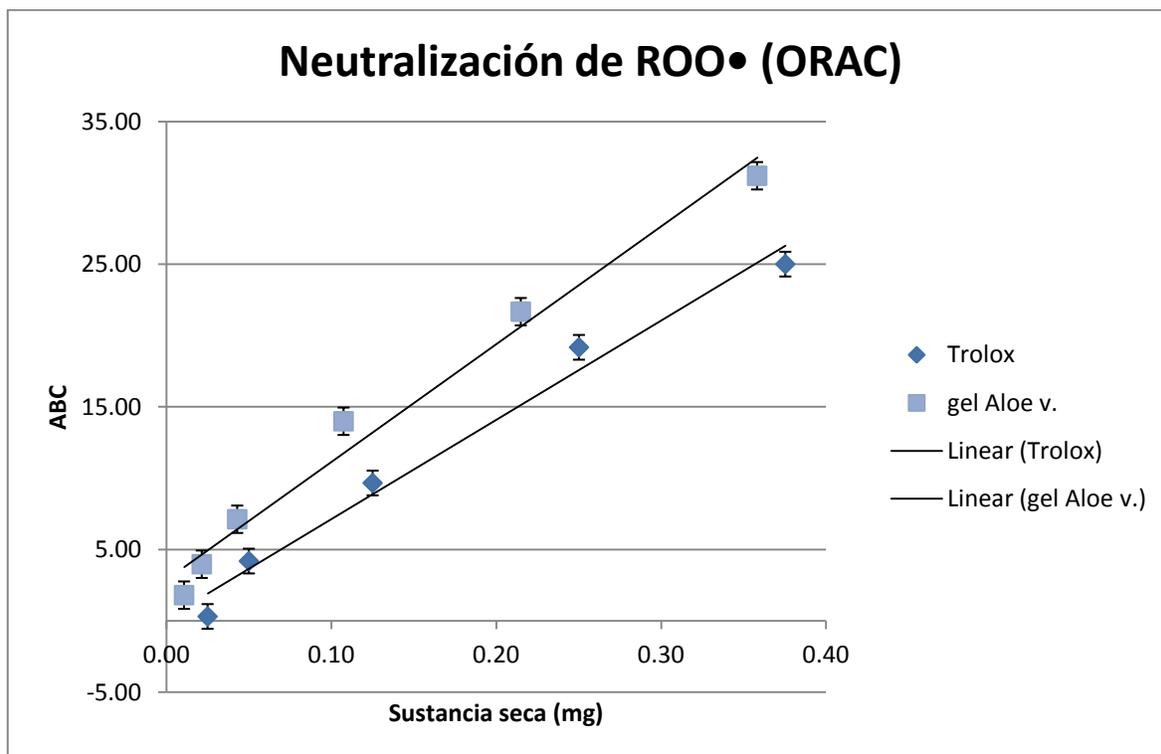


FIGURA 13. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DEL GEL DE *ALOE VERA* Y DE TROLOX DE NEUTRALIZAR AL RADICAL PEROXILO.

7.3. INACTIVACIÓN DE $^1\text{O}_2$

En la **Figura 14** se observa la relación concentración del gel de *Aloe vera* - porcentaje de inactivación de $^1\text{O}_2$. Se observa el gel de *Aloe vera* inactiva al $^1\text{O}_2$ de manera dependiente de la concentración. La **CI₅₀** de inactivación de $^1\text{O}_2$ fue de **17.17±1.15 µg/mL**.

Comparado con el NDGA, el gel de *Aloe vera* es un antioxidante 4.25 veces más eficaz, ya que el 50 % de inactivación de $^1\text{O}_2$ se logra con una concentración de **72.77±0.67 µg/mL** de NDGA (**Figura 15**).

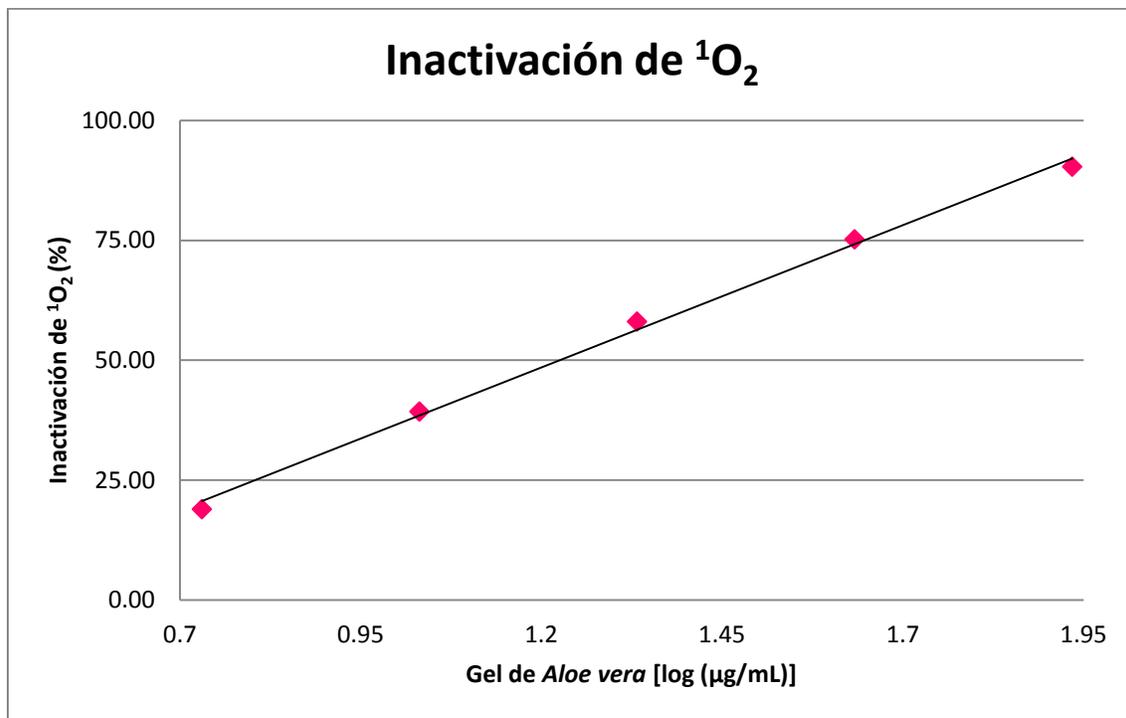


FIGURA 14. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DEL GEL DE *ALOE VERA* DE INACTIVAR AL OXÍGENO SINGULETE.

