

Evaluación de la fotoprotección de extractos de especies bacterianas de los filos Actinomycetota
y Bacteroidota frente al daño producido por la radiación ultravioleta

Victor Alfonso Carrero Pulido

Trabajo de Grado para Optar al Título de Biólogo

Director

Jorge Luis Fuentes Lorenzo

Doctor en Ciencias Agrícolas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, la Habana, Cuba

Codirector

Jhon Alexander Suescun Sepúlveda

Magíster en Biología, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Programa Académico

Bucaramanga

2024

Dedicatoria

Se dedica el trabajo, fruto del esfuerzo académico a quienes constantemente apoyan por la culminación de este ciclo, y la continuación de otro. A mi familia, en especial a mi madre, abuela y hermana. A la academia, el Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental LMMA-UIS.

Agradecimientos

Se reconoce y agradece a la Universidad Industrial de Santander (UIS). Al Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental LMMA-UIS por su financiamiento, junto con sus integrantes, especialmente al profesor Jorge Fuentes, Silvia Barrios, Silvia Flores, Diego Villamizar y Jhon Suescun por contribuir significativamente en el desarrollo del trabajo y otros aspectos. También al Laboratorio de Microbiología UIS por el préstamo de equipos.

Tabla de Contenido

	Pag
Introducción	10
1. Objetivos	12
1.1 Objetivo General	12
1.2 Objetivos Específicos.....	12
2. Competencias	12
3. Metodología	13
3.1 Material biológico.....	13
3.2 Producción de extractos bacterianos	13
3.3 Eficacia de fotoprotección <i>in vitro</i>	15
3.4 Evaluación genotóxica de los extractos	16
3.5 Evaluación antigenotóxica de los extractos	18
3.6 Análisis estadístico.....	19
4. Resultados	19
4.1 Eficacia fotoprotectora.....	19
4.3 Antigenotoxicidad de los extractos bacterianos.....	22
5. Discusión.....	24
6. Conclusiones	26
7. Recomendaciones	26
Bibliografía	27
Apéndices.....	32

Lista de Tablas**Pág.**

Tabla 1. <i>Lista de extractos bacterianos utilizados en el estudio. Se proporcionaron los códigos de las cepas correspondientes en la colección de cultivos y la base de datos de secuencias NCBI. Se mostró para cada extracto; la concentración, eficacia de protección UVB ($SPF_{in vitro}$) y longitud de onda crítica (λ_c)</i>	14
Tabla 2. <i>función de producto normalizada utilizada en el cálculo de los datos del $SPF_{in vitro}$....</i>	16

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. <i>Espectro de absorbanca UV-VIS de los extractos bacterianos mas prominentes</i>	20
Figura 2. <i>Correlación entre la eficacia de la fotoprotección ($SPF_{in vitro}$) y la concentración de los extractos bacterianos evaluados</i>	22
Figura 3. <i>Correlación exponencial entre la eficacia de la fotoprotección ($SPF_{in vitro}$) y las estimaciones del %GI en los extractos bacterianos evaluados</i>	23

Lista de Apéndices

	pág.
Apéndice A <i>Descripción del genotipo de la cepa E. coli PQ-37</i>	32
Apéndice B <i>Indice espectrofotométrico de fotoprotección UVB (SPF <i>in vitro</i>) para cada uno de los extractos y sus diluciones evaluadas</i>	33
Apéndice C <i>Indice de Fotoprotección Lambda Critico de amplio espectro (λ_c) para las cepas evaluadas y sus estadísticos</i>	33
Apéndice D <i>Indice de Antigenotoxicidad (%GI) de las cepas evaluadas y sus estadísticos</i>	35
Apéndice E <i>Indice de Genotoxicidad (I) de las cepas evaluadas y sus estadísticos</i>	36

Resumen

Título: Evaluación de la fotoprotección de extractos de especies bacterianas de las clases Actinobacteria y Bacteroidetes frente al daño producido por la radiación ultravioleta

Autor: Victor Alfonso Carrero Pulido

Palabras Clave: Fotoprotección, Actinomycetota y Bacteroidota, radiación UV.

Descripción: Las bacterias del filo Actinomycetota producen una variedad de metabolitos secundarios con propiedades fotoprotectoras en la piel. Este estudio tuvo como objetivo investigar las propiedades fotoprotectoras y antigenotóxicas contra los rayos UVB de extractos obtenidos de cepas de los filos Actinomycetota y Bacteroidota que se encuentran en el Cepario LMMA-UIS. La eficacia de la fotoprotección *in vitro* se evaluó utilizando el factor de protección solar ($SPF_{in vitro}$) y la longitud de onda crítica (λ_c). La antigenotoxicidad UVB (%GI) también se evaluó utilizando el SOS Chromotest. Se utilizó un análisis de correlación para examinar la relación entre la concentración como peso en húmedo, el $SPF_{in vitro}$ y las estimaciones del %IG. La eficacia de fotoprotección UVB fue la siguiente: dos extractos (*Kocuria flava*, *Chryseobacterium sp.*) con fotoprotección alta, cuatro extractos (*Kocuria rosea*, *Chryseobacterium sp.*) con fotoprotección media, diez con fotoprotección baja, y dos sin fotoprotección. Ningún extracto mostró una eficacia protectora de amplio espectro ($\lambda_c \geq 370$ nm). La eficacia fotoprotectora dependió de la concentración del extracto y se correlacionó con la antigenotoxicidad. Demostró que los extractos de las especies *Kocuria flava* y *Chryseobacterium sp.*, y en menor medida de *Kocuria rosea*, resultan promisorias como fuentes de compuestos útiles en fotoprotección.

* Trabajo de Grado

**Facultad de Ciencias básicas. Escuela de Biología. Director: Jorge Luis Fuentes Lorenzo. PhD en Ciencias Agrícolas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, la Habana, Cuba. Codirector: Jhon Alexander Suescun Sepúlveda. MSc en Biología, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Abstract

Title: Evaluation of the photoprotection of extracts of bacterial species of the Actinobacteria and Bacteroidetes classes against ultraviolet radiation damage

Author(s): Victor Alfonso Carrero Pulido

Key Words: Photoprotection, Actinomycetota y Bacteroidota, UV radiation.

Description: Bacteria of the phylum Actinomycetota produce a variety of secondary metabolites with photoprotective properties on the skin. This study aimed to investigate the photoprotective and antigenotoxic properties against UVB rays of extracts obtained from strains of the phylum Actinomycetota and Bacteroidota found in the LMMA-UIS Cepario. *In vitro* photoprotection efficacy was evaluated using the sun protection factor ($SPF_{in vitro}$) and critical wavelength (λ_c). UVB antigenotoxicity ($\%GI$) was also evaluated using the SOS Chromotest. Correlation analysis was used to examine the relationship between concentration as wet weight, $SPF_{in vitro}$ and $\%GI$ estimates. UVB photoprotection efficacy was as follows: two extracts (*Kocuria flava*, *Chryseobacterium sp.*) with high photoprotection, four extracts (*Kocuria rosea*, *Chryseobacterium sp.*) with medium photoprotection, ten with low photoprotection, and two with no photoprotection. No extract showed broad-spectrum protective efficacy ($\lambda_c \geq 370$ nm). Photoprotective efficacy was dependent on extract concentration and correlated with antigenotoxicity. It showed that extracts of *Kocuria flava* and *Chryseobacterium sp.* species, and to a lesser extent of *Kocuria rosea*, show promise as sources of compounds useful in photoprotection.

* Degree work

** Science faculty, Department of Biology. Advisor: Jorge Luis Fuentes Lorenzo. PhD in Agricultural Sciences, National Institute of Agricultural Sciences, Havana, Cuba. Co-Advisor: Jhon Alexander Suescun Sepúlveda. MSc in Biology, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Introducción

El incremento de la incidencia de la radiación solar debido a la degradación de la capa de ozono (Barnes et al., 2019), genera creciente preocupación por el daño que esta produce en la piel humana (Islami et al., 2020). La radiación UV comprende longitudes de onda (λ) de ultravioleta A (UVA, 320– 400 nm), ultravioleta B (UVB, 280– 320 nm) y ultravioleta C (UVC, 100– 280 nm). Esta última, es filtrada por la capa de ozono mientras que los rayos UVB (5%) y UVA (95%) llegan a la superficie de la Tierra (Schuch et al., 2017). Los rayos UVB están relacionados con la formación de daño en el ADN (dímeros de ciclobutano-pirimidina y fotoaductos de pirimidina-pirimidona) involucrados en la génesis de cáncer de piel, con procesos inflamatorios (Ej: edema y eritema) y producen quemaduras (Ganesan & Hanawalt, 2016; Moreno & Moreno, 2010). Por su parte, los rayos UVA se relacionan con el foto-envejecimiento y el estrés oxidativo (Reis- Mansur et al., 2019). Debido al aumento de la incidencia de radiación solar en la piel, surge una mayor demanda para su protección.

La fotoprotección es una estrategia preventiva para evitar la exposición a la radiación solar y sus efectos nocivos, siendo el uso de filtros solares tópicos la practica más común (Jansen et al., 2013). Sin embargo, estos productos deben cumplir ciertas especificaciones, en cuanto a su eficacia; una protección contra los espectros eritemogénicos de la luz UV (es decir, UVB y parte de UVA) medido por el factor de protección solar (*SPF*) aprobado por *Food and Drug Administration* (FDA), y una protección de amplio espectro o UVA $\lambda > 370$ nm, consenso de la *American Academy of Dermatology* (Moreno & Moreno, 2010; Jansen et al., 2013), evitando efectos agudos y crónicos sobre la piel. También es esencial la seguridad de los filtros solares. Hay controversias sobre el uso de la Oxibenzona y Octinoxato en protectores solares de uso común,

por ser nocivos a los ecosistemas de arrecife de coral (Raffa et al., 2019; DiNardo & Downs, 2018) y citotóxicos para el humano (Siller et al., 2018). Adicionalmente, se espera que estos filtros posean otras propiedades: antioxidantes, antígenotóxicas, antimicrobianas, organolépticas y otras, que demanda la industria cosmética (Osterwalder & Hareng, 2016). Esto explica, la creciente demanda de ingredientes naturales de origen vegetal para la formulación de protectores solares de uso tópico (Nunes et al., 2018; Yeager & Lim, 2019).

