

Trabajo Científico

Actividad antimicrobiana del extracto proteico de hojas de *Aloe vera*

Antimicrobial activity of protein extract of *Aloe vera* leaves

Ethel Daniela Cabello Ruiz,¹ Gloria María Molina Salinas,² Víctor Manuel Torres de la Cruz,^{3,4} María Adriana Núñez González,¹ Azucena Oranday Cárdenas,¹ María Julia Verde Star,¹ Laura Elia Martínez de Villarreal,⁴ Catalina Rivas Morales¹

¹ Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México

² Unidad de Investigación Médica Yucatán, Unidad Médica de Alta Especialidad, Centro Médico Ignacio García Téllez, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mérida, Yucatán, México

³ Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, Nuevo León, México

⁴ Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, México

Resumen

Las enfermedades infecciosas son un problema de Salud Pública que se agrava con microorganismos resistentes. Esto conduce al desarrollo de nuevos fármacos. Recientemente surgió el estudio de actividades farmacológicas de proteínas de fuentes naturales. En esta investigación se realizó la extracción de proteínas del gel de *Aloe vera* y su evaluación antimicrobiana. Se obtuvieron extractos proteicos de *A. vera* por dos métodos: Extracto 1 (EP1) precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y extracto 2 (EP2) extracción con fenol. El rendimiento para el método 2 (0.33 % recuperación). Análisis por espectrometría de masas EP1 permitió identificar un péptido y una proteína de 5 y 31 kDa, relacionada con glicoproteínas de *Arabidopsis thaliana*. EP2 mostró actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. *A. vera* es una fuente prometedora de proteínas con actividad anti-*S. aureus* y -*C. albicans*.

Abstract

Infectious diseases remain a public health problem that is exacerbated by the presence of resistant organisms leading to development of novel drugs. Study of pharmacological proteins from natural sources recently emerged. In this research extraction of proteins from gel of *Aloe vera* and antimicrobial evaluation were done. Protein extracts from *Aloe vera* were obtained by two methods: extract 1(EP1) by precipitation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and (EP2) by phenol extraction. The yield for method 2 (0.33 % recovery). Analysis by mass spectrometry of EP1 identified with a high degree of confidence, peptide 5 and 31-kDa protein, whose identity has been associated with the glycoproteins of *Arabidopsis thaliana*. EP2 exhibited inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *A. vera* extract comprises a promising source of protein with anti-*S. aureus* and anti-*C. albicans* activity.

Palabras clave: *Aloe vera*, proteínas, actividad antimicrobiana.

Key words: *Aloe vera*, protein, antimicrobial activity.

Correspondencia:

Dra. Catalina Rivas Morales
Laboratorio de Química Analítica
Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León
Pedro de Alba s/n, Cd. Universitaria. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México
Tel. 81 8329 4000 Ext. 3652 Fax 81 8352 5011
E-mail: catalinarivas@yahoo.com.mx

Fecha de recepción: 05 de marzo de 2015

Fecha de recepción de modificaciones: 17 de junio de 2015

Fecha de aceptación: 02 de julio de 2015

Introducción

Las infecciones de las vías respiratorias bajas son la principal causa infecciosa de defunción. Tan solo 1 de cada 100 muertes corresponde a niños menores de 15 años. En los países de ingresos bajos, aproximadamente 4 de cada 10 muertes ocurren en niños menores de 15 años, y solo 2 de cada 10 muertes corresponden a personas de 70 años o más. La causa predominante de defunción son las enfermedades infecciosas: en conjunto, las infecciones de las vías respiratorias bajas, la infección por el VIH/sida, las enfermedades diarréicas, el paludismo y la tuberculosis causan casi una tercera parte de las muertes en esos países.¹

Según un informe de la Organización Panamericana de la Salud, que actúa como Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud en las Américas hay una elevada resistencia por parte de algunos microorganismos. Ejemplo de ello, *Escherichia coli* resulta resistente a las cefalosporinas de tercera generación y a las fluoroquinolonas, dos clases importantes y muy utilizadas de fármacos antibacterianos. La resistencia de *Klebsiella pneumoniae* a las cefalosporinas de tercera generación también es elevada y generalizada. En algunos entornos, hasta un 90 % de las infecciones por *Staphylococcus aureus* son resistentes a la meticilina, lo cual significa que el tratamiento con los antibióticos habituales no funciona. En este último caso, se calcula que las personas infectadas por *S. aureus* resistentes a la meticilina tienen una probabilidad de morir un 64 % mayor que las infectadas por cepas no resistentes.²