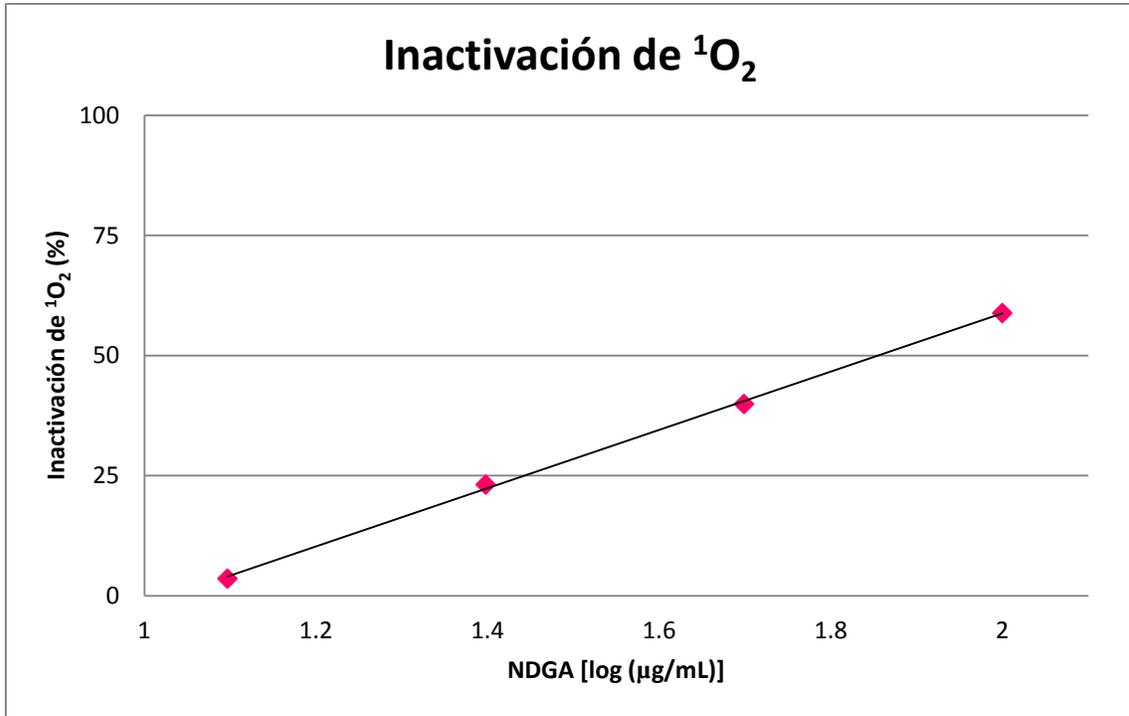


FIGURA 15. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DEL ÁCIDO NORDIHIROGUAYARÉTICO DE INACTIVAR AL OXÍGENO SINGULETE.

7.4. ATRAPAMIENTO DE $O_2^{\cdot-}$

El gel de *Aloe vera* no interfiere con la actividad de XO (**Figura 16**), es decir, que permite la formación de ácido úrico, por lo que este método es válido para evaluar si el gel de *Aloe vera* atrapa $O_2^{\cdot-}$.

El gel de *Aloe vera* neutraliza eficazmente a $O_2^{\cdot-}$ de manera dependiente a la concentración (**Figura 17**), es decir que a mayor concentración del gel de *Aloe vera*, mayor atrapamiento de dicha ER.

Por medio de la relación concentración del gel de *Aloe vera*-porcentaje de atrapamiento de $O_2^{\cdot-}$ y de la ecuación de la recta se obtuvo que el gel de *Aloe vera* tiene una CI_{50} de atrapamiento de $O_2^{\cdot-}$ es de $163.03 \pm 2.57 \mu\text{g/mL}$ y comparándolo con el resultante del ácido ascórbico ($3.53 \pm 0.14 \mu\text{g/mL}$), este último resulta ser 46 veces más eficaz que el gel de *Aloe vera* en términos de neutralización de $O_2^{\cdot-}$ (**Figura 18**).