En tal sentido, los microorganismos son una fuente menos explorada de compuestos con potencial uso como filtros UV (Gao & García, 2011). Las propiedades protectoras se atribuyen a sus pigmentos, que son estructuralmente diversos, incluyendo: carotenoides, melanina, violaceína, prodigiosina, monascina, piocianina, actinorrodina y zeaxantina, entre otros (Narsing, Xiao & Li 2017). Otras propiedades son antimicrobianas y antioxidantes, prometedoras al producir un valor agregado a los protectores solares. Además, por su fácil manejo y cultivo controlado, la productividad de estos pigmentos bacterianos puede ser más rentable que en plantas.

El presente trabajo evaluó el potencial fotoprotector y antígenotóxico de extractos bacterianos obtenidos de seis cepas de los filos Actinomycetota (5) y Bacteroidota (1), proveniente a la biodiversidad microbiana de Santander (Colombia). De esta manera, se exploró diversidad microbiana colombiana, como una alternativa a los filtros orgánicos sintéticos, y se identificaron especies bacterianas promisorias como fuentes de compuestos útiles en fotoprotección.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar el potencial de especies microbianas nativas de Colombia para la producción de pigmentos con propiedades fotoprotectoras.

1.2 Objetivos Específicos

1. Establecer el espectro de absorción en el rango ultravioleta-visible de los extractos bacterianos.

2. Determinar la eficacia fotoprotectora de los extractos bacterianos mediante índices *in vitro* ($SPF_{in vitro}$, y λc).

3. Determinar el efecto antigenotóxico de los extractos bacterianos frente a la radiación UVB.

Competencias

1. Desarrolla habilidades necesarias para el cultivo de microorganismos, su curación y conservación; así como, para la producción y extracción de pigmentos microbianos.

2. Aplica ensayos espectrofotométricos, de detección genotóxica (SOS Chromotest), pruebas estadísticas, e índices de eficacia fotoprotectora, en el análisis del potencial fotoprotector de extractos microbianos frente a la radiación ultravioleta.

3. Prepara informe técnico del trabajo desarrollado, con sus respectivas normas, estructura y rigor científico de presentación.

3. Metodología

3.1 Material biológico

Se usaron seis cepas bacterianas de los filos Actinomycetota y Bacteroidota recolectadas en el departamento de Santander (Colombia) y dos cepas de referencia de la Colección Americana de Cultivos Tipos (Tabla 1). Estas cepas se encuentran crio-preservadas a -80°C en la colección “Cepario LMMA-UIS”, establecida en la Universidad Industrial de Santander. La base de datos de dicha colección, se puede consultar en la página del Sistema Colombiano de Información sobre Biodiversidad (<https://doi.org/10.15472/uq6pal>).

3.2 Producción de extractos bacterianos

Las cepas se sembraron en tres medios de cultivo (Luria-Bertani (LB), Amresco, Slon, Ohio); Medio Clostridial Reforzado (RCM) y Nutritivo (NU), Oxoid Ltd, Basingstoke, England), siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada cepa (0.5 mL de preservado), se sembró en los tres medios en forma líquida y se cultivaron overnight. Posteriormente, los cultivos frescos (300 μL) se sembraron por extensión en cajas Petri por triplicado durante 4 días a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ (temperatura ambiente). Se revisó la pureza de cada cepa con tinción Gram. La masa bacteriana producida en las cajas, fue recuperada usando copos de algodón y suspendida en 30 mL de metanol acidificado (1M HCl) en tubos cónicos. Las células fueron colectadas por centrifugación (7000 rpm, 18min, 4°C), pesadas (peso húmedo), y finalmente suspendidas en el mismo volumen y solvente. Las suspensiones celulares se sonicaron a 25°C durante 2h utilizando un baño de ultrasonidos E+ EP30 H (Elmasonic, Amazon, EE. UU), Se centrifugo nuevamente bajo las mismas condiciones, y el sobrenadante fue recuperado y preservado a 4°C .

Tabla 1

Lista de extractos bacterianos utilizados en el estudio. Se proporcionaron los códigos de las cepas correspondientes en la colección de cultivos y la base de datos de secuencias NCBI. Se mostró para cada extracto; la concentración, eficacia de protección UVB ($SPF_{in vitro}$) y longitud de onda crítica (λ_c)

N	Colección (Localidad)	Sec. código NCBI †	Taxón	Medio	$SPF_{in vitro}$	λ_c	[mg/mL] Ext. puro	%GI
1	UIS0016 (ATCC)	MH173790	<i>Actinomyces viscosus</i>	LB	10.30 ± 0.1	340 ± 0.0	0.685 ± 0.0	25 '' ± 11
2	UIS0016 (ATCC)	MH173790	<i>Actinomyces viscosus</i>	RCM	13.84 ± 0.0	320 ± 0.0	1.248 ± 0.0	23 '' ± 10
3	UIS0016 (ATCC)	MH173790	<i>Actinomyces viscosus</i>	NU	10.31 ± 0.3	340 ± 0.0	0.913 ± 0.0	16 ^{***} ± 3.6
4	UIS0353 (V)	MZ540233	<i>Brevibacterium sp</i>	LB	7.13 ± 0.0	330 ± 0.0	4.396 ± 0.0	0* ± 10
5	UIS0353 (V)	MZ540233	<i>Brevibacterium sp</i>	RCM	8.19 ± 0.1	310 ± 0.0	4.70 ± 0.0	3.2'' ± 58.4
6	UIS0353 (V)	MZ540233	<i>Brevibacterium sp</i>	NU	4.23 ± 0.0	310 ± 0.0	1.534 ± 0.0	11* ± 6.3
7	UIS0368 (ATCC)	NR_044871	<i>Kocuria rosea</i>	LB	19.20 ± 0.0	330 ± 0.0	4.780 ± 0.0	4.5* ± 8.1
8	UIS0368 (ATCC)	NR_044871	<i>Kocuria rosea</i>	RCM	23.69 ± 0.0	330 ± 0.0	8.871 ± 0.0	0** ± 12
9	UIS0368 (ATCC)	NR_044871	<i>Kocuria rosea</i>	NU	10.21 ± 0.0	330 ± 0.0	5.923 ± 0.0	0** ± 7.9
10	UIS1003 (PA)	MT081863	<i>Kocuria flava</i>	LB	14.45 ± 0.0	320 ± 0.0	7.023 ± 0.0	18'' ± 4.4
11	UIS1003 (PA)	MT081863	<i>Kocuria flava</i>	RCM	38.47 ± 0.2	360 ± 0.0	9.830 ± 0.0	31 '' ± 4.9
12	UIS1003 (PA)	MT081863	<i>Kocuria flava</i>	NU	14.86 ± 0.1	360 ± 0.0	2.080 ± 0.0	18'' ± 6.1
13	UIS1246 (BM)	MZ540236	<i>Microbacterium sp</i>	LB	5.41 ± 0.0	320 ± 0.0	5.409 ± 0.0	0'' ± 3.1
14	UIS1246 (BM)	MZ540236	<i>Microbacterium sp</i>	RCM	12.95 ± 0.1	340 ± 0.0	6.196 ± 0.0	13'' ± 2.5
15	UIS1246 (BM)	MZ540236	<i>Microbacterium sp</i>	NU	9.658 ± 0.1	330 ± 0.0	2.698 ± 0.0	15'' ± 2.4
16	UIS1255 (TO)	MK728961	<i>Chryseobacterium sp</i>	LB	20.43 ± 0.0	340 ± 0.0	2.728 ± 0.0	23 '' ± 11
17	UIS1255 (TO)	MK728961	<i>Chryseobacterium sp</i>	RCM	22.65 ± 0.0	340 ± 0.0	1.178 ± 0.0	30 '' ± 9.3
18	UIS1255 (TO)	MK728961	<i>Chryseobacterium sp</i>	NU	38.84 ± 0.0	360 ± 0.0	6.156 ± 0.0	30 '' ± 2.6

Nota. †: mejor coincidencia con las secuencias del gen 16S rRNA de especies tipo encontradas en la base de datos NCBI. Localidades: V – Vetas; PA – Paramo del Almorzadero; BM – Bucaramanga; TO – Tona. Cada cepa se evaluó en tres medios diferentes: RCM - medio clostridial reforzado; LB - Luria-Bertani; NU – Caldo Nutritivo, para un total de 18 extractos. Las desviaciones estándar se muestran para cada índice (n = 3). Valor de probabilidad P, respecto al control positivo: †: p < 0,01, ††: p < 0,05, †††: p > 0,05, ††††: p > 0,5, †††††: p > 0,9. En negrita aparecen las muestras con potencial utilidad para cada prueba. Se amplía la información en los apéndices B, C, y D.

3.3 Eficacia de fotoprotección *in vitro*

Se realizaron diluciones de los 18 extractos (1:0, 1:2, 1:3, 1:5, 1:10, 1:100) en agua destilada estéril y sus espectros de absorbancia se midieron por triplicado utilizando la función SkanIt 3.2 de un espectrofotómetro Multiskan GO (Thermo Scientific, MA). Una alícuota (1.5 mL) de cada extracto, se usó para determinar su espectro de absorbancia entre los 200 a 600 nm (paso cada 5nm) usando una cubeta de cuarzo (Hellma Analytics, Aschaffenburg, Alemania). Siempre se utilizó un blanco de lectura que contenía agua destilada estéril. Se hicieron tres lecturas que determina la incertidumbre del equipo.