En México las infecciones causadas por bacterias son una de las principales causas de enfermedades en la población, lo cual ha provocado que se destaque por la prevalencia de las mismas. Se calcula que 450 000 casos de infección relacionada con la atención sanitaria causan 32 muertes por cada 100 000 habitantes por año.^{3,4}

Otro padecimiento frecuente es la micosis superficial en piel y uñas,⁵ la mayoría causada por dermatofitos. De éstos las especies más frecuentemente encontradas son: *Trichophyton rubrum*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis* y *Epidermophyton floccosum*, destacándose a *T. rubrum* como el microorganismo de mayor incidencia en nuestro país.⁶ A lo anterior se suma que algunos microorganismos han desarrollado resistencia a distintos fármacos, además de que en México existen sesgos en la prevalencia de las inmunodeficiencias primarias debido al subregistro de los casos, producto del desconocimiento de los médicos sobre estos trastornos.^{2,7} Con lo anterior, surge la necesidad de la búsqueda de alternativas para el control de estas enfermedades; una de ellas es el empleo de plantas medicinales.

Aloe vera es una de las especies vegetales medicinales más importantes en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de diversos padecimientos como: tos, diabetes, erisipela, inflamación e infección de la piel, dolor de estómago y como vermífugo.⁸ Esta planta es comúnmente conocida como sábila y ha capturado el interés por sus múltiples actividades biológicas.

Recientemente se ha incrementado el estudio de la química y actividades farmacológicas presentadas por las proteínas, péptidos y glicoproteínas provenientes de fuentes naturales.^{9,10} Koike *et al.* (1995) reportaron una lectina aislada del *A. vera* de 35 kDa con actividad de estimulación mitótica de linfocitos, activación del complemento, alternativa, antiinflamatoria, antiúlcera y antitumoral, además de presentar actividad mitogénica.¹¹ Yagi *et al.* (1997) reportaron una glicoproteína de 29 kDa que aumenta la proliferación de las células dérmicas normales en el humano.¹² Choi *et al.* (2001) reportaron una glicoproteína que nombraron G1G1M1DI2 de 5.5 kDa aislada de *A. vera* con actividad proliferativa y de migración celular¹³ y Das *et al.* (2010) reportaron una proteína de 14 kDa aislada de *A. vera*, la cual mostró actividad antifúngica contra *C. parapsoriasis*, *C. krusei* y *C. albicans*.¹⁴ El *et al.* (2010) reportaron un octapeptido de *A. vera* con actividad antitumoral y antioxidante.¹⁵

El propósito de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de extractos proteicos del liofilizado de gel de *A. vera*.

Material y métodos

Material biológico

Planta: Liofilizado del gel de hoja *Aloe vera* proporcionado por la empresa Aloe Jaumave, S.A. de C.V. Jaumave, Tamaulipas México.

Bacterias: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 20), *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Salmonella typhi* (ATCC 6539) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25619).

Hongos: aislados clínicos de *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* y *T. tonsurans*.

Extracción de proteínas del liofilizado de gel de *A. vera*

La extracción de las proteínas se llevó a cabo a partir del liofilizado de gel de *A. vera* mediante dos métodos. Para el método 1 (M1) se siguió la técnica reportada por Costa *et al.*, (1998)¹⁶ con modificaciones: 5 g del liofilizado de *A. vera* se resuspendieron en 250 mL de una solución amortiguadora A (NaNO₃, KH₂PO₄ y NaN₃ [CTR, J.T. Baker y Spectrum respectivamente] y a pH 7) bajo agitación constante a 180 rpm

por 6 h en baño de hielo. La suspensión resultante se pasó a través de una membrana de poro de 1 y 0.45 μm y posteriormente se concentró a presión reducida. El concentrado obtenido se centrifugó a 3600 rpm \times 30 min a 4 °C y el sobrenadante recuperado se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (J.T. Baker) al 80 % (p/v). El precipitado se lavó con acetona (CTR) y se resuspendió en la solución amortiguadora B (Urea, NH_4HCO_3 y EDTA [J.T. Baker, CTR y CTR respectivamente]). El sobrenadante producto de la resuspensión, fue ultrafiltrado a través de una membrana de corte de 3 kDa y se obtuvo el extracto proteico 1 (EP1). Este procedimiento se repitió 5 veces.