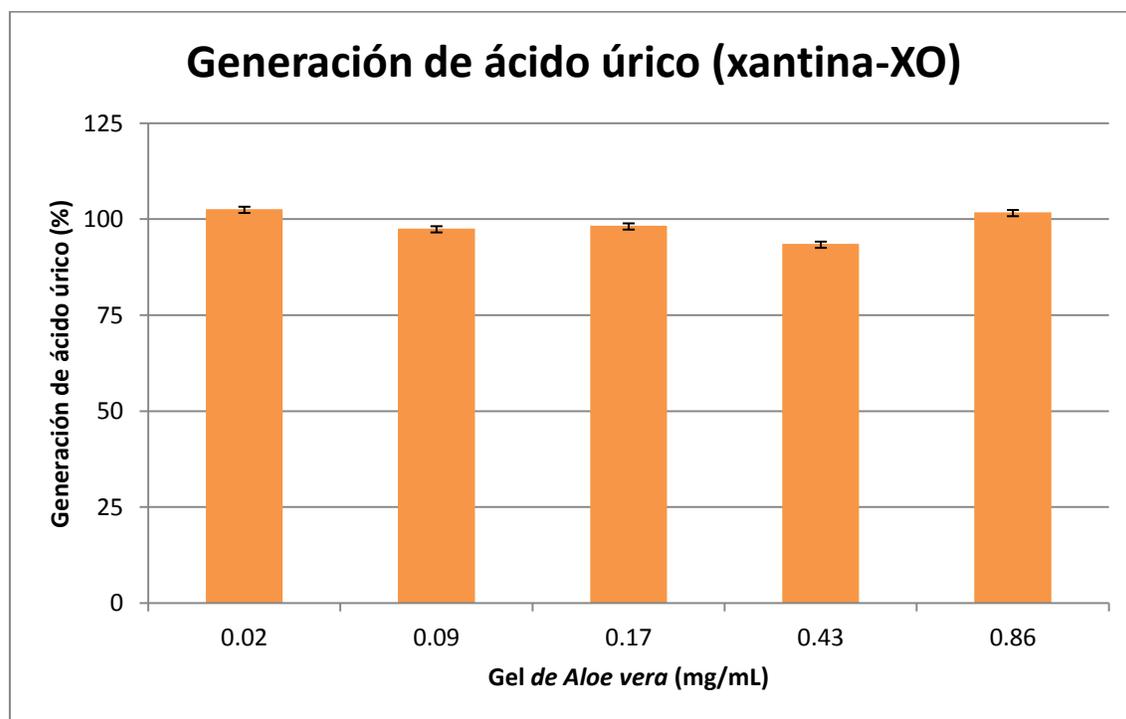


FIGURA 16. EFECTO DEL GEL DE *ALOE VERA* SOBRE LA GENERACIÓN DE ÁCIDO ÚRICO EN EL SISTEMA XANTINA-XANTINA OXIDASA.

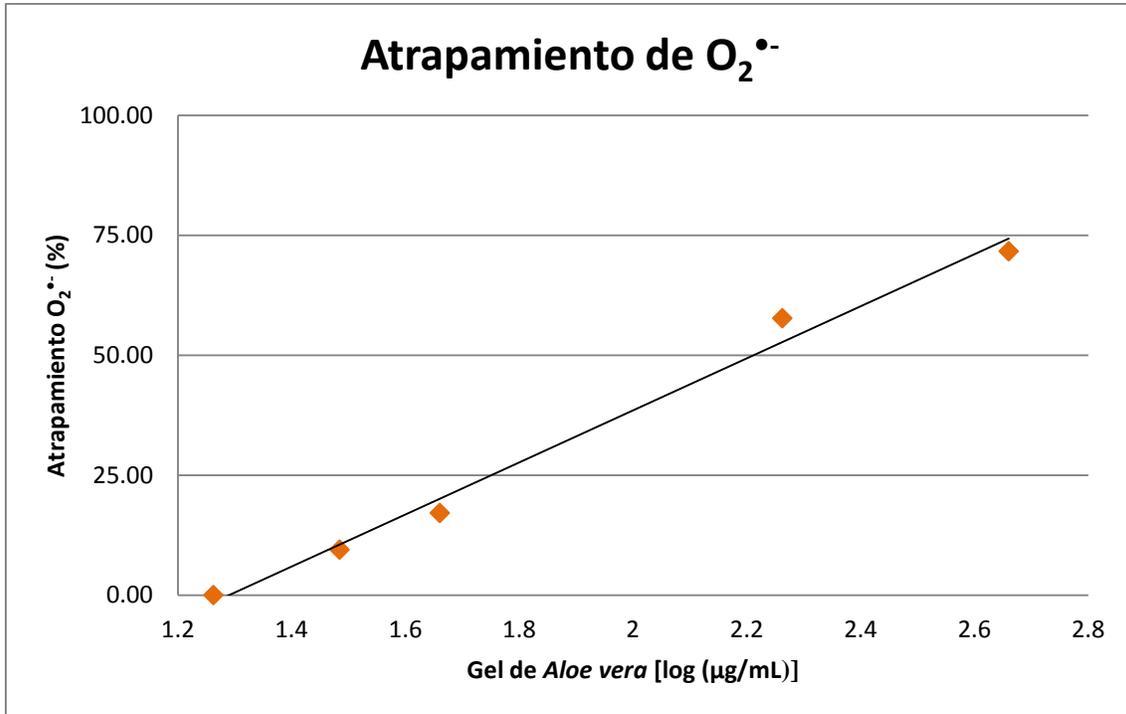


FIGURA 17. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DEL GEL DE *ALOE VERA* DE ATRAPAR AL ANIÓN SUPERÓXIDO.

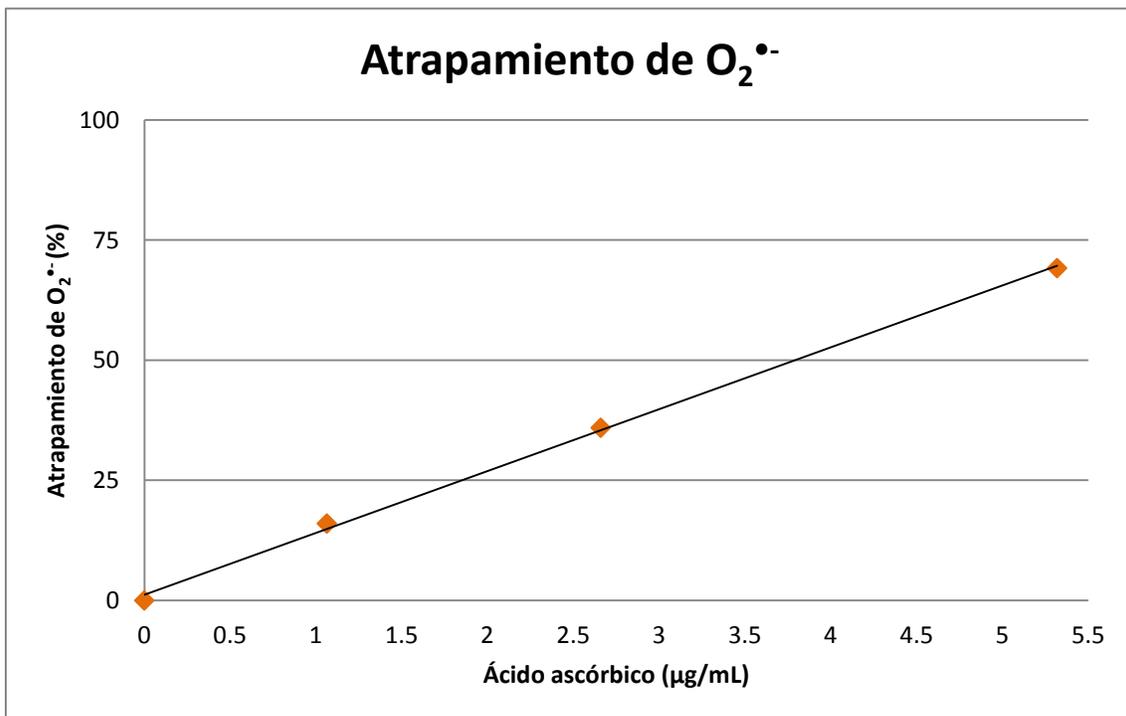


FIGURA 18. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DEL ÁCIDO ASCÓRBICO DE ATRAPAR AL ANIÓN SUPERÓXIDO.

