

Estudios *in vitro* de los mecanismos fotooxidantes y antioxidantes de los principios activos del Aloe Vera

FRANKLIN VARGAS e YRENE DÍAZ

Laboratorio de Fotoquímica, Centro de Química,
Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas I.V.I.C., Caracas – Venezuela.
fvargas@ivic.ve

RESUMEN

En este trabajo se determinó la fototoxicidad *in vitro* sobre eritrocitos humanos, de los principios activos del Aloe vera, emodina aloe-emodina y rheina. Esto fue analizado por medio de espectrofotometría UV-Vis y fluorescencia en diferentes medios, bajo fuentes de irradiación Visible y UV-A. El estudio de la capacidad antioxidante de estos tres compuestos se determinó mediante estudios de quimioluminiscencia y se comparó con la de las vitaminas E y C. La capacidad de desactivar radicales hidroxilo fue evidenciado para la Emodina y Rheina, siendo similar a las de la vitaminas E y C. Mientras que la capacidad antioxidante de la Aloe-emodina fue mucho menor que las anteriores.

ABSTRACT

In this work was detected the *in vitro* phototoxicity of emodin on red blood cells. The phototoxicity was determined by means of espectroscopía UV-Vis and fluorescence and in different means (in inert atmosphere and/or oxygenated); on different irradiation sources visible and UV-A light. The antioxidant activity of these drugs was determined by chemiluminescence and compare with vit. E and C. The capacity to disable hydroxyl radicals was evidenced for the emodin and rhein, being similar to those of the vitamins E and C, while the capacity antioxidante of the aloe-emodina it was much smaller that the previous ones.

PALABRAS CLAVE

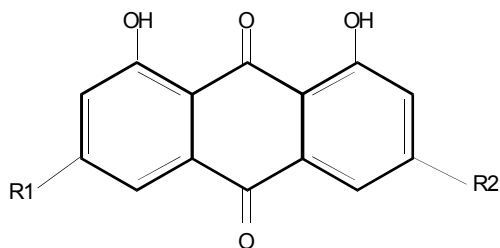
Fototoxicidad, aloe vera, emodina, quimioluminiscencia, antioxidante.

INTRODUCCIÓN

A pesar de las propiedades medicinales, relativamente eficaces, que la hojas de Aloe vera contienen, en el tratamiento de enfermedades como la

artritis, actividad antitumoral, antibacterial y anticancerígena, evaluadas en diversos sistemas celulares (Davis *et al*, 1992) (Inbaraj, 1999a), son numerosos los trabajos que revelan a estas sustancias como agentes citotóxicos y/o genotóxicos (Avila *et al*, 1997) (Morita *et al*, 1988). De igual manera han sido comprobadas las mismas acciones biológicas de sus principios activos, las antraquinonas emodina, aloe-emodina y rheina. Otros estudios revelan que algunas antraquinonas sintéticas y de origen vegetal son capaces de producir radicales libres y oxígeno singlete (1O_2) altamente citotóxico, cuando se irradian con luz visible, UVA y UVB (Vargas, 1997) (Vargas, 2000) (Inbaraj *et al*, 1999b). Clínicamente se han reportado algunos casos de fototoxicidad, como fotodermatitis (Brandao y Valente, 1988) causados por antraquinonas sintéticas y también por preparados provenientes de Aloe vera (Dominguez-Soto, 1992). La capacidad fotosensibilizante (generación de oxígeno singlete) de estos derivados puede ser empleada en el tratamiento conocido como terapia fotodinámica, en la cual células tumorales pueden ser destruidas por la acción de drogas fotosensibilizantes como la emodina (Vargas *et al*, 2001). También ha sido posible descontaminar de virus y bacterias en concentrados de plaquetas (fotoesterilización de derivados sanguíneos mediante fotosensibilizadores) con la finalidad de ser empleadas de manera confiable en transfusiones (Vargas y Peláez, 2000).

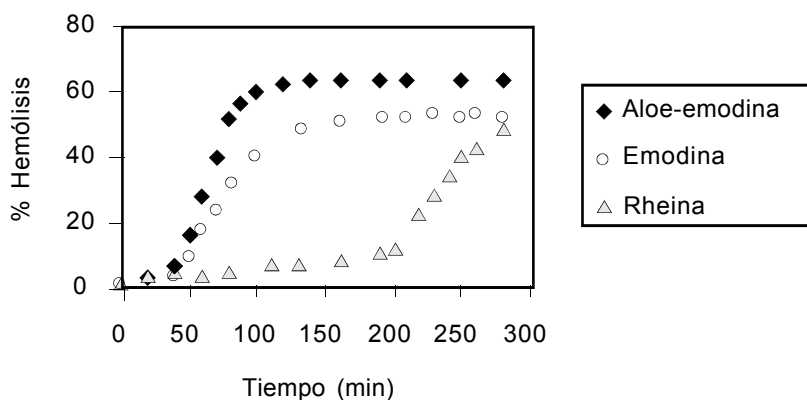
Ha sido de nuestro interés el estudio de la fototoxicidad mediante los ensayos *in vitro* (fotohemólisis) sobre eritrocitos humanos. De este estudio se determinarían los mecanismos fotooxidantes de tres principios activos del Aloe vera, la Emodina, Aloe-emodina y Rheina. También se evaluarían las capacidades que posiblemente tengan estos 3 compuestos de secuestrar radicales libres oxigenados formados en un medio neutro. Esta capacidad antioxidante podrá ser medida mediante la restricción de la quimioluminiscencia producida por el luminol e isoluminol inducida por iniciadores como H_2O_2 y $FeSO_4$ en presencia de estas antraquinonas.