Se estimó la eficacia fotoprotectora UVB mediante el factor de protección solar ($SPF_{in vitro}$), descrito por Sayre et al. (1979), y simplificado en método espectrofotométrico como sigue: (Mansur et al., 1986): $SPF_{in vitro} = CF * \sum_{290}^{320} EE(\lambda)I(\lambda)A(\lambda)$, donde $EE(\lambda)$ es el espectro del efecto eritematoso en la longitud de onda λ , $I(\lambda)$ espectro de intensidad solar en la longitud de onda λ , $A(\lambda)$ absorbancia del extracto determinado por la lectura del espectrofotómetro en la longitud de onda λ , $CF = 10$ factor de corrección. Los valores de la función producto $EE(\lambda)I(\lambda)$ están previamente normalizados en la tabla 2 (Sayre et al., 1979). La eficacia de protección de amplio espectro (Diffey, 1994); se determinó calculando la longitud de onda crítica (λ_c) como

sigue: $\lambda_c = \int_{290}^{\lambda_c} A(\lambda)d\lambda = 0,9 \int_{290}^{400} A(\lambda)d(\lambda)$, donde, $d(\lambda)$ es el paso de longitud de onda (5nm). Los valores de $SPF_{in vitro}$ se clasificaron de la siguiente manera según las directrices de la Asociación Europea de Cosmética y Perfumería (COLIPA, 2011): Sin protección ($0,0 \leq SPF_{in vitro} \leq 5,9$), baja protección ($6,0 \leq SPF_{in vitro} \leq 14,9$), media protección ($15,0 \leq SPF_{in vitro} \leq 29,9$), alta protección ($30,0 \leq SPF_{in vitro} \leq 59,9$) y muy alta protección ($SPF_{in vitro} \geq 60,0$). El SPF me indica la cantidad de exposición UV para formar eritema, con uso de filtro solar, en comparación cuando no. Por otro lado, un $\lambda_c > 370$ nm define una protección de amplio espectro según las directrices de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, 2011; Lionetti & Rigano, 2017). Es decir, que la muestra absorbe el 90% de el espectro UVA-B.

Tabla 2

función de producto normalizada utilizada en el cálculo de los datos del $SPF_{in vitro}$

Longitud de Onda	EE*I Normalizada
290	0.0150
295	0.0817
300	0.2874
305	0.3278
310	0.1864
315	0.0839
320	0.0180
Σ	1.0000

Nota. $EE(\lambda)$ es el espectro del efecto eritematoso en la longitud de onda λ , $I(\lambda)$ espectro de intensidad solar en la longitud de onda λ .

3.4 Evaluación genotóxica de los extractos

Se llevo a cabo el ensayo SOS Chromotest (Quillardet & Hofnung, 1985), utilizando la cepa *Escherichia coli* PQ-37 (F⁻; *thr*; *leu*; *his-4*; *pyrD*; *thi*; *galE*; *galK* o *galT*, *lacΔU169*; *srI300::Tn10*; *rpoB*; *rpsL*; *rfa*; *trp::Mu c+*; *sfIA::Mud(Ap, lac)cts*), disponible en la colección del Cepario LMMA-UIS. El ensayo mide enzimáticamente la inducción de la respuesta SOS producto

del daño genético producido en el ADN celular. A tales fines, se realizaron cultivos overnight de la cepa PQ-37 en el medio LB suplementado con ampicilina (50 μ g/ml) y tetraciclina (17 μ g/ml), con agitación (300rpm) a 37°C, usando un Thermomixer (Eppendorf, Sao Paulo, Brasil). Posteriormente, el cultivo se diluyó en medio fresco y se cultivó bajo las condiciones anteriormente descritas hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0,4 a 600nm. El cultivo en fase exponencial de crecimiento, se diluyó 1:10 en medio LB y la suspensión celular se distribuyó a razón de 150 μ L en tubos Eppendorf que contenían 5 μ L de diluciones del extracto a ensayar. Se realizaron un mínimo de tres experimentos independientes con cuatro replicas internas cada uno. Siempre se incluyeron controles negativos (agua destilada) y positivos (2.34 μ M de 4-nitro-quinolina-1-óxido (4-NQO) en cada experimento. Las suspensiones se incubaron durante 30 min a 4°C para la incorporación del extracto a la célula, y posteriormente, 2h a 37°C y 300 rpm para la inducción de la respuesta SOS.

Se analizaron las actividades enzimáticas β -galactosidasa (β G) y fosfatasa alcalina (FA) en placas de 96 pozos (Brand GMBH, Alemania), cada una con un mínimo de cuatro experimentos independientes. Para determinar la actividad β G se mezclaron 135 μ L de buffer Z (60mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄, 10mM KCl, 1mM Mg₂SO₄, 0,1% SDS, 40mM β -mercaptoetanol, pH 7,0) con 15 μ L de la suspensión celular, se incubó durante 20 min a temperatura ambiente para producir la ruptura de las membranas celulares. La reacción enzimática se inició añadiendo 30 μ L del sustrato ONPG (4 mg/mL en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,0). Después de 40 min de incubación, se detuvo la reacción enzimática añadiendo 100 μ L de Na₂CO₃(1M). Para determinar la actividad FA, se rompieron las membranas celulares mezclando 135 μ L de buffer T (dodecilsulfato de sodio al 0,1%, Tris HCl 1 M, pH 8,8) con los 15 μ L de las suspensiones celulares. La reacción enzimática se inició añadiendo 30 μ L del sustrato PNPP (4 mg/mL en el buffer T). Después de 40 min de

incubación, se detuvo la reacción añadiendo 50 μ L de HCl (2,5 M). Después de 5 minutos, se añadieron 50 μ L de Tris (2M) para restaurar el color. La absorbancia en los ensayos de β G y FA se midió a $\lambda = 420\text{nm}$, utilizando un lector de microplacas Multiskan GO (Thermo Scientific, MA).

Las actividades β G y FA se calcularon usando la relación: *Unidades enzimáticas* (UE) = $1000 * A_{420}/t$, donde A_{420} es la absorbancia del pozo a $\lambda = 420\text{nm}$, t = tiempo de incubación en presencia del sustrato en minutos. La relación de unidades β G y FA, como: $R = (UE - BG) / (UE - PA)$, refleja la inducción del gen *SfiA* incluso cuando se produce inhibición de proteínas (citotoxicidad por parte de los extractos). El criterio de genotoxicidad usado fue el factor de inducción SOS (I); $I = R_t/R_{tn}$, representa la inducción *SfiA* normalizado como medida indirecta del daño genético. donde t y tn son células tratadas y no tratadas, respectivamente. Las muestras se clasificaron como no genotóxicas si $I \leq 1,5$, no concluyente si $1,5 < I \leq 2,0$, y genotóxico si $I > 2,0$ (Cediel, Suescun & Fuentes, 2022).

3.5 Evaluación antigenotóxica de los extractos

La antigenotoxicidad (la capacidad del extracto para proteger contra la genotoxicidad inducida por los rayos UVB) se midió como una reducción significativa en el factor de inducción SOS en presencia del extracto bacteriano (Fuentes et al., 2006). Calculada como: $\%GI = 1 - (I_{ct} - I_{nt} / I_{UVB} - I_{nt}) * 100$ donde, I_{ct} es el factor de inducción SOS en el procedimiento de co-incubación, es decir, la cepa PQ-37 incubada con cada uno de los extractos bacterianos, I_{nt} es el factor de inducción SOS del control negativo, I_{UVB} es el factor de inducción de SOS en las células tratadas con UVB (control positivo). Los valores negativos de $\%GI$ se consideran como cero, por lo tanto, este parámetro variará de entre 0% a 100%. La concentración mínima que produce una inhibición de genotoxicidad se consideró significativa para una $p < 0.05$.

La cepa PQ-37 en fase exponencial de crecimiento se diluyó (1:10) en LB 2X y se incubó en presencia de los extractos a 4°C por 30 min. Posteriormente, estas se distribuyeron en placas Petri de 5cm de diámetro dejando 1mm de espesor. Las placas de Petri con las suspensiones se irradiaron con UVB en la oscuridad utilizando una cámara de irradiación UVA/UVB BS-02 equipada con un controlador de radiación que calcula la dosis inducida. UV-MAT (Opsytec Dr. Groebel, Ettlingen, Baden-Württemberg, Alemania). La dosis utilizada fue de 10J/m², la cual induce significativamente la respuesta SOS en *E. coli* sin afectar su supervivencia (Prada et al., 2016). Luego se incubaron las suspensiones irradiadas por 2h a 37°C con 300 rpm. Cada ensayo siempre incluyó controles negativos (agua destilada), positivos (10 J/m² UVB) y con solo el extracto. Se realizaron un mínimo de tres experimentos independientes con cuatro replicas internas cada uno. La fase de los ensayos enzimáticos se realizó igual que la parte anterior.

3.6 Análisis estadístico

Se calcularon los valores medios de peso húmedo del cultivo, absorbancia, $SPF_{in\ vitro}$, λ_c , I , y $\%GI$, y sus correspondientes errores estándar. En los casos de genotoxicidad y antígenotoxicidad, los datos se evaluaron para su normalidad y homogeneidad de varianza usando las pruebas de Shapiro Wilk y F-máxima respectivamente. Cuando se obtiene un valor significativo de F en el análisis de varianza unidireccional (ANOVA), los tratamientos (grupos) se compararon con la prueba de Tukey. Para todos los análisis estadísticos, un valor de $p < 0,05$ indica significancia. Se utilizó el software estadístico R v. 2023. 6. 0. 421 (Posit Software, 2023). (<http://www.R-project.org>).