7.5. REDUCCIÓN DE DPPH[•]

En la **Figura 19** se presenta la relación concentración del gel de *Aloe vera* porcentaje de reducción de DPPH[•]; por medio de la cual se observa que el gel de *Aloe vera* es capaz de reducir al DPPH[•] con un valor de CI_{50} de $2897.32 \pm 201.16 \mu\text{g/mL}$, 2318 veces el valor de CI_{50} de reducción de DPPH[•] del ácido ascórbico ($1.25 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$) (**Figura 20**). Esto significa que el ácido ascórbico es 2318 veces más eficaz para reducir al DPPH[•] que el gel de *Aloe vera*.

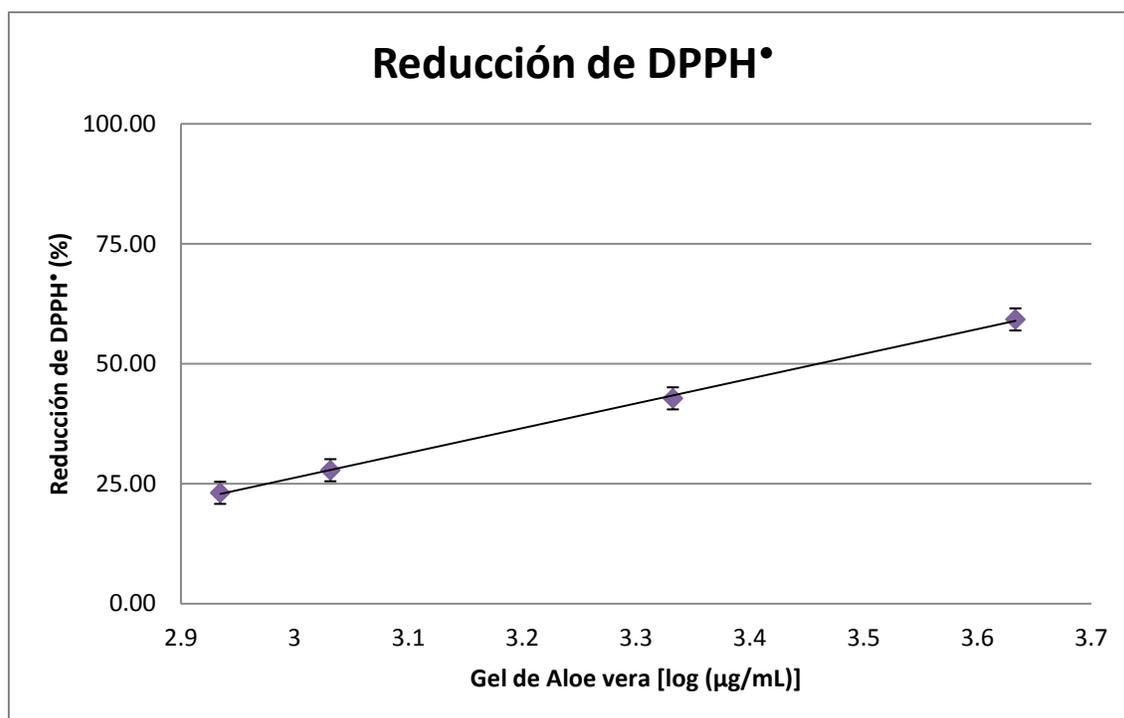


FIGURA 19. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DEL GEL DE ALOE VERA PARA REDUCIR AL RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL.

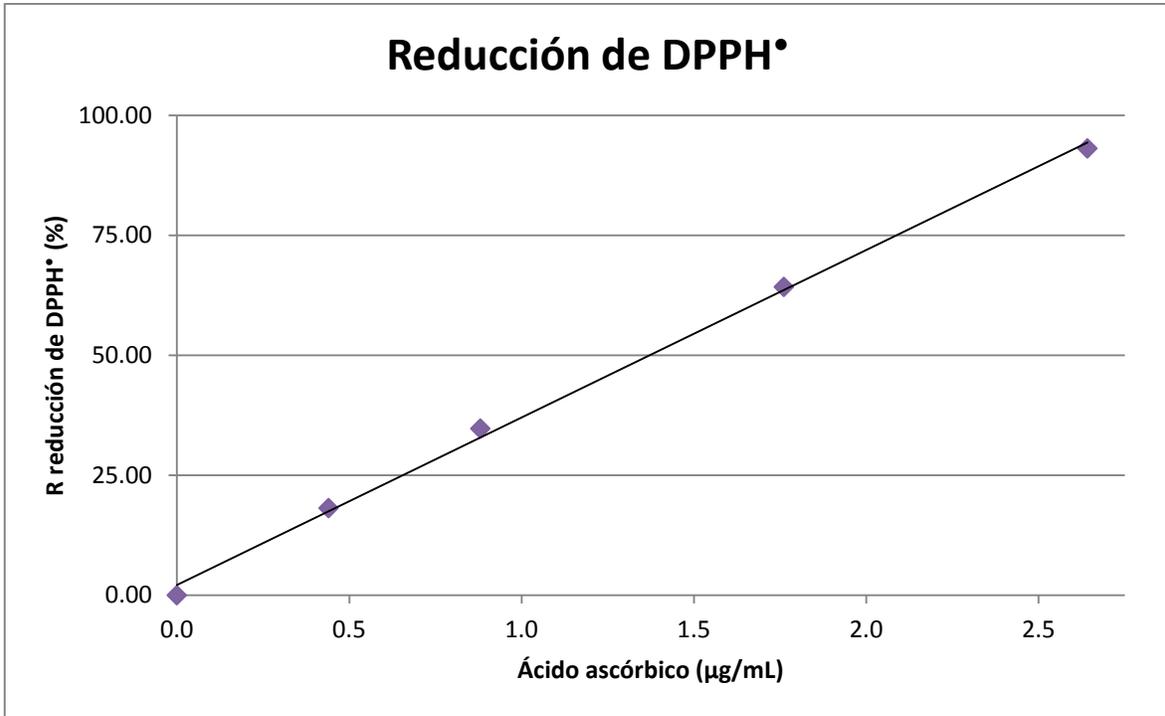


FIGURA 20. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DEL ÁCIDO ASCÓRBICO PARA REDUCIR AL RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL.