- (1) Emodina : $R_1 = OH; R_2 = CH_3$
 (2) Aloe.emodina: $R_1 = CH_2OH; R_2 = H$
 (3) Rheina : $R_1 = CO_2H; R_2 = H$

METODOLOGÍA

Para el experimento de fotohemólisis se obtuvo una suspensión de eritrocitos (glóbulos rojos), a partir de la centrifugación de sangre humana completa. Estos glóbulos rojos fueron lavados 3 veces con una solución salina de buffer fosfato (PBS) de pH 7.4 y centrifugados de nuevo, mientras que el sobrenadante fue eliminado. Se prepararon dispersiones de glóbulos rojos diluidas en PBS y se procedió a medir sus valores de absorbancia hasta obtener una lectura entre 0.600 y 0.800 a 650 nm, esto con la finalidad de tener en la dispersión una cantidad aproximada de $3,3 \times 10^6$ células/ml. Estos ensayos de fotohemólisis sobre eritrocitos humanos con Emodina, Aloe-emodina y Rheina (1.0×10^{-2} M a 1.0×10^{-5} M en etanol) fueron desarrollados según los métodos establecidos en la referencia (Vargas *et al*, 1998). Las soluciones se mantuvieron a temperatura ambiente bajo la irradiación de dos lámparas Osram de mercurio con filtro envoltorio que emiten en la zona UV-A (320 – 400 nm, 18 mW/cm²). También se repitieron los ensayos irradiando con un láser de nitrógeno (UV-A, 337 nm, GL-3300 Photon Technology International, New Jersey, USA) con potencia de 2.4 MW a 5 Hz y 1.45 mJ de energía por pulso). Luego se irradiaron las muestras con nueve tubos de luz fluorescente negra, en la zona UV-B (290 – 320 nm, 3.3 mW/cm²) en un equipo Rayonet. La distancia entre la fuente de luz y la muestra no sobrepasaban los 10 cm.



Para el estudio mecanístico del proceso de fotohemólisis el mismo procedimiento anterior fue repetido pero ahora en presencia de aditivos como: glutatión reducido (GSH) atrapador de radicales libres y azida de sodio (NaN_3) atrapador de oxígeno singlete (1O_2). Además, se prepararon muestras de control en la oscuridad. Se procedió al análisis espectrofotométrico de manera análoga al procedimiento anterior. Todos los experimentos fueron realizados 3 veces por separado.

La actividad antioxidante de los compuestos 1, 2 y 3 se determinó en sistemas libres de células mediante la desactivación de la quimioluminiscencia (QL) del luminol e isoluminol inducida por iniciadores como H_2O_2 y $FeSO_4$ a pH neutro (Yildiz y Demiryürek, 1998a). Las soluciones de luminol (250 mM/PBS), de NaOH 2M y PBS fueron inyectadas sobre las de las antraquinonas (1.0×10^{-2} M a 1.0×10^{-5} M) en etanol. Se midieron las cinéticas de QL a 37°C durante 10 minutos. Los patrones fueron utilizados en ausencia de las drogas. Activación de la luminescencia del isoluminol mediante la peroxidasa de rábano se procedió igual al procedimiento anterior. También se pudo estudiar la desactivación de la quimioluminiscencia por las drogas 1, 2 y 3 producida mediante la generación de radicales hidroxilos por la reacción entre $FeSO_4$ (1×10^{-4} M/PBS) y luminol (Yildiz, *et al*, 1998b). Inmediatamente se midieron las cinéticas de QL a 37°C. Las medidas fueron realizadas en un luminómetro Luminoskan Ascent (ThermoLabsystems, Finland) sobre platos de 96 pozos.

Los compuestos Emodina, Aloe-emodina y Rheina fueron suministrados por Sigma (St Louis, USA). Todos los solventes utilizados fueron del grado analítico o HPLC suministrados por Merck (Darmstadt, Germany). GSH, NaN_3 , H_2O_2 y $FeSO_4$ fueron suministrados por Aldrich (Steinheim, Germany).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante los ensayos *in vitro* de fotohemólisis se determinó que la Aloe-emodina es más fototóxica, que la Emodina y la Rheina. En especial se resalta que esta última mostró un carácter muy poco fotohemolítico (Figura 1).