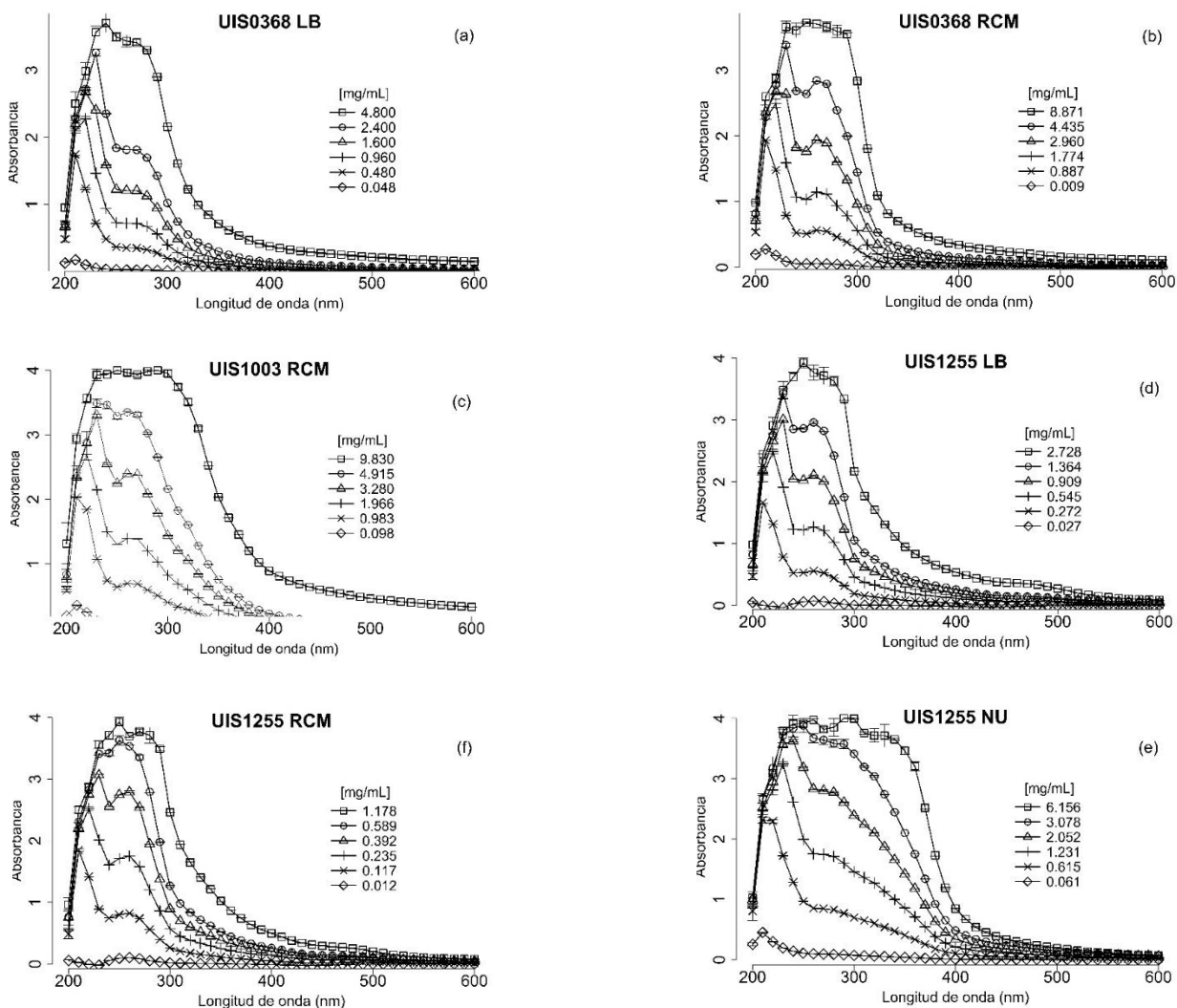
4. Resultados

4.1 Eficacia fotoprotectora

Los espectros de absorbancia UV-VIS de los extractos bacterianos más prominentes se muestran en la Figura 1. En todos los casos, se observaron altos niveles de absorbancia a lo largo del espectro UVC – UVB dependiendo de la concentración de los extractos, con picos de absorbancia en las λ siguientes: 215, 230, 250, 290 nm. Los picos de absorbancia a 290 nm, corresponde a los extractos de las cepas *Chryseobacterium* sp. y *K. flava* que poseen los índices de fotoprotección UVB más altos dentro de los evaluados (ver abajo).

Figura 1

Espectro de absorbancia UV de los extractos bacterianos mas prominentes

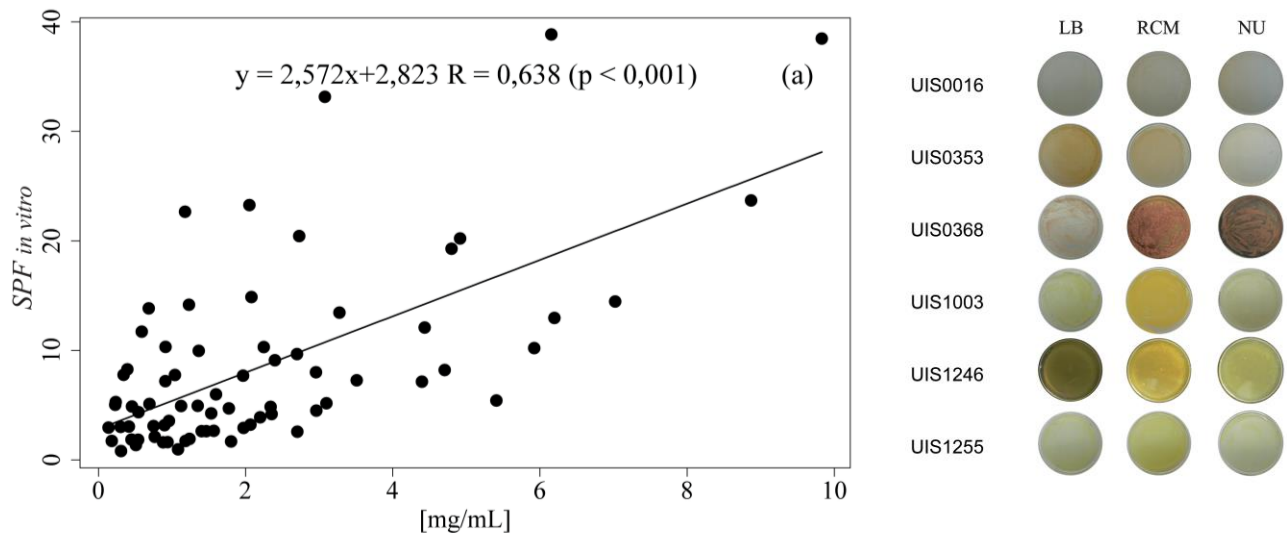


Nota: Se hicieron un mínimo de tres ensayos independientes. Las barras de error para cada medida se muestran en la gráfica. a) y b) *Kocuria rosea*, c) *K. flava*, d), e) y f) *Chryseobacterium sp.*

Los valores espectrofotométricos del $SPF_{in vitro}$ calculados para cada extracto bacteriano se presentan en la Tabla 1. De acuerdo con las categorías definidas en la “Metodología”, la eficacia de fotoprotección UVB fue la siguiente: dos extractos (*Kocuria flava*, *Chryseobacterium sp.*) con fotoprotección alta, cuatro extractos (*Kocuria rosea*, *Chryseobacterium sp.*) con fotoprotección media, diez con fotoprotección baja, y dos sin fotoprotección. Ningún extracto mostró una eficacia protectora de amplio espectro ($\lambda_c \geq 370$ nm). La eficacia protectora UVB de los extractos claramente dependió de la masa inicial recuperada en cada cultivo, como se demuestra en la correlación entre peso húmedo del cultivo y los valores correspondiente de $SPF_{in vitro}$ (Figura 2. $R = 0,638$, $p < 0,001$).

Figura 2

Correlación entre la eficacia de la fotoprotección ($SPF_{in vitro}$) y la concentración de los extractos bacterianos evaluados



Nota. a) Ajuste de regresión lineal con su respectivo valor de correlación ($R = 0,638$, $p < 0,001$). Al lado derecho, imágenes de cultivo en cajas Patri Agar de las cepas evaluadas en los diferentes medios (LB, RCM y NU).

En general, la actividad de los extractos bacterianos fue superior cuando las cepas fueron cultivadas en el medio RCM con la excepción de las cepas de *Chryseobacterium*; donde el extracto obtenido del medio Agar Nutritivo mostró valores mayores de actividad ($SPF_{in vitro} = 38,8$).