7.6. ATRAPAMIENTO DE HOCl

La concentración más alta del gel de *Aloe vera* en el ensayo (**0.86±0.0005 mg/mL**) presentó un atrapamiento máximo de **33.31±0.50%** (**Tabla 5**).

Comparado con el gel de *Aloe vera*, el ácido lipoico, es un antioxidante 191 veces más eficaz, ya que la concentración de ácido lipoico requerida para obtener un 33.31% de atrapamiento de HOCl es de 0.005±0.0008 mg/mL.

7.7. ATRAPAMIENTO DE OH[•]

En el caso de OH[•], el gel de *Aloe vera* presentó un atrapamiento máximo de **27.88±5.51%** a una concentración de **0.86±0.0005 mg/mL** (**Tabla 5**).

Para que la DMTU presente un atrapamiento de 27.88%, se requiere una concentración de 0.029±0.001 mg/mL, lo que lo hace un antioxidante 29.66 veces más eficaz que el gel de *Aloe vera*.

7.8. NEUTRALIZACIÓN DE ONOO⁻

El gel de *Aloe vera* es un antioxidante de muy baja eficacia ante el ONOO⁻; ya que a una concentración de **0.86±0.0005 mg/mL**, se logra un atrapamiento máximo de ONOO⁻ de **14.51±1.63%** (**Tabla 5**), este porcentaje de atrapamiento se obtiene con una concentración de 0.001±0.00002 mg/mL de penicilamina, lo que hace a este último un antioxidante 860 veces más eficaz que el gel de *Aloe vera*.

RESUMEN DE RESULTADOS

TABLA 5. ATRAPAMIENTO MÁXIMO DEL GEL DE *ALOE VERA* SOBRE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LAS CUALES NO SE ALCANZÓ UN MÍNIMO DE 50% DE ATRAPAMIENTO.

ERO	Atrapamiento máximo (%)	Gel de <i>Aloe vera</i> (mg/mL)	Antioxidante de referencia en el atrapamiento máximo del gel de <i>Aloe vera</i> (mg/mL)
HOCl	33.31±0.50 (4)	0.86±0.0005	0.005±0.0008
OH [•]	27.88±5.51 (4)	0.86±0.0005	0.029±0.001
ONOO ⁻	14.51±1.63 (4)	0.86±0.0005	0.001±0.00002

TABLA 6. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA 50 (CI₅₀) DEL GEL DE *ALOE VERA* Y DE ANTIOXIDANTES DE REFERENCIA SOBRE DIFERENTES ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.

ER	CI ₅₀ <i>Aloe vera</i> (µg/mL)	Antioxidante de referencia utilizado	CI ₅₀ antioxidante de referencia (µg/mL)
ROO [•]	1.17±0.12 (5)*	Trolox	1.00±0.00
¹ O ₂	17.17±1.15 (4)	NDGA	72.77±0.67
O ₂ ^{-•}	163.03±2.57 (4)	Ácido ascórbico	3.53±0.14
DPPH [•]	2897.32±201.16 (4)	Ácido ascórbico	1.25±0.07
HOCl	---**	Ácido lipoico	0.005±0.0008
OH [•]	---**	Dimetil tiourea	0.029±0.001
ONOO ⁻	---**	Penicilamina	0.001±0.00002

* Resultado en equivalentes Trolox [mg Trolox/mg gel de *Aloe vera* (peso seco)].

**Para estas ERO, el gel de *Aloe vera* no alcanzó un porcentaje de atrapamiento de al menos 50%, por lo que no fue posible determinar su CI₅₀ (resultados de atrapamiento máximo en tabla 5)

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La propiedad antioxidante de diferentes extractos de plantas ha sido atribuida a su contenido de vitaminas A, C y E (Ohja *et al.*, 2011), de polifenoles y de flavonoides (Ozsoy *et al.*, 2009). En el caso del *Aloe*, su actividad antioxidante se atribuye además a la presencia de aloe-emodina, derivados de aloesina (Hu *et al.*, 2005; Yagi *et al.*, 2002), antraquinonas (Anilakumar *et al.*, 2010), polisacáridos (Yu *et al.*, 2009) y de enzimas antioxidantes (Calderón-Oliver *et al.*, 2011).

En la mayoría de los estudios sobre la actividad antioxidante del *Aloe vera*, se trabaja con diferentes concentraciones de diferentes tipos de extractos de la planta, utilizando la piel de las hojas, la pulpa o ambas y agua o solventes como cloroformo, etanol, hexano y acetato de etilo, o técnicas como la de extracción con dióxido de carbono en estado supercrítico (Hu *et al.*, 2005). Estos extractos orgánicos presentan una actividad antioxidante más alta que la de los extractos acuosos y que la del gel de *Aloe vera*, lo cual se le atribuye a la diferente polaridad y distribución entre las sustancias antioxidantes contenidas en la planta.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, el gel de *Aloe vera* tiene la capacidad de inhibir a las ER: ROO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, DPPH^\bullet , $^1\text{O}_2$, OH^\bullet , HOCl y ONOO^- , por lo que puede ser considerado como un buen antioxidante. Sin embargo, esta propiedad tiene restricciones para cada una de estas ER, ya que en algunas de ellas no se alcanza un mínimo de 50% de atrapamiento.