Para la obtención del extracto por el método 2 (M2)¹⁷ se utilizaron 5 g de liofilizado de gel de *A. vera*, que se resuspendieron en 250 mL de una solución amortiguadora C (Tris-HCl [J.T. Baker], sacarosa, SDS y de β -mercaptoetanol [Sigma], a pH 8) y se mantuvieron en agitación constante a 180 rpm por 6 h en baño de hielo, para posteriormente mantenerlo a 4 °C por 12 h. Al término se realizó una centrifugación para eliminar material insoluble, posteriormente se hizo una extracción fenólica con una solución saturada en una relación 1:3 solución *A. vera*: fenol (Sigma) y posteriormente se centrifugó a 3600 rpm a 4 °C \times 30 min. La solución fenólica se recuperó y se precipitó con $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (Monterrey, Reactivo Analítico) 0.1 M en MeOH:H₂O (50:50), se agitó y se dejó en reposo durante la noche a -20 °C, después se centrifugó nuevamente. El precipitado se recuperó y se lavó 3 veces con acetona y finalmente se resuspendió en la solución amortiguadora B, obteniendo así el extracto proteico (EP2). Se realizaron 5 réplicas.

La concentración de proteínas de los extractos proteicos EP1 y EP2 se cuantificó por espectrofotometría UV-Vis en el equipo Nadodrop (ThermoScientific) a una longitud de onda de 280 nm. Los EPs se conservaron a -20 °C hasta su uso.

Determinación de la masa molecular

A los extractos proteicos EP1 y EP2 se les realizó una hidrólisis enzimática con tripsina, que consistió en cuatro etapas consecutivas. En la primera etapa, a 100 μL del EP1 o EP2 se les adicionaron 5 μL de Ditiotreitol (DTT; Pro-Pure) y se incubaron a 65 °C \times 45 min; en la segunda y tercera etapas se añadieron 4 μL de C₂H₄INO (Pro-Pure) y 20 μL de DTT, respectivamente y se incubaron a temperatura ambiente \times 45 min; finalmente a ambas digestiones se les adicionó tripsina, en una relación 1:20 (proteína: tripsina [Promega]) y se incubaron a 37 °C \times 18 h.

De los hidrolizados de EP1 y EP2 se inyectaron 2 μL en el sistema de nanocromatografía modelo nanoAcquity (Waters) utilizando como fase estacionaria una columna BHE (75 μm \times 150 mm y 1.7 μm de tamaño de partícula); como fase móvil se utilizó un gradiente de Agua:ACN (97:3 a 40:60 en 30 min).

La detección de los péptidos se realizó en un espectrómetro de masas (ortogonal cuadrupolo-tiempo de vuelo modelo Q-TOF Premier), configurado con una interfase nano *electrospray*. El proceso de bioinformática para la secuenciación e identificación se llevó a cabo con el software ProteinLynx Global server ver 2.5, en el cual se usó el algoritmo MASCOT para la obtención de la secuencia de aminoácidos de los péptidos y para la alineación con las secuencias proteicas se usó la base de datos de *Arabidopsis thaliana* en formato FASTA.

Evaluación de actividad antimicrobiana

Actividad antibacteriana¹⁸

Los inóculos bacterianos se prepararon por resiembra desde cultivos en medio sólido C. Rivas (Patente IMPI MX/10892) a tubos de ensayo que contenían 5 mL de caldo de cultivo C. Rivas. Estos tubos se incubaron a 37 °C \times 18–24 h.