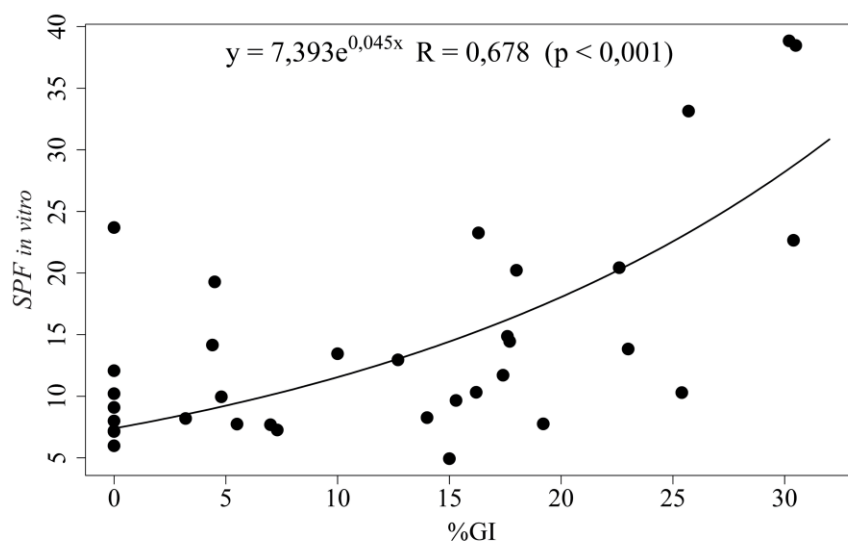
4.3 Antigenotoxicidad de los extractos bacterianos

Antes de las pruebas de antigenotoxicidad, se determinó que ninguno de los extractos aumento significativamente los valores de I ($I \leq 1$) respecto a los controles negativos, en las concentraciones analizadas en este estudio ($p > 0,05$). Por lo tanto, estos extractos se consideraron no genotóxicos en el modelo SOS Chromotest con células *E. coli* PQ-37. (Véase Apéndice E).

El %GI muestra una reducción significativa del Factor de inducción SOS en las células de los co-tratamientos con los extractos y radiación UVB (Tabla 1). Solo tres extractos (*Kocuria flava*, *Chryseobacterium* sp.), mostraron valores relevantes ($\%GI \geq 30\%$), es decir, una diferencia significativa del daño inducido respecto al control positivo ($p < 0,05$). Los valores de $SPF_{in vitro}$ y %GI obtenidos para los extractos bacterianos estudiados mostraron una alta correlación ($R = 0.678$, $p < 0.001$). La dependencia entre ambas magnitudes mostró un ajuste exponencial. Esto es, cuanto mayor es la eficacia fotoprotectora UVB menor es el daño genético (Figura 3).

Figura 3

Correlación entre la eficacia de la fotoprotección ($SPF_{in vitro}$) y los %GI de los extractos bacterianos evaluados.



Nota. Para el %GI se usaron los datos apareados de extractos con valores mayores o igual a una fotoprotección baja ($SPF_{in vitro} \geq 6$).

5. Discusión

El presente estudio evidenció propiedades fotoprotectoras y antigenotóxicas contra los rayos UVB de extractos metanólicos de cepas bacterianas de los filos Actinomycetota (*Kocuria flava*) y Bacteroidota (*Chryseobacterium* sp.) nativas de Santander (Colombia); las cuales podrían ser útiles para la preparación de protectores solares.

Los grupos bacterianos del filo Actinomycetota (Ej: *Cutibacterium*, *Gordonia*, *Micrococcus*, *Streptomyces*), son altamente reconocidas por las aplicaciones biotecnológicas de sus metabolitos secundarios, como antioxidantes, antiinflamatorias, y absorción de rayos UV (Sánchez et al., 2020, 2021). Tales propiedades, son atribuidas principalmente a sus pigmentos polifuncionales que les permiten colonizar ambientes extremos (Carvalho et al., 2018; Chase, Weihe, & Martiny, 2021; Canganella & Wiegel, 2011). Por ejemplo, especies del género *Microbacterium* producen pigmentos del tipo micosporina (precursor del B-caroteno), el cual muestra propiedades fotoprotectoras (Ojha, Kapoor, & Mishra, 2018). Un segundo estudio (Reis-Mansur et al., 2019), mostró que los pigmentos carotenoides del género *Microbacterium* son responsable de su radioresistencia frente a la radiación UV; pero en nuestro estudio fue baja la fotoprotección encontrada para el extracto de este grupo microbiano. Mendes-Silva et al. (2021) mostraron que la especie *Kocuria palustris* contiene un pigmento amarillo (sarcinaxantina) con propiedades fotoprotectoras ($SPF_{in vitro} = 9.36$). Los resultados observados en nuestro trabajo con las especies *Kocuria flava* ($SPF_{in vitro} = 14.45-38.47$) *Kocuria rosea* ($SPF_{in vitro} = 10.21-23.69$), soportan el potencial de este género bacteriano para la producción de pigmentos fotoprotectores. Por su parte, las especies del filo Bacteroidota (Ej: *Chryseobacterium artocarpi*) presentan pigmentos como la flexirrubina que poseen propiedades antioxidantes (Mogadem et al., 2021).

Nosotros mostramos que las especies de este género contienen pigmentos con propiedades fotoprotectoras ($SPF_{in vitro} = 38.84$) y antígenotóxicas ($\%GI = 30.2$). Como en previos estudios desarrollados en nuestro laboratorio (Cediel, Suescun & Fuentes, 2022; Pedraza & Fuentes, 2023), ambas actividades estuvieron relacionadas en los extractos estudiados (Figura 3, $R = 0.678$, $p < 0.001$); y además mostraron, una clara dependencia de la concentración o masa celular (Figura 2, $R = 0.678$, $p < 0.001$).

Resulta interesante que los extractos de nuestro estudio, incluso los más pigmentados (cepas UIS0016, UIS0353, UIS1246), absorben en las zonas espectrales UVC-UVB (ver Figura 1); en las cuales absorben muchos compuestos flavonoides. Esto contrastó, con lo observado en estudios previos que mostraron extractos bacterianos cuyos picos de absorción más grandes se encuentra en la zona visible (Mendes-Silva et al., 2021; Sánchez et al., 2021). Una posible explicación, podría ser el uso de diferentes medios de cultivo en los estudios como se ha indicado previamente (Wagener et al., 2012; Ojha, Kapoor, & Mishra, 2018; Cediel, Suescun & Fuentes, 2022). En nuestro caso, el medio RCM permitió un crecimiento vigoroso en la mayoría de las cepas estudiadas (Tabla 1). Otro factor para considerar, son las condiciones de luminosidad durante el cultivo (Trutko et al., 2005; Mendes-Silva et al., 2021); lo cual no se tuvo en cuenta durante nuestro estudio. Lo anteriormente descrito, nos indica la importancia de caracterizar químicamente los extractos estudiados en aras de identificar los compuestos responsables de la bioactividad detectada, como ha sido sugerido por otros autores (Reis- Mansur et al., 2019; Sánchez et al., 2021).

6. Conclusiones

El trabajo demostró que los extractos de las especies *Kocuria flava* y *Chryseobacterium* sp., y en menor medida de *Kocuria rosa*, mostraron alta eficacia de fotoprotección y antigenotoxicidad frente a la radiación UVB, pero no exhibieron fotoprotección de amplio espectro. Ambas actividades están claramente correlacionadas, y dependen de la concentración o masa celular de partida para la obtención de los extractos bacterianos. Las especies bacterianas mencionadas arriba, resultan promisorias como fuentes de compuestos útiles en fotoprotección.

7. Recomendaciones

Será necesario caracterizar químicamente los extractos estudiados en aras de identificar los compuestos responsables de la fotoprotección. Adicionalmente, se requiere probar la irritabilidad, toxicidad, y genotoxicidad, de los extractos en células de piel humana. Dado que nuestros resultados se basan en ensayos de bioprospección *in vitro*, se requieren estudios *in vivo* para validar estos hallazgos.

Bibliografía

Barnes, P. W., Williamson, C. E., Lucas, R. M., Robinson, S. A., Madronich, S., Paul, N. D., & Zepp, R. G. (2019). Ozone depletion, ultraviolet radiation, climate change and prospects for a sustainable future. *Nature Sustainability*, 2(7), 569-579.

Chase, A. B., Weihe, C., & Martiny, J. B. (2021). Adaptive differentiation and rapid evolution of a soil bacterium along a climate gradient. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(18), e2101254118.

Canganella, F., & Wiegel, J. (2011). Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. *Naturwissenschaften*, 98, 253-279.

Carvalho, E. L., Maciel, L. F., Macedo, P. E., Dezordi, F. Z., Abreu, M. E., Victoria, F. D. C., & Pinto, P. M. (2018). De novo assembly and annotation of the Antarctic alga *Prasiola crispa* transcriptome. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 4, 89.

Cediel-Becerra, J. D., Suescun Sepulveda, J. A., & Fuentes, J. L. (2022). Prodigiosin production and photoprotective/antigenotoxic properties in *Serratia marcescens* indigenous strains from eastern cordillera of Colombia. *Photochemistry and Photobiology*, 98(1), 254-261.

Diffey, B. (1994). A method for broad spectrum classification of sunscreens. *International Journal of Cosmetic Science*, 16(2), 47-52.

DiNardo, J. C., & Downs, C. A. (2018). Dermatological and environmental toxicological impact of the sunscreen ingredient oxybenzone/benzophenone-3. *Journal of cosmetic dermatology*, 17(1), 15-19.

European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association (COLIPA). Method for *in vitro* determination of UVA protection. *In vitro* method for the determination of the UVA protection factor and “critical wavelength” values of sunscreen products. Guidelines March. 2011.

Food and Drug Administration (FDA). (2011) Department of health and human services. Labeling and effectiveness testing; sunscreen drug products for over-the-counter human use. Final Rule Fed Regist. 2011; 76:35620–65.

Fuentes, J. L., Vernhe, M., Cuetara, E. B., Sánchez-Lamar, A., Santana, J. L., & Llagostera, M. (2006). Tannins from barks of *Pinus caribaea* protect *Escherichia coli* cells against DNA damage induced by γ -rays. *Fitoterapia*, 77(2), 116-120.

Gao, Q., & Garcia-Pichel, F. (2011). Microbial ultraviolet sunscreens. *Nature Reviews Microbiology*, 9(11), 791-802.

Ganesan, A. and P. Hanawalt (2015) Photobiological origins of the field of genomic maintenance. *Photochem. Photobiol.* 92, 52–60.