8.1. NEUTRALIZACIÓN DE ROO^\bullet

La actividad antioxidante del gel de *Aloe vera* sobre el radical ROO^\bullet aumenta de manera dependiente de la concentración (**Figura 13**). Sin embargo, los equivalentes Trolox encontrados para el gel de *Aloe vera* [1.17 ± 0.12 mg Trolox /mg gel de *Aloe vera* (peso seco) ó $4,674.39 \pm 479.42$ μmol Trolox/g gel de *Aloe vera* (peso seco)], difieren de los del gel liofilizado [1.83 ± 0.04 μmol Trolox /g gel de *Aloe ferox* (peso seco)] y de los extractos etanólico [0.31 ± 0.006 μmol Trolox/g gel *Aloe ferox* (peso seco)] (Loots *et al.*, 2008), sugiriendo que el extracto etanólico contiene mayor cantidad de sustancias antioxidantes que el gel de *Aloe*.

8.2. ATRAPAMIENTO DE $O_2^{\cdot-}$

El gel de *Aloe vera* resultó ser un eficaz inhibidor de $O_2^{\cdot-}$ generado *in vitro* por el sistema xantina-xantina oxidasa, obteniéndose un valor de CI_{50} de 0.16 ± 0.003 mg/mL. Sin embargo, el valor de CI_{50} del extracto acuoso de las hojas de la planta fue de 5.76 ± 0.19 mg/mL (Ozsoy *et al.*, 2009) y el del extracto etanólico de *Aloe saponaria* fue de $85 \mu\text{g/mL}$ (Yoo *et al.*, 2008), sugiriendo nuevamente que el extracto etanólico contiene mayor cantidad de sustancias antioxidantes que el extracto acuoso del *Aloe*, debido a la polaridad de dichas sustancias.

8.3. REDUCCIÓN DE DPPH \cdot

El radical DPPH no es biológicamente relevante, pero frecuentemente es utilizado como un indicador de la capacidad de donación de protones, ergo, en la actividad antioxidante de un producto de estudio. A diferencia de otras ER, el gel de *Aloe vera* es capaz de reducir al DPPH \cdot con un valor de CI_{50} de 2.90 ± 0.20 mg/mL, siendo más eficaz que el extracto acuoso de la piel de la hoja de la misma planta con valor de CI_{50} de 41.81 ± 0.55 mg/mL (Ozsoy *et al.*, 2009).

8.4. INACTIVACIÓN DE 1O_2

En la literatura se ha descrito la actividad antioxidante de diferentes extractos orgánicos de diferentes partes de la hoja de *Aloe vera*, sin embargo, no se ha probado la actividad antioxidante sobre 1O_2 . En este trabajo se expone que la capacidad de inactivar al 1O_2 por el gel de *Aloe vera* incrementa de manera dependiente de la concentración (**Figura 14**). El valor de CI_{50} de inactivación de 1O_2 por el gel de *Aloe vera* fue de $17.17 \pm 1.15 \mu\text{g/mL}$, lo que lo hace más eficaz que el NDGA ya que para lograr el mismo efecto se requieren $72.77 \pm 0.67 \mu\text{g/mL}$ de NDGA, es decir, 4.25 veces la concentración del gel de *Aloe vera*. (**Figura 15**).

8.5. ATRAPAMIENTO DE HOCl

La actividad antioxidante específica para HOCl no se ha descrito en la literatura. En este trabajo se encontró que el gel de *Aloe vera* a una concentración de 0.86 ± 0.0005 mg/mL fue capaz de atrapar un máximo de $33.31 \pm 0.50\%$ de HOCl. (**Tabla 5**).

8.6. ATRAPAMIENTO DE OH[•]

A pesar de que se ha demostrado que el extracto acuoso de la hoja de *Aloe vera* inhibe a OH[•] en cultivos primarios de islotes pancreáticos (Beppu *et al.*, 2003), aún no se ha determinado cuantitativamente su actividad específica. En este trabajo se muestra que el gel de *Aloe vera* a una concentración de 0.86 ± 0.0005 mg/mL atrapa el $27.88 \pm 5.51\%$ del OH[•] generado en el ensayo (**Tabla 5**).

8.7. NEUTRALIZACIÓN DE ONOO⁻

Si bien tampoco hay información en la literatura sobre la actividad antioxidante del gel de *Aloe vera* sobre ONOO⁻, se informa que en este trabajo, el atrapamiento máximo de ONOO⁻ por el gel de *Aloe vera* a una concentración de 0.86 ± 0.0005 mg/mL resultó ser de $14.51 \pm 1.63\%$ (**Tabla 5**).

Como se demuestra en este trabajo, el gel de *Aloe vera* presenta actividad antioxidante sobre distintas ER, lo cual podría deberse a sus propiedades redox, causando la neutralización de radicales libres (Ozsoy *et al.*, 2009), y/o al efecto sinérgico de su contenido vitamínico, de enzimas antioxidantes y de otras sustancias propias del *Aloe* (Calderón-Oliver *et al.*, 2011). Esto es de relevancia farmacológica, ya que esta propiedad puede ser de gran utilidad en el tratamiento de enfermedades derivadas del estrés oxidante.

A pesar de que el gel de *Aloe vera* neutralizó en menor proporción a algunas ER, esto puede ser modificado por medio de biomagnetismo, proceso que se lleva a cabo para comercializar el gel de *Aloe vera*, que consiste en la microencapsulación de nutrientes, especialmente vitaminas, lo cual potencializa la actividad antioxidante de dicho producto natural, permitiendo que la actividad antioxidante del gel de *Aloe vera* se incremente hasta 160 veces.

CONCLUSIONES

Se concluye que el gel de *Aloe vera* es un antioxidante que puede neutralizar a las ER: ROO^\cdot , $^1\text{O}_2$, O_2^\cdot , DPPH^\cdot , HOCl , OH^\cdot y ONOO^- , por lo que puede ser utilizado como auxiliar en la profilaxis o en el tratamiento de enfermedades resultantes del estrés oxidante.

PERSPECTIVAS

A pesar de que hay información que demuestra la propiedad antioxidante del *Aloe vera*, aún quedan aspectos por ser estudiados, por ejemplo: identificar al compuesto o compuestos responsables de la neutralización o inactivación de cada ER, así como el mecanismo de acción de dicha actividad antioxidante.