En placas de Petri conteniendo medio sólido C. Rivas se inocularon con 100 μL de una suspensión bacteriana de 1 \times 10⁶ UFC mL⁻¹ (que corresponde 0.5 de la escala de Mc Farland). Posteriormente se realizaron orificios con una pipeta Pasteur en el agar, en los cuales se les depositaron 50, 200 y 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de EP1 o EP2 en medio C. Rivas. Como control negativo y positivo se utilizaron 25 μL de medio C. Rivas y gentamicina (32 mg mL⁻¹) respectivamente; las placas se incubaron a 37 °C \times 48 h, posteriormente se midieron los halos inhibición con ayuda de un Vernier y los resultados se expresaron en cm.¹⁵

Actividad antifúngica¹⁹

La preparación del inóculo de *C. albicans* se llevó a cabo de acuerdo a lo marcado anteriormente para actividad antibacteriana, en tanto que para los hongos filamentosos, una asada de micelio se depositó en una caja Petri con medio sólido C. Rivas y se incubó a 30 °C de 7–14 d. Posteriormente se recuperaron las conidias por arrastre de superficie con ayuda de un hisopo, se filtraron y se transfirieron a un tubo con 3 mL de H₂O destilada estéril. Se realizó el conteo de conidias mL⁻¹ en una cámara de Neubauer y se ajustó la densidad a 1–2 \times 10⁴ UFC mL⁻¹.

Para el ensayo contra hongos, se prepararon cajas Petri con medio sólido C. Rivas y se inoculó con 100 μL de cada cepa en su respectiva caja. Se hicieron orificios con una pipeta Pasteur y se colocaron en cada pocillo 50, 200 y 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de EP1 o EP2 en medio C. Rivas. Como control positivo y negativo se colocaron 25 μL de ketoconazol disuelto en H₂O estéril (32 mg mL⁻¹) y medio C. Rivas respectivamente. Las placas se incubaron a 30 °C por 24 h para *C. albicans* y de 7–14 d para los hongos filamentosos. Posteriormente se midieron los halos de inhibición con un Vernier y los resultados se expresaron en cm.²⁰

Resultados y discusión

Extracción de proteínas del liofilizado de gel de *A. vera*

En la extracción por el M1 se obtuvo un rendimiento promedio de 6.2 mg (DE \pm 1.26) de EP1 que corresponde a un porcentaje de recuperación de 0.1 % y por el M2 se obtuvo un rendimiento medio de 14.9 mg de EP2 (DE \pm 1.24) y que corresponde a un porcentaje de 0.3 %; de tal forma el M2 resultó ser 2.4 veces más eficiente que el M1. Murillo *et al.*, reportaron un rendimiento de 146.70 y 96.92 mg g⁻¹ de proteína total para colénquima y parénquima de *A. vera* respectivamente sin someterse a estrés salino con NaCl.²¹ El porcentaje de recuperación obtenido en este trabajo se encuentra por debajo de lo reportado por Murillo *et al.*, lo anterior atribuido a que la extracción y determinación de proteínas realizadas por dichos autores fue a partir de tejido seco que fue homogeneizado en una solución amortiguadora de extracción (KH₂PO₄, EDTA, polivinilpirrolidona) para posteriormente centrifugar la mezcla y recuperar el sobrenadante en donde se cuantificó proteínas totales por el método de Bradford. En este trabajo es importante señalar que la cuantificación de proteínas totales fue realizada para el extracto, resultado de un proceso de purificación.

En el espectro de UV de los extractos proteicos de *A. vera* que se muestran en la Figura 1, en EP1 se observa una señal característica de la presencia de proteínas a 280 nm, con el punto máximo de absorción desplazado y una mayor área baja la curva mientras que EP2 mostró la señal más próxima a 280 nm y una banda más estrecha lo cual indica mayor pureza.