Islami, F., Sauer, A. G., Miller, K. D., Fedewa, S. A., Minihan, A. K., Geller, A. C., ... & Jemal, A. (2020). Cutaneous melanomas attributable to ultraviolet radiation exposure by state. *International journal of cancer*, 147(5), 1385-1390.

Jansen, R., Osterwalder, U., Wang, S. Q., Burnett, M., & Lim, H. W. (2013). Photoprotection: part II. Sunscreen: development, efficacy, and controversies. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 69(6), 867.e1–882.

Lionetti, N., & Rigano, L. (2017). The new sunscreens among formulation strategy, stability issues, changing norms, safety and efficacy evaluations. *Cosmetics*, 4(2), 15.

Mendes-Silva, T. D. C. D., Vidal, E. E., de Souza, R. D. F. R., da Cunha Schmidt, K., Mendes, P. V. D., da Silva Andrade, R. F., ... & da Silva, M. V. (2021). Production of carotenoid

sarcinaxanthin by *Kocuria palustris* isolated from Northeastern Brazil Caatinga soil and their antioxidant and photoprotective activities. *Electronic Journal of Biotechnology*, 53, 44-53.

Mogadem, A., Almamary, M. A., Mahat, N. A., Jemon, K., Ahmad, W. A., & Ali, I. (2021). Antioxidant activity evaluation of flexirubin type pigment from *Chryseobacterium artocarp* CECT 8497 and related docking study. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(4), 979.

Moreno, M. I., & Moreno, L. H. (2010). Fotoprotección. *Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica*, 18(1), 31-39.

Mansur, J.S., M. N. R. Breder, M. C. A. Mansur and R. D. Azulay (1986) Determination of the Sun Protection Factor by spectrophotometry. *An. Bras. Dermatol. Rio. De. Janeiro*. 61, 121-124.

Narsing Rao, M. P., Xiao, M., & Li, W. J. (2017). Fungal and bacterial pigments: secondary metabolites with wide applications. *Frontiers in microbiology*, 8, 250699.

Nunes, A. R., Rodrigues, A. L. M., de Queiróz, D. B., Vieira, I. G. P., Neto, J. F. C., Junior, J. T. C., ... & Coutinho, H. D. M. (2018). Photoprotective potential of medicinal plants from Cerrado biome (Brazil) in relation to phenolic content and antioxidant activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 189, 119-123.

Ojha, S., Kapoor, S., & Mishra, S. (2018). Carotenoid production by a novel isolate of *Microbacterium paraoxydans*. *Indian journal of microbiology*, 58, 118-122. 2018).

Osterwalder, U., & Hareng, L. (2016). Global UV filters: current technologies and future innovations. *Principles and practice of photoprotection*, 179-197.

Pedraza Barrera, C. A., & Fuentes, J. L. (2023). Photoprotective and antigenotoxic properties of *Cutibacterium acnes* ecotypes native to terrestrial subsurface habitats. *FEMS Microbiology Letters*, 370, fnad108.

Prada Medina, C. A., Aristizabal Tessmer, E. T., Quintero Ruiz, N., Serment-Guerrero, J., & Fuentes, J. L. (2016). Survival and SOS response induction in ultraviolet B irradiated *Escherichia coli* cells with defective repair mechanisms. *International journal of radiation biology*, 92(6), 321-328.

Quillardet, P., & Hofnung, M. (1985). The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 147(3), 65-78.

R Core Team (2023). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Raffa, R. B., Pergolizzi Jr, J. V., Taylor Jr, R., Kitzen, J. M., & NEMA Research Group. (2019). Sunscreen bans: Coral reefs and skin cancer. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 44(1), 134-139.

Sánchez-Suárez, J., Coy-Barrera, E., Villamil, L., & Díaz, L. (2020). *Streptomyces*-derived metabolites with potential photoprotective properties—A systematic literature review and meta-analysis on the reported chemodiversity. *Molecules*, 25(14), 3221.

Sánchez-Suárez, J., Villamil, L., Coy-Barrera, E., & Díaz, L. (2021). Clona varians-derived *Actinomycetes* as bioresources of photoprotection-related bioactive end-products. *Marine drugs*, 19(12), 674.

Sayre, R. M., Agin, P. P., LeVee, G. J., & Marlowe, E. (1979). A comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of suncreening formulas. *Photochemistry and Photobiology*, 29(3), 559-566.

Reis-Mansur, M. C. P., Cardoso-Rurr, J. S., Silva, J. V. M. A., de Souza, G. R., Cardoso, V. D. S., Mansoldo, F. R. P., ... & Vermelho, A. B. (2019). Carotenoids from UV-resistant Antarctic *Microbacterium* sp. LEMMJ01. *Scientific reports*, 9(1), 9554.

Schuch, A. P., Moreno, N. C., Schuch, N. J., Menck, C. F. M., & Garcia, C. C. M. (2017). Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions. *Free Radical Biology and Medicine*, 107, 110-124.

Siller, A., Blaszkak, S. C., Lazar, M., & Harken, E. O. (2018). Update about the effects of the sunscreen ingredients oxybenzone and octinoxate on humans and the environment. *Plastic and Aesthetic Nursing*, 38(4), 158-161.

Trutko, S. M., Dorofeeva, L. V., Evtushenko, L. I., Ostrovskii, D. N., Hintz, M., Wiesner, J., ... & Akimenko, V. K. (2005). Isoprenoid pigments in representatives of the family *Microbacteriaceae*. *Microbiology*, 74, 284-289.

Wagener, S., Völker, T., De Spirt, S., Ernst, H., & Stahl, W. (2012). 3,3'-Dihydroxyisorenieratene and isorenieratene prevent UV-induced DNA damage in human skin fibroblasts. *Free radical biology & medicine*, 53(3), 457–463.

Yeager, D. G., & Lim, H. W. (2019). What's new in photoprotection: a review of new concepts and controversies. *Dermatologic clinics*, 37(2), 149-157.

Apéndices

Apéndice A

Descripción del genotipo de la cepa *E. coli* PQ-37 (Quillardet et al., 1985)

Genotipo	Descripción
<i>F⁻</i>	Sin factor <i>F</i> para la conjugación
<i>thr</i>	auxotrófica para treonina
<i>Leu</i>	auxotrófica para leucina
<i>his-4</i>	Auxotrófica para histidina
<i>pyrD</i>	Afecta el metabolismo de las pirimidinas
<i>Thi</i>	Auxotrófica para tiamida
<i>galE, galK, galT</i>	involucrados en el metabolismo de la galactosidasa
<i>lacΔU169</i>	delección en el operón <i>lac</i>
<i>srI300::Tn10</i>	Inserción confiriendo resistencia a la tetraciclina
<i>rpoB, rpsL</i>	afectan respectivamente a la RNA polimerasa y a la proteína ribosomal S12, lo que puede conferir resistencia a antibióticos o afectar la traducción.
<i>rfa</i>	Afecta la permeabilidad de la membrana
<i>trp::Mu c+</i>	Inserción de fago <i>Mu</i> en locus del triptófano con capacidad de causar mutaciones
<i>sfiA::Mud(Ap, lac)cts</i>	transposón <i>Mud(Ap, lac)</i> , que confiere resistencia a ampicilina y contiene el gen <i>lac</i> , se ha insertado en el gen <i>sfiA</i> . Quedando los genes estructurales de la B-galactosidasa bajo el control del promotor del gen <i>sfiA</i> .

Apéndice B

Índice espectrofotométrico de fotoprotección UVB (SPF_{in vitro}) para cada uno de los extractos y sus diluciones evaluadas

Cepa	Medio	SPF _{in vitro} de los Extractos y sus Diluciones											
		1	DE EE	1:2	DE EE	1:3	DE EE	1:5	DE EE	1:10	DE EE	1:100	DE EE
UIS0016	LB	10.295	0.116 0.132	4.914	0.009 0.010	3.088	0.017 0.019	1.843	0.003 0.003	0.881	0.008 0.009	0.07	0.004 0.004
	RCM	13.835	0.002 0.003	7.755	0.000 0.055	5.024	0.048 0.140	2.945	0.007 0.008	1.352	0.033 0.037	-	0.001 0.01
	NU	10.315	0.320 0.362	4.871	0.116 0.131	3.003	0.038 0.042	1.728	0.037 0.042	0.843	0.007 0.008	-0.01	0.013 0.014
UIS0353	LB	7.137	0.046 0.052	3.887	0.022 0.025	2.616	0.035 0.040	1.594	0.025 0.025	0.745	0.021 0.024	0.09	0.006 0.007
	RCM	8.191	0.075 0.085	4.186	0.031 0.035	2.645	0.017 0.020	1.613	0.025 0.029	-	0.011 0.012	0.025	0.004 0.004
	NU	4.234	0.011 0.012	2.095	0.013 0.014	1.342	0.011 0.012	0.796	0.020 0.022	0.323	0.008 0.009	0.003	0.012 0.014
UIS0368	LB	19.279	0.082 0.093	9.093	0.005 0.005	5.978	0.003 0.004	3.549	0.014 0.016	1.812	0.007 0.008	0.109	0.002 0.002
	RCM	23.688	0.079 0.090	12.070	0.040 0.045	7.990	0.007 0.008	4.693	0.006 0.006	2.298	0.010 0.012	0.212	0.004 0.005
	NU	10.208	0.044 0.048	4.498	0.008 0.009	2.910	0.002 0.002	1.726	0.005 0.006	0.798	0.006 0.007	0.004	0.003 0.003
UIS1003	LB	14.451	0.046 0.052	7.256	0.004 0.004	4.840	0.016 0.018	2.615	0.006 0.007	1.404	0.006 0.007	0.075	0.013 0.015
	RCM	38.466	0.238 0.269	20.218	0.021 0.024	13.445	0.036 0.041	7.690	0.019 0.021	3.753	0.013 0.015	0.368	0.011 0.013
	NU	14.858	0.109 0.124	7.738	0.126 0.143	5.094	0.042 0.048	3.040	0.014 0.016	1.495	0.004 0.004	0.074	0.047 0.053
UIS1246	LB	5.413	0.031 0.035	2.564	0.022 0.025	1.673	0.045 0.051	0.960	0.008 0.009	0.366	0.009 0.010	-0.13	0.008 0.009
	RCM	12.950	0.114 0.129	5.166	0.012 0.014	3.207	0.016 0.019	1.907	0.004 0.004	0.890	0.006 0.007	-0.09	0.003 0.003
	NU	9.658	0.130 0.147	4.932	0.009 0.010	3.167	0.016 0.018	1.836	0.001 0.001	0.850	0.001 0.001	0.062	0.000 0.000
UIS1255	LB	20.428	0.025 0.028	9.954	0.014 0.016	7.183	0.023 0.027	4.350	0.009 0.010	1.844	0.015 0.017	0.084	0.006 0.007
	RCM	22.652	0.048 0.055	11.702	0.072 0.081	8.262	0.005 0.006	5.268	0.008 0.009	2.443	0.006 0.006	0.178	0.018 0.020
	NU	38.838	0.036 0.041	33.142	0.200 0.226	23.257	0.014 0.016	14.156	0.014 0.016	6.785	0.002 0.002	0.713	0.012 0.014