Figura 1. Hemólisis de eritrocitos fotosensibilizada por Aloe-emodina, Emodina y Rheina. Cada punto representa la media \pm SEM (< 7 %) derivada de tres mediciones.

La acción fototóxica sobre los eritrocitos fue realizada también en condiciones anaeróbicas lo que resultó ser 5 veces menor que en las aeróbicas. Este resultado indica la participación de especies oxigenadas reactivas en el proceso, como el oxígeno singlete (1O_2). La participación de esta especie oxigenada fue también comprobada al observarse una reducción pronunciada (~40%) de la fotohemólisis en presencia de azida de sodio (un específico desactivador de oxígeno singlete). El ensayo de fotohemólisis fue también repetido en presencia de glutatión (un atrapador de radicales libres). Se observó en esta prueba una reducción (~30%) del proceso fotohemolítico, lo que indica la formación de radicales libres intermediarios durante el proceso fotoquímico, además de las especies oxigenadas reactivas determinadas anteriormente.

Mediante los ensayos de quimioluminescencia se pudo determinar la capacidad antioxidante de las tres antraquinonas estudiadas. Durante la iniciación de las reacciones para producir quimioluminescencia, bien sea en el proceso oxidativo del luminol o isoluminol por H_2O_2 o por peroxidasa de rábano, como también por $FeSO_4$ se producen principalmente radicales hidroxilos ($\cdot OH$). En presencia de las antraquinonas **1**, **2** y **3** se pudo medir la reducción de la intensidad de la quimioluminescencia detectada en ausencia de ellas. Esta capacidad inhibitoria del proceso de quimioluminescencia es debido al carácter atrapador o desactivador de los radicales hidroxilos formados en el medio de la reacción. Esta capacidad antioxidante fue en el siguiente orden, Emodina > Rheina > Aloe-emodina. Sin embargo, al ser comparadas con la actividad antioxidante de las vitaminas E y C en un sistema similar, se determinó que la capacidad antioxidante de los compuestos **1**, **2** y **3** fue un poco menor que la de estas vitaminas.

Evaluando los ensayos de fotohemólisis y de quimioluminescencia se puede determinar que los principios activos del Aloe-vera aquí estudiados poseen propiedades antioxidantes. Los compuestos **1**, **2** y **3** pueden atrapar las especies oxigenadas reactivas, como oxígeno singlete y/o radicales libres formados en el medio durante su fotólisis. Es importante resaltar que por acción de la luz sobre estas drogas se puede originar además un proceso de auto-oxidación de las mismas, alterando su acción farmacológica.

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en este trabajo se determina que la Aloe-emodina y la Emodina tienen un moderado carácter fototóxico en condiciones aeróbicas, desarrollado predominantemente por procesos de transferencia de energía al oxígeno. La capacidad de desactivar radicales hidroxilos fue evidente para la Emodina (**1**) y Rheina (**3**), la cual al ser comparada con las de las vitaminas E y C, resultó ser similar a con estos conocidos antioxidantes. Mientras que la capacidad antioxidante de la Aloe-emodina (**2**) fue mucho menor que las antraquinonas **1** y **3**. Esto puede estar relacionado directamente con su mayor carácter fotohemolítico, ya que podría generar mayor cantidad de especies oxigenadas reactivas y radicales libres durante su exposición a la luz, siendo estos atrapados o desactivados en menor grado por la Aloe-emodina. Igual razonamiento se deduce para la Rheina (**3**), la cual no presenta algún carácter fotohemolítico notable, pero si, un alto grado de actividad antioxidante, comprobado mediante la desactivación de la quimioluminescencia producida en estos ensayos. Estos resultados son de primordial interés para las aplicaciones fototerapéuticas a nivel clínico de los derivados antraquinoides del Aloe vera.