Espectro UV de EP1 vs EP2

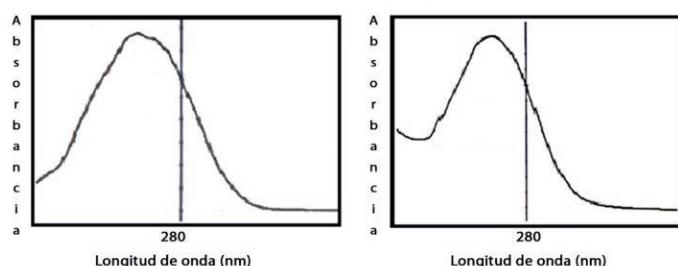


Figura 1. Comparación de la pureza de los extractos proteicos del gel liofilizado de *Aloe vera* EP1 (M1) y EP2 (M2)

Cabe señalar que el equipo NanoDrop (ThermoScientific) permite determinar el rendimiento en mg mL⁻¹ de las proteínas extraídas empleando como estándar ASB y además está adaptado para determinar la pureza de proteínas fraccionadas, estableciendo un radio ~1.8-2.00 para indicar la misma.

El incremento en la “pureza” del espectro UV-Vis del EP1 vs

EP2 utilizando como precipitante al fenol es debido a que el fenol favoreció una mayor remoción de sustancias interferentes disminuyendo la interacción molecular entre las proteínas y otros componentes como los azúcares¹⁷ brindando la ventaja al M2 en cuanto a su porcentaje de recuperación y de rendimiento proteico.

Determinación de la masa molecular

En el EP1 se identificaron por espectrometría de masas, péptidos los cuales fueron ontológicamente alineados con la enzima eterol O-aciltransferasa 1 y una glicoproteína de matriz M2, respectivamente (Figura 2). La primera de ellas producida por células hepáticas, relacionada con el metabolismo de lípidos, particularmente en el catabolismo de esterolos por lo que se dice que topológicamente tiene un dominio transmembrana. La base de datos relacional reporta interacción directa con proteínas de la familia de Lipasa 3 y con la peptidil-prolil-cis-trans-isomerasa de cloroplasto. Chen *et al.*, han reportado el aislamiento de esta enzima de *Arabidopsis thaliana* demostrando una notable actividad en el metabolismo de esterolos en la mejora de la calidad de las semillas.^{22,23} Cabe mencionar que no existen reportes de su actividad antimicrobiana, sin embargo se infiere que la enzima participa en los procesos inflamatorios en la respuesta inmune a la infección por ciertos microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*.

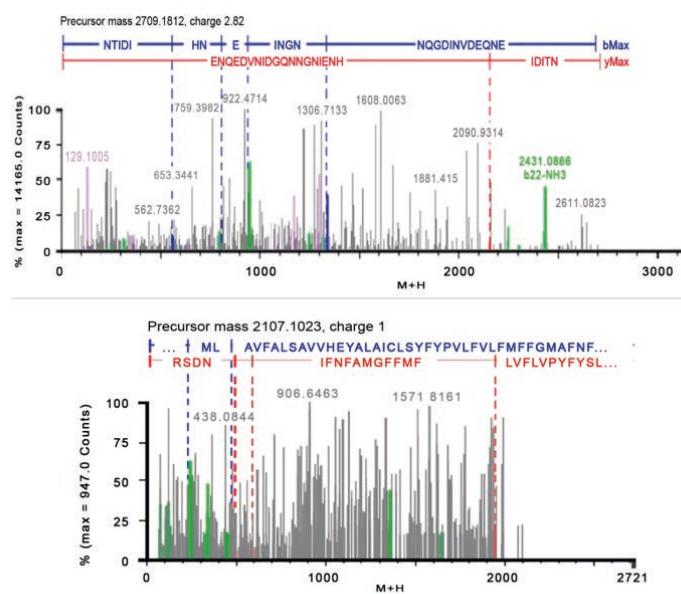


Figura 2. Espectros de masas de los péptidos de 31 y 5kDa (superior e inferior respectivamente) obtenidos del EP1 de *A. vera*.

La segunda proteína, reportada como una glicoproteína de matriz 2, también alinea fuertemente con una supuesto activador RAB GTPasa (NP_001118517.1) de *Arabidopsis thaliana*,

la cual participa ampliamente en los mecanismos de transporte a través de la membrana y en el tráfico intracelular. Funciona como canal iónico formando parte de las proteínas estructurales de la membrana, pero no se ha reportado ninguna actividad antimicrobiana directa.²³

El método de extracción (M2) con fenol ha permitido la identificación de proteínas, sin embargo no se detectaron los fragmentos necesarios relacionados con los precursores o péptidos detectados para asignar la secuencia de acuerdo a la base de datos MASCOT. Dado el muy bajo contenido de proteína de la planta resulta necesario la concentración de las muestras para lograr identificar un grupo mayor de proteínas o de secuencias peptídicas y lograr el fraccionamiento de proteínas a las cuales podamos atribuir la actividad antimicrobiana observada.