De la misma manera, se requieren estudios para caracterizar completamente el efecto del gel de *Aloe vera* como inductor de enzimas antioxidantes así como para identificar los compuestos involucrados en dicho efecto. Por otro lado, se requiere también del estudio toxicológico del *Aloe vera*.

REFERENCIAS

- Anilakumar KR, Sudarshanakrishna KR, Chandramohan G, Ilaiyaraja N, Khanum F, Bawa AS. 2010. **Effect of *Aloe vera* gel extract on antioxidant enzymes and azoxymethane-induced oxidative stress in rats.** INDIAN J EXP BIOL 48(8):837-842.
- Asamenew G, Bisrat D, Mazumder A, Asres K. 2011. ***In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of anthrone and chromone from the latex of *Aloe harlana* Reynolds.** PHYTOTHER RES 25(12):1756-1760.
- Beckman JS, Chen J, Ischiropoulos, Crow JP. 1994. **Oxidative chemistry of peroxynitrite.** METHODS ENZYMOL 233:229-240a.
- Beppu H, Koike T, Shimpo K, Chihara T, Hoshino M, Ida C, Kuzuya H. 2003. **Radical-scavenging effects of *Aloe arborescens* Miller on prevention of pancreatic islet B-cell destruction in rats.** J ETHNOPHARMACOL 89(1):37-45.
- Bisby RH, Brooke R, Navaratman S. 2008. **Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay.** FOOD CHEM 108: 1002-1007.
- Calderón-Oliver M, Quiñones Peña MA, Pedraza-Chaverrí J. 2011. **Efectos benéficos del *Aloe* en la salud.** VERTIENTES REVISTA ESPECIALIZADA EN CIENCIAS DE LA SALUD 14(2):53-73.
- Can A, Akev N, Ozsoy N, Bolkent S, Arda BP, Yanardag R, Okyar A. 2004. **Effect of *Aloe vera* leaf gel and pulp extracts on the liver in type-II diabetic rat models.** BIOL PHARM BULL 27(5):694-698.
- Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverrí J. 2006. **Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos.** EDUCACIÓN QUÍMICA 17(2):164-173.
- Crow JP. 1997. **Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species.** NITRIC OXIDE 1(2):145-157.
- de Vries HE, Witte M, Hondius D, Rozemuller AJ, Drukarch B, Hoozemans J, van Horssen J. 2008. **Nrf2-induced antioxidant protection: a promising target to counteract ROS-mediated damage in neurodegenerative disease?** FREE RADIC BIOL MED 45(10):1375-1383.
- Esteban A, Zapata JM, Casano L, Martín M, Sabater B. 2000. **Peroxidase activity in *Aloe barbadensis* commercial gel: probable role in skin protection.** PLANTA MED 66(8):724-727.
- Fernandes E, Toste SA, Lima JL, Reis S. 2003. **The metabolism of sundalic enhances its scavenging activity against reactive oxygen and nitrogen species.** FREE RADIC BIOL MED 35(9):1008-1017.
- Fialkow L, Wang Y, Downey GP. 2007. **Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function.** FREE RADIC BIOL MED 42(2):153-164.
- Floriano-Sánchez E, Villanueva C, Medina-Campos ON, Rocha D, Sánchez-González DJ, Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverrí J. 2006. **Nordihydroguaiaretic acid is a potent in vitro scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents in vivo ozone-induced tyrosine nitration in lungs.** FREE RADIC RES 40(5):523-533.
- Fridovic I. 1995. **Superoxide radical and superoxide dismutases.** ANNU REV BIOCHEM 64:97-112.

Gilbert BC, Harrington G, Scrivens G, Silvester S. 1997. **EPR studies of Fenton-type reactions in Copper-Peroxide**. En: Minisci F, (ED) FREE RADICALS IN BIOLOGY AND ENVIRONMENT. Kluwer, Holanda:49-62.

Glazer AN. 1990. **Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species**. METHODS ENZYMOL 186:161-168.

Goyal PK, Gehlot P. 2009. **Radioprotective effects of *Aloe vera* leaf extract on swiss albino mice against whole-body gamma irradiation**. J ENVIRON PATHOL TOXICOL ONCOL 28(1):53-61.

Halliwell B, Gutteridge M. 2007. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press. Nueva York, EUA. 4^{ta} ed.: 80, 187-189.

Howard JA, Mendenhall GD. 1975. **Autoxidation and Photooxidation of 1,3-diphenylisobenzofuran: A Kinetic and Product Study**. CAN J CHEM 53(14):2199-2201.

Hu Q, Hu Y, Xu J. 2005. **Free radical scavenging activity of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) extracts by supercritical carbon dioxide extraction**. FOOD CHEM 91:85-90.

Hu Y, Xu J, Hu Q. 2003. **Evaluation of antioxidant potential of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) extracts**. J AGRIC FOOD CHEM 51(26):7788-7791.

Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan J, Prior R. 2002. **High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format**. J AGRIC FOOD CHEM 50(16):4437-4444.

Jain N, Vijayaraghavan R, Pant SC, Lomash V, Ali M. 2010. ***Aloe vera* gel alleviates cardiotoxicity in streptozocin-induced diabetes in rats**. J PHARM PHARMACOL 62(1):115-123.

Kaithwas G, Dubey K, Pillai KK. 2011. **Effect of aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) gel on doxorubicin-induced myocardial oxidative stress and calcium overload in albino rats**. INDIAN J EXP BIOL 49(4):260-268.

Kammoun M, Miladi S, Ben Ali Y, Damak M, Gargouri Y, Bezzine S. 2011. ***In vitro* study of the PLA2 inhibition and antioxidant activities of *Aloe vera* leaf skin extracts**. LIPIDS HEALTH DIS 10:30.

Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H. 1997. **Oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein by peroxynitrite**. FREE RADIC RES 27(3):245-254.

Landino LM, Mall CB, Nicklay JJ, Dutcher SK, Moynihan KL. 2008. **Oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid, by the biologically relevant oxidants peroxynitrite anion, hydrogen peroxide and hypochlorous acid**. NITRIC OXIDE 18(1):11-8.