Nota. Las diluciones van desde 1 (extracto puro, sin diluir) y a razón de 1:2, 1:3, 1:5, 1:10 y 1:100

con agua destilada. DE: desviación estándar y EE: error estándar de al menos tres lecturas que determinan la incertidumbre del equipo.

Apéndice C

Índice de Fotoprotección Lambda Critico de amplio espectro (λ_c) para las cepas evaluadas y sus estadísticos

Cepa	Medio	λ_c de los Extractos y sus Diluciones											
		1:1	DE EE	1:2	DE EE	1:3	DE EE	1:5	DE EE	1:10	DE EE	1:100	DE EE
UIS0016	LB	340	0.000 0.000	320	0.000 0.000	310	0.000 0.000	300	0.000 0.000	290	0.000 0.000	270	0.000 0.000
	RCM	320	0.000 0.000	310	0.000 0.000	310	0.000 0.000	297	5.774 6.533	280	0.000 0.000	220	0.000 0.000
	NU	340	0.000 0.000	320	0.000 0.000	310	0.000 0.000	303	5.774 6.533	293	5.774 6.533	213	5.774 6.533
UIS0353	LB	330	0.000 0.000	320	0.000 0.000	310	0.000 0.000	310	0.000 0.000	297	5.774 6.533	260	0.000 0.000
	RCM	310	0.000 0.000	300	0.000 0.000	290	0.000 0.000	290	0.000 0.000	220	0.000 0.000	250	0.000 0.000
	NU	310	0.000 0.000	300	0.000 0.000	300	0.000 0.000	290	0.000 0.000	280	0.000 0.000	253	5.774 6.533
UIS0368	LB	330	0.000 0.000	320	0.000 0.000	310	0.000 0.000	310	0.000 0.000	300	0.000 0.000	280	0.000 0.000
	RCM	330	0.000 0.000	310	0.000 0.000	310	0.000 0.000	300	0.000 0.000	300	0.000 0.000	280	0.000 0.000
	NU	330	0.000 0.000	310	0.000 0.000	300	0.000 0.000	300	0.000 0.000	290	0.000 0.000	250	0.000 0.000
UIS1003	LB	320	0.000 0.000	300	0.000 0.000	300	0.000 0.000	290	0.000 0.000	290	0.000 0.000	273	5.774 6.533
	RCM	360	0.000 0.000	330	0.000 0.00	330	0.000 0.000	320	0.000 0.000	320	0.000 0.000	293	5.774 6.464
	NU	360	0.000 0.000	360	0.000 0.000	350	0.000 0.000	350	0.000 0.000	350	0.000 0.000	290	10.918 26.458
UIS1246	LB	320	0.000 0.000	300	0.000 0.000	297	5.774 6.533	290	0.000 0.000	280	0.000 0.000	290	5.774 6.533
	RCM	340	0.000 0.000	300	0.000 0.000	290	0.000 0.000	290	0.000 0.000	280	0.000 0.000	220	0.000 0.000
	NU	330	0.000 0.000	320	0.000 0.000	310	0.000 0.000	310	0.000 0.000	300	0.000 0.000	260	0.000 0.000
UIS1255	LB	340	0.000 0.000	330	0.000 0.000	330	0.000 0.000	320	0.000 0.000	310	0.000 0.000	280	0.000 0.000
	RCM	340	0.000 0.000	330	0.000 0.000	320	0.000 0.000	320	0.000 0.000	310	0.000 0.000	293	5.774 6.533
	NU	360	0.000 0.000	350	0.000 0.000	350	0.000 0.000	340	0.000 0.000	340	0.000 0.000	330	0.000 0.000

Nota. Las diluciones van desde 1 (extracto puro, sin diluir) y a razón de 1:2, 1:3, 1:5, 1:10 y 1:100

con agua destilada. DE: desviación estándar y EE: error estándar de al menos tres lecturas que determinan la incertidumbre del equipo.

Apéndice D

Indice de Antigenotoxicidad (%GI) de las cepas evaluadas y sus estadísticos

Cepa	Medio	%GI de las cepas evaluadas en diluciones seriadas																	
		1	DE	2	DE	3	DE	4	DE	5	DE	6	DE	7	DE	8	DE	9	DE
		EE	EE	EE	EE	EE	EE	EE	EE	EE	EE	EE	EE	EE	EE	EE	EE	EE	
UIS0016	LB	25.4	10.7	20.4	3.3	21.1	2.2	10.3	7.4	7.4	3.5	9.0	2.0	-13	10.6	-1.5	2.3	14.7	14.4
		''	5.6	*	1.6	*	1.1	***	3.6	**	1.7	**	1.1	*	5.8	*	1.1	*	8.1
	RCM	23.0	8.6	19.2	11.8	19.9	9.3	13.5	11.0	10.3	6.1	11.3	7.1	-6.1	9.3	2.7	5.4	15.5	13.5
		''	4.5	''	5.8	'	4.9	*	5.4	*	3.0	*	4.0	''	5.0	''	2.7	*	7.6
	NU	16.2	3.6	4.2	18.5	-10	13.7	-1.4	3.6	5.4	14.5	-7.0	2.5	-14.2	1.2	-11.7	10.5	-2.7	2.3
		**	1.9	***	9.1	***	7.2	***	1.7	**	7.1	**	1.4	**	0.7	**	5.1	**	1.3
UIS0353	LB	-29	10.1	-33	13.4	-13	11.3	1.5	17.0	-30	7.2	-49	8.3	-31	12.0	-26	22.9	-17	15.2
		*	5.3	''	6.6	'	5.9	*	8.3	''	3.5	**	4.7	*	6.5	*	11.2	**	8.6
	RCM	3.2	58.4	9.8	55.8	1.6	51.8	8.2	51.7	1.7	81.3	-0.5	70.5	-13	65.3	-24	52.1	-23	32.7
		''	30.6	''	27.3	'	27.2	'	25.3	'	39.9	'	39.9	'	35.5	'	25.5	'	18.5
	NU	10.6	6.3	-13	15.1	1.7	16.3	-8.1	32.4	-8.0	19.8	1.7	1.2	-11	4.2	-9.4	28.6	-25	39.6
		*	3.3	**	7.4	**	8.5	**	15.9	**	9.7	**	0.7	**	2.3	**	14.0	**	22.4
UIS0368	LB	4.5	8.1	-15	26.6	13.1	14.1	16.5	19.1	-4.5	39.3	-3.2	39.1	2.9	41.4	-5.0	21.4	-1.2	30.6
		*	4.2	*	13.0	*	7.4	*	9.4	**	19.2	**	22.1	*	22.5	**	10.5	*	17.3
	RCM	-16	12	7.9	11.0	21.1	19.0	11.6	18.0	-2.8	50.6	8.3	21.3	-6.0	32.5	-12	11.8	-19	16.4
		**	6.3	**	5.4	**	10.0	**	8.8	**	24.8	*	12.1	**	17.7	***	5.8	***	9.3
	NU	-6.8	7.9	13.8	13.0	3.5	7.1	6.1	1.3	8.4	9.9	5.4	2.4	-2.2	5.6	1.4	1.7	8.1	8.5
		**	4.2	**	6.4	**	3.7	*	0.6	***	4.9	**	1.4	**	3.0	***	0.8	***	4.8
UIS1003	LB	17.7	4.4	7.3	11.2	15.1	19.4	0.8	20.0	-3.7	10.2	2.2	20.4	-12	21.1	-5.5	10.9	-0.2	13.0
		''	2.3	''	5.5	''	10.2	''	9.8	*	5.0	*	11.5	*	11.5	**	5.3	*	7.4
	RCM	30.5	4.9	18.0	1.8	10.0	21.0	6.9	18.3	8.4	13.2	-2.9	5.8	4.7	16.5	-0.9	6.8	-0.3	4.5
		''	2.6	''	0.9	''	11.0	*	9.0	*	6.5	*	3.3	*	8.9	**	3.3	*	2.5
	NU	17.6	6.1	5.5	8.1	4.8	11.7	9.9	5.5	2.0	6.6	3.5	17.5	4.7	6.7	1.9	4.1	3.4	6.9
		''	3.2	*	4.0	''	6.1	*	2.7	*	3.2	*	9.9	*	3.6	**	2.0	*	3.9
UIS1246	LB	-1.8	3.1	-23	7.2	-14	11.7	16.8	16.9	-5.8	6.1	-9.3	36.1	-25	24.4	-17	32.5	-20	19.8
		*	1.6	*	3.5	*	6.1	*	8.3	*	3.0	*	20.4	*	13.3	**	15.9	**	11.2
	RCM	12.7	2.5	1.3	7.0	0.8	9.1	8.1	9.9	5.9	18.4	-6.5	8.8	-7.4	15.6	-2.1	10.8	2.4	7.6
		''	1.3	''	3.4	'	4.8	*	4.9	*	9.0	*	5.0	*	8.5	*	5.3	*	4.3
	NU	15.3	2.4	16.6	1.4	-2.7	5.6	7.7	9.7	-19	19.1	4.4	3.3	-3.4	9.9	7.6	11.3	6.5	6.5
		''	1.2	''	0.7	'	2.9	''	4.8	*	9.3	*	1.9	*	5.4	*	5.5	**	3.7
UIS1255	LB	22.6	10.7	4.8	15.5	-0.4	10.3	5.6	1.9	-0.9	15.5	-2.1	11.7	-19	10.8	-7.9	12.2	-14	19.0
		''	5.6	''	7.6	*	5.4	*	0.9	**	7.6	*	6.6	*	5.9	*	6.0	**	10.7
	RCM	30.4	9.3	17.4	11.3	14.0	31.1	-9.4	45.8	-26	21.9	-13	20.1	0.3	30.6	0.7	5.4	0.4	28.3
		''	4.9	''	5.5	''	16.3	*	22.5	*	10.7	*	11.4	*	16.6	*	2.7	*	16.0
	NU	30.2	2.6	25.7	1.9	16.3	11.1	4.4	14.1	8.5	18.2	10.4	17.7	-3.3	8.7	-9.6	23.1	-3.8	6.7
		''	1.3	''	0.9	''	5.8	''	6.9	*	8.9	*	10.0	*	4.7	*	11.3	*	3.8