Cabe señalar que aunque han sido identificadas varias secuencias, las reportadas son las de confiabilidad superior al 90%.

Evaluación de actividad antimicrobiana

Nuestros resultados muestran que el EP1 no mostró actividad contra las bacterias y hongos evaluados, en tanto que EP2 mostró actividad inhibitoria del crecimiento contra *S. aureus* y *C. albicans* a 800 µg mL⁻¹ con un halo de inhibición de 0.8 y 1 cm, respectivamente y no exhibió actividad inhibitoria para el resto de las bacterias y los hongos filamentosos (Tabla 1). Para el EP2 bioactivo vs *S. aureus* y *C. albicans* no se lograron identificar sus componentes mediante el análisis por EM realizado. En tanto que para el EP1 no bioactivo, se logró identificar la presencia de un par de péptidos que presentan una actividad relacionada con el metabolismo de lípidos y con los mecanismos de transporte a través de la membrana y el tráfico intracelular.

Tabla 1. Actividad antimicrobiana del extracto proteico (EP2) de liofilizado de gel de *A. vera*

Microorganismo	Halo de inhibición de crecimiento (cm)		
	Concentración de EP2 (µg mL ⁻¹)		
	50	200	800
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0.8
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	0	0	0
<i>Salmonella typhi</i>	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0
<i>Candida albicans</i>	0	0	1.0
<i>Trichophyton rubrum</i>	0	0	0
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0	0	0
<i>Trichophyton tonsurans</i>	0	0	0

EP2 mostró actividad inhibitoria sobre *S. aureus* y *C. albicans*, no existen reportes previos con actividad antiestafilocócica del extracto proteico de *A. vera*, pero sí de actividad anti-*C. albicans*, por lo cual resulta necesario corroborar si la actividad mostrada por EP2 se trata de la proteína reportada y definir a quién se le atribuye la actividad antiestafilocócica, por lo cual el extracto proteico de sábila resulta una fuente prometedora de moléculas con actividad contra *S. aureus* y *C. albicans*.

Conclusiones

El método de extracción M2 permitió la obtención de un extracto proteico del liofilizado de gel de *A. vera* con mayor rendimiento y pureza EP2 comparado con el EP1 obtenido por el método M1. Se identificó en EP1 la proteína esterol-o-aciltransferasa1 (ATSAT1), esta enzima se ha aislado de *Arabidopsis thaliana* y la glicoproteína de matriz 2 alinea fuertemente con un activador RAB GTPasa (NP_001118517.1) de *A. thaliana*. EP2 mostró actividad sobre *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* y no existen reportes previos con actividad antiestafilocócica del extracto proteico de *A. vera*. El extracto proteico de sábila resulta una fuente prometedora de moléculas con actividad anti-*S. aureus* y anti-*C. albicans*.

Agradecimientos

Al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT: Becario número 393911. Así como a la Fundación Educación Superior-Empresa FESE y a la empresa Aloe Jaumave S.A. de C.V.

Referencias

- OMS Organización Mundial de la Salud. Las 10 causas principales de defunción en el mundo. 2015. [En línea] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/index2.htm> I. Acceso 4 Ene 2015.
- OMS Organización Mundial de la Salud. El primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos pone de manifiesto una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo. 2015. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>. Acceso 9 Ene 2015.
- OMS Organización Mundial de la Salud. Una atención más limpia es una atención más segura. 2015. <http://www.who.int/gpsc/background/es/>. Acceso 9 Ene 2015.
- DGE Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud. Estados Unidos Mexicanos. 2013. <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/>. Acceso 7 Ene 2015.