Loots du T, van der Westhuizen FH, Botes L. 2008. ***Aloe ferox* leaf gel phytochemical content, antioxidant capacity, and possible health benefits**. J AGRIC FOOD CHEM 55:6891-6896.

Maisuthisakul P, Suttajit M, Pongsawatmanit R. 2007. **Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants**. FOOD CHEM 100(4):1409-1418.

Manojlovic N, Vasiljevic P, Maskovic P, Juskovic M, Bogdanovic-Dusanovic G. 2011. **Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of lichen *Umbilicaria cylindrical* (L.) Delise (Umbilicariaceae)**. EVID BASED COMPLEMENT ALTERNAT MED 2012:452431.

- Martínez G. 2005. **Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno.** REV CUBANA FARM 39(3):9-11.
- Medina-Campos ON, Barrera D, Segoviano-Murillo S, Rocha D, Maldonado PD, Mendoza-Patiño N, Pedraza-Chaverrí. 2007. **S-allylcysteine scavenges singlet oxygen and hypochlorous acid and protects LLC-PK(1) cells of potassium dichromate-induced toxicity.** FOOD CHEM TOXICOL 45(10):2030-2039.
- Ojha S, Sonker K, Pandey M, Saraf SA. (2011) ***Aloe vera* gel a potent nutraceutical.** J NAT PHARM 2: 36-39.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 2002. **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005.** OMS 2002.1:1-19.
- Ozsoy N, Candoken E, Akev N. 2009. **Implications for degenerative disorders: antioxidative activity, total phenols, flavonoids, ascorbic acid, beta-carotene and beta-tocopherol in *Aloe vera*.** OXID MED CELL LONGEV 2(2):99-106.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. 2007. **Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease.** PHYSIOL REV 87(1):315-424.
- Pandey R, Mishra A. 2010. **Antibacterial activities of crude extract of *Aloe barbadensis* to clinically isolated bacterial pathogens.** APPL BIOCHEM BIOTECHNOL 160:1356-1361.
- Park MY, Kwon HJ, Sung MK. 2009. **Evaluation of aloin and aloe-emodin as anti-inflammatory agents in aloe by using murine macrophages.** BIOSCI BIOTECHNOL BIOCHEM 73:828-832.
- Pedraza-Chaverrí J, Medina-Campos ON, Ávila-Lombardo R, Zúñiga-Bustos BA, Orozco-Ibarra M. 2006. **Reactive oxygen species scavenging capacity of different cooked garlic preparations.** LIFE SCI 78:761-770.
- Qu X, Kirschenbaum LI, Borish ET. 2000. **Hydroxyterephthalate as a fluorescent probe for hydroxyl radicals: application to hair melanin.** PHOTOCHEM PHOTOBIO 71(3):307-313.
- Rajasekaran S, Sivagnanam K, Subramanian S. 2005. **Modulatory effects of *Aloe vera* leaf gel extract on oxidative stress in rats treated with streptozotocin.** J PHARM PHARMACOL 57:241-246.
- Reynolds T. **Aloes: the genus *Aloe*.** 2004. CRC PRESS:44-79, 216-245.
- Rodríguez-Rodríguez E, Darias Martín J, Díaz Romero C. 2010. ***Aloe vera* as a functional ingredient in foods.** CRIT REV FOOD SCI NUTR 50:305-326.
- Sabeh F, Wright T, Norton SJ. 1993. **Purification and characterization of a glutathione peroxidase from the *Aloe vera* plant.** ENZYME PROTEIN 47(2):92-98.
- Sabeh F, Wright T, Norton SJ. 1996. **Isozymes of superoxide dismutase from *Aloe vera*.** ENZYME PROTEIN 49(4):212-221.
- Singh RP, Dhanalakshmi S, Rao AR. 2000. **Chemomodulatory action of *Aloe vera* on the profiles of enzymes associated with carcinogen metabolism and antioxidant status regulation in mice.** PHYTOMEDICINE 7(3):209-219.

- Tang B, Zhang L, Geng Y. 2005. **Determination of the antioxidant capacity of different food natural products with a new developed flow injection spectrofluorimetry detecting hydroxyl radicals.** TALANTA 65(3):769-775
- Turrens JF. 2003. **Mitochondrial formation of reactive oxygen species.** J PHYSIOL 552(Pt 2):335-344.
- Valentão P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, de Lourdes Basto M. 2002. **Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid.** BIOL PHARM BULL 25(10):1324-1327.
- van Muiswinkel FL, Kuiperij HB. 2005. **The Nrf2-ARE signalling pathway: promising drug target to combat oxidative stress in neurodegenerative disorders.** CURR DRUG TARGETS CNS NEUROL DISORD 4(3):267-281.
- Villaño D, Fernández-Pachón MS, Moyá ML, Troncoso AM, García-Parrilla MC, 2007. **Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical.** TALANTA 71:230-235.
- Wozniak M, Tanfani F, Bertoli E, Zolese G, Antosiewicz J. 1991. **A new fluorescence method to detect singlet oxygen inside phospholipid model membranes.** BIOCHIM BIOPHYS ACTA 1082(1):94-100.
- Yagi A, Kabash A, Okamura N, Haraguchi H, Moustafa SM, Khalifa TI. 2002. **Antioxidant, free radical scavenging and anti-inflammatory effects of aloesin derivatives in *Aloe vera*.** PLANTA MED 68(11):957-960.
- Yan EB, Unthank JK, Castillo-Melendez M, Miller SL, Langford SJ, Walker DW. 2005. **Novel method for in vivo hydroxyl radical measurement by microdialysis in fetal sheep brain in utero.** J APPL PHYSIOL 98(6):2304-2310.
- Yoo EA, Kim SD, Lee WM, Park HJ, Kim SK, Cho JY, Min W, Rhee MH. 2008. **Evaluation of antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory activities of ethanol extracts from *Aloe saponaria* Haw.** PHYTOTHER RES 22(10): 1389-1395.
- Yu Z, Jin C, Xin M, JianMin H. 2009. **Effect of *Aloe vera* polysaccharides on immunity and antioxidant activities in oral ulcer animal models.** CARBOHYDR POLYM 75: 307-311.