Nota. Del 1 al 9 hace referencia a diluciones seriadas de las concentraciones iniciales para cada extracto evaluado, a razón de 1:1 con agua destilada. 1 hace referencia al extracto puro. Valor de probabilidad P, respecto al control positivo: ' p < 0,01, '' p < 0,05, * p > 0,05, ** p > 0,5, *** p > 0,9.

Apéndice E

Indice de Genotoxicidad (I) de las cepas evaluadas y sus estadísticos

Cepa	Medio	I de las cepas evaluadas en diluciones seriadas																			
		C+	DE EE	1 EE	DE EE	2 EE	DE EE	3 EE	DE EE	4 EE	DE EE	5 EE	DE EE	6 EE	DE EE	7 EE	DE EE	8 EE	DE EE	9 EE	DE EE
UIS0016	LB	5.2	1.2	1.0	0.0	1.0	0.2	1.0	0.0	1.2	0.2	1.1	0.1	1.1	0.3	1.2	0.1	1.1	0.0	1.1	0.1
		'	0.6	**	0.0	**	0.1	*	0.0	**	0.1	*	0.1	**	0.1	*	0.0	**	0.0	**	0.0
	RCM	11.2	2.5	0.9	0.0	0.9	0.2	0.9	0.0	1.1	0.4	1.1	0.2	1.1	0.2	1.1	0.0	1.0	0.2	1.1	0.1
		'	1.2	***	0.0	***	0.1	**	0.0	*	0.2	*	0.1	**	0.1	**	0.0	***	0.1	**	0.0
UIS0353	NU	11.5	3.0	1.1	0.1	1.1	0.2	1.2	0.0	1.4	0.3	1.3	0.2	1.4	0.3	1.3	0.2	1.3	0.2	1.3	0.1
		'	1.5	**	0.1	**	0.1	*	0.0	*	0.2	*	0.1	*	0.2	*	0.1	*	0.1	**	0.1
	LB	8.4	1.0	1.3	0.1	1.5	0.3	1.4	0.1	1.3	0.1	1.5	0.2	1.2	0.1	1.1	0.2	1.0	0.0	1.0	0.1
		'	0.5	***	0.1	*	0.2	*	0.0	*	0.0	*	0.1	*	0.1	**	0.1	*	0.0	**	0.1
UIS0368	RCM	9.5	1.9	1.0	0.3	0.9	0.1	1.0	0.0	1.1	0.2	1.0	0.2	1.0	0.1	0.9	0.1	1.0	0.2	1.0	0.2
		'	1.0	**	0.1	**	0.0	*	0.0	**	0.1	**	0.1	**	0.1	***	0.0	**	0.1	*	0.1
	NU	13.0	1.7	1.3	0.1	1.4	0.1	1.3	0.1	1.3	0.1	1.5	0.1	1.0	0.2	0.9	0.1	0.9	0.1	1.0	0.0
		'	0.8	*	0.1	*	0.1	*	0.1	*	0.0	**	0.1	*	0.1	***	0.1	***	0.1	**	0.0
UIS1003	LB	4.9	0.7	1.0	0.1	1.1	0.2	1.0	0.2	1.1	0.2	0.9	0.1	1.1	0.2	1.0	0.1	1.0	0.3	1.1	0.1
		'	0.4	**	0.0	*	0.1	**	0.1	*	0.1	***	0.1	*	0.1	**	0.0	**	0.1	*	0.1
	RCM	5.8	0.2	1.1	0.0	1.0	0.1	1.1	0.1	1.1	0.1	1.1	0.1	1.2	0.0	1.1	0.2	1.1	0.1	1.1	0.1
		'	0.1	**	0.0	**	0.0	**	0.1	*	0.0	**	0.0	*	0.0	*	0.1	**	0.1	**	0.0
UIS1246	NU	13.8	1.6	1.0	0.2	1.1	0.1	1.2	0.1	1.2	0.1	1.1	0.2	1.0	0.1	1.1	0.1	1.1	0.1	1.0	0.1
		'	0.8	**	0.1	*	0.1	*	0.1	*	0.1	**	0.1	**	0.1	**	0.0	**	0.1	**	0.1
	LB	7.4	0.8	0.8	0.0	0.8	0.1	1.0	0.0	0.8	0.1	0.9	0.1	1.0	0.1	1.0	0.1	1.0	0.1	1.1	0.2
		'	0.4	***	0.0	***	0.0	*	0.0	***	0.1	***	0.0	**	0.1	**	0.0	**	0.0	**	0.0
UIS1255	RCM	7.3	0.9	0.9	0.0	1.0	0.2	1.0	0.1	0.9	0.2	0.9	0.2	1.0	0.1	1.0	0.1	1.0	0.1	0.9	0.1
		'	0.0	**	0.0	**	0.1	*	0.1	***	0.1	**	0.1	**	0.1	**	0.1	**	0.1	**	0.1
	NU	8.2	0.3	1.1	0.1	1.0	0.0	0.9	0.1	1.0	0.1	0.9	0.1	1.0	0.0	1.0	0.1	0.9	0.0	1.0	0.1
		'	0.2	*	0.0	**	0.0	***	0.1	**	0.0	**	0.0	**	0.0	**	0.0	***	0.0	***	0.0
UIS0016	LB	8.7	0.1	1.3	0.2	1.2	0.1	1.2	0.1	1.2	0.1	1.2	0.0	1.2	0.1	1.2	0.1	1.2	0.1	1.2	0.2
		'	0.0	*	0.1	*	0.0	*	0.0	*	0.1	**	0.0	*	0.1	**	0.1	*	0.1	*	0.1
	RCM	5.7	1.5	0.9	0.1	1.0	0.1	1.0	0.0	1.0	0.1	1.0	0.1	1.0	0.1	1.0	0.1	1.0	0.1	1.0	0.1
		'	0.7	**	0.1	***	0.0	**	0.0	*	0.0	*	0.0	*	0.0	*	0.1	***	0.1	**	0.0
UIS1255	NU	5.1	0.7	1.0	0.0	1.1	0.1	1.1	0.1	1.1	0.1	1.2	0.1	1.1	0.1	1.0	0.1	1.1	0.1	1.0	0.1
		'	0.3	**	0.0	**	0.0	*	0.0	*	0.1	*	0.0	**	0.1	**	0.0	**	0.0	**	0.0
	LB	6.6	0.3	0.8	0.1	0.9	0.1	1.0	0.1	1.0	0.1	1.0	0.1	0.9	0.1	0.9	0.1	0.9	0.1	1.0	0.1
		'	0.2	***	0.0	**	0.0	*	0.0	**	0.0	*	0.0	**	0.0	**	0.0	**	0.0	***	0.0
UIS1255	RCM	6.0	0.8	0.8	0.0	0.9	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	1.1	0.2	1.1	0.1	1.1	0.2
		'	0.4	***	0.0	**	0.0	**	0.0	**	0.0	*	0.0	*	0.0	*	0.1	*	0.0	**	0.1
	NU	6.0	0.1	1.1	0.1	1.1	0.1	1.0	0.1	1.2	0.1	1.2	0.1	1.0	0.1	1.2	0.1	1.0	0.1	1.1	0.0
		'	0.1	**	0.1	*	0.1	**	0.1	*	0.0	**	0.0	**	0.1	*	0.0	**	0.0	**	0.0

Nota. Del 1 al 9 hace referencia a diluciones seriadas de las concentraciones iniciales para cada extracto evaluado, a razón de 1:1 con agua destilada. 1 hace referencia al extracto puro. C+: control positivo 4-NQO. Valor de probabilidad P, respecto al control negativo (no genotóxico): ' : p < 0,01, *: p > 0,05, **: p > 0,5, ***: p > 0,9.