5. Abreu A, Lovio Z, Larrondo R. Dermatología en la atención primaria de salud. Avan Med. 1998; 5(16): 8-10.
6. López R, Manzano P, Hernández F, Bazán E, Méndez L. Dynamics of dermatophytosis frequency in Mexico: an analysis of 2084 cases. Med Mycol. 2010; 48(3): 476-479.
7. Coria E, Espinosa S, Espinosa F, Vargas M, Blancas L. Panorama epidemiológico de las inmunodeficiencias primarias en México. Rev Alergia Mex. 2010; 57(5): 159-163.
8. Andrade A. Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol Hidalgo, Mexico. J Ethnopharmacol. 2009; 112: 163-171.
9. Korhonen H, Pihlanto A. Food derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. Curr Pharm Design. 2003; 9: 1297-1308.
10. Farrokhi N, Whitelegge J, Brusslan J. Plant peptide and peptidomics. Plant Biotech J. 2008; 6: 105-134.
11. Koike T, Beppu H, Kuzuya H, Maruta K, Shimpo K, Suzuki M, Titani K, Fujita K. A 35 kDa manossa-binding lectin with hemagglutinating and mitogenic activities from Kidachi Aloe (*Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Beger). J Biochem. 1995; 118(6):1205-1210.
12. Yagi A, Egusa T, Arase M, Tanabe M, Tsuji H. Isolation and characterization of the glycoprotein fraction with a proliferation-promoting activity on human and hamster cells *in vitro* from *Aloe vera* gel. Planta Med. 1997; 63: 18–21.
13. Choi S, Son V, Son Y, Park Y, Lee S, Chung M. The wound healing effect of a glycoprotein fraction isolated from *Aloe vera*. J Dermatol. 2001; 145(4):535-545.
14. Das S, Mishra B, Gill K, Ashraf M, Singh A, Sinha M, Sharma S, Xess I, Dalal K, Sing T, Dey S. Isolation and characterization of novel protein with antifungal and antiinflammatory properties from *Aloe vera* leaf gel. Int J Biol Macromol. 2010; 48: 38-43.
15. El H, Aboul M, Nassr A, Aboul K, Kabash A, Yagi A. Antitumor properties and modulation of antioxidant enzymes activity by *Aloe vera* leaf active principles isolated via supercritical carbon dioxide extraction. Curr Med Chem. 2010; 17: 129-138.
16. Costa S, Pessoa A, Roberto I. Xylanase recovery. Effect of extraction conditions on the aqueous two-phase system using experimental design. Appl Biochem Biotechnol. 1998; 70-72:629-639.
17. Faurobert M, Pelpoir E, Chaib J. Methods in Molecular Biology. Plant Proteomics: Methods and Protocols. Thiellement H, editores. New York: Springer; 2007. p. 335.
18. Vega M, Verde J, Oranday A, Morales M, Núñez M, Rivera M, Serrano L, Rivas C. Actividad antibacteriana y Cítotóxica de *Leucophyllum frutescens* (Berl) I.M. Johnst del Norte contra *Staphylococcus aureus* de Aislados Clínicos. Rev Mex Cienc Farm. 2013; 44 (2): 24-30.
19. Padrón B, Oranday A, Rivas C, Verde M. Identificación de compuestos de *Melia Azedarach*, *Syzgium aromaticum* y *Cinnamomun zeylanicum* con efecto inhibitorio sobre bacterias y hongos. Ciencia UANL. 2003; 3: 333-338.
20. CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. <http://cls.org/>. Acceso 12 Dic 2014.
21. Murillo B, Córdoba M, Villegas J, Hernández L, Troyo E, García J. Mineral Content and Biochemical Variables of *Aloe vera* L. under Salt Stress. PLoS One. 2014; (4): e94870.
22. Chen Q, Steinhauer L, Hammerlindl J, Keller W, Zou J. Biosynthesis of Phytosterol Esters: Identification of a Sterol O-Acytransferase in *Arabidopsis*1[OA]. Plant Physiol. 2007; 145: 974–984.
23. Ang A, Folsch H, Koivisto U, Pypaert M, Mellman I. The Rab8 GTPase selectively regulates AP-1B-dependent basolateral transport in polarized Madin-Darby canine kidney cells. J Cell Biol. 2003; 163, 339-350.