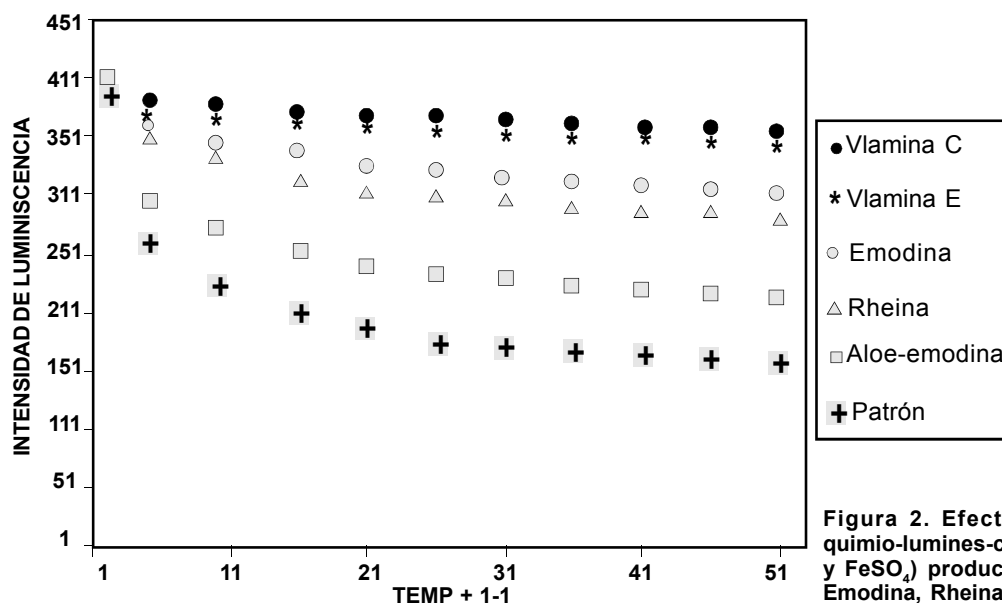


Figura 2. Efecto desactivante de la quimioluminescencia de luminol (H_2O_2 y $FeSO_4$) producida por Aloe-emodina, Emodina, Rheina, Vitaminas E y C.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Avila, H., Rivero, J., Herrera, F. y Fraile, G. 1997. **Cytotoxicity of low molecular weight compounds from Aloe vera gel.** *Toxicon*. Vol. 35: 1423-1430.

Brandao, F. M. y Valente, A. 1988. **Photodermatitis from anthraquinone.** *Contact Dermatitis* Vol. 18: 171-172.

Davis, R., Stewart, G. y Bergman, P. 1992. **Aloe vera and the inflamed synovial pouch model.** *J. Am. Pediatr. Med. Assoc.* Vol. 82: 140-148.

Dominguez-Soto, L. 1992. **Photodermatitis to Aloe vera.** *Int. J. Dermatol.* Vol. 31: 372.

Inbaraj, J., Gandhidasan, R. y Murugesan R. 1999a. **Cytotoxicity and superoxide anion generation by some naturally occurring quinones.** *Free Rad. Biol. Med.* Vol. 26: 1072-1078.

Inbaraj, J., Krishna, M., Gandhidasan, R. y Murugesan, R. 1999b. **Cytotoxicity redox cycling and photodynamic action of two naturally occurring quinones.** *Biochim. Biophys. Acta* Vol. 1472: 462-470.

Morita, H., Umeda, M., Masuda, T. y Ueno, Y. 1988. **Cytotoxic and mutagenic effects of emodin on cultured mouse carcinoma FM3A cells.** *Mutat. Res.* Vol. 204: 329-332.

Vargas, F. 1997. **Singlet oxygen generation in the photolysis of drugs.** En: *Modern Topics in Photochemistry and Photobiology.* Editor Franklin Vargas, Publicado por Research Signpost, Trivandrum, India. P. 27-40.

Vargas, F., Martínez, I., Sequera, J., Méndez, H., Rojas, J., Fraile, G., Velásquez, M. y Medina, R. 1998. **Photodegradation and phototoxicity studies of furosemide. Involvement of singlet oxygen in the photoinduced hemolysis and lipid peroxidation.** *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* Vol. 42: 219-225.

Vargas, F. 2000. **Oxígeno singlete (1O_2), perjuicios y beneficios sobre sistemas biológicos. Aplicaciones en esterilización de sangre.** *Revista de la Sociedad Venezolana de Química.* Vol. 23: 18-28.

Vargas, F. y Peláez, C. 2000. **Fotogeneración de especies reactivas de oxígeno y el estrés oxidativo.** *Revista de la Sociedad Venezolana de Química.* Vol. 23: 3-12.

Vargas, F., Méndez, H., Fuentes, A., Sequera, J., Fraile, G., Velásquez, M., Cáceres, G. y Cuello, K. 2001. **Photosensitizing activity of the thiocolchicoside. Photochemical and in vitro phototoxicity studies.** *Die Pharmazie.* Vol. 56: 83-88.

Yildiz, G. y Demiryürek, T. 1998a. **Ferrous iron-induced luminol chemiluminescence: A method for hydroxyl radical study.** *J. Pharmacological and Toxicological Methods.* Vol. 39: 179-184.

Yildiz, G., Demiryürek, T., Sahin-Erdemli, I. y Kanzik, I. 1998b. **Comparison of antioxidant activities of aminoguanidine, methylguanidine and guanidine by luminol-enhanced chemiluminescence.** *J. Pharmacol.* Vol. 124: 905-910.