

**ESTUDIO DEL POTENCIAL ANTIGENOTÓXICO DE EXTRACTOS DE FLUIDOS
SUPERCRÍTICOS OBTENIDOS DE ESPECIES VEGETALES DE LA
DIVERSIDAD COLOMBIANA (ASTERACEAE, BURSERACEAE, ERICACEAE,
LAURACEAE, SOLANACEAE Y VERBENACEAE) FRENTE AL DAÑO
GENÉTICO PRODUCIDO POR RADIACIÓN ULTRAVIOLETA**

NATHALIA REY CASTELLANOS

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA**

2015

**ESTUDIO DEL POTENCIAL ANTIGENOTÓXICO DE EXTRACTOS DE FLUIDOS
SUPERCRÍTICOS OBTENIDOS DE ESPECIES VEGETALES DE LA
DIVERSIDAD COLOMBIANA (ASTERACEAE, BURSERACEAE, ERICACEAE,
LAURACEAE, SOLANACEAE Y VERBENACEAE) FRENTE AL DAÑO
GENÉTICO PRODUCIDO POR RADIACIÓN ULTRAVIOLETA.**

NATHALIA REY CASTELLANOS

**Trabajo de Grado presentado como requisito
para optar al título de Bióloga**

Director

JORGE LUIS FUENTES LORENZO

Microbiólogo, Ph.D.

Co-directora

ELENA E. STASHENKO

Química, Ph.D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2015

AGRADECIMIENTOS

A mi familia.

Al profe Jorge Luis Fuentes y la profesora Elena Stashenko por su apoyo y
confianza.

A todos los compañeros del laboratorio y de manera muy especial a Nathalia
Quintero.

A mi amiga Angela Celis.

A todos los docentes y administrativos de la Escuela de Biología.

A la Universidad Industrial de Santander y Colciencias.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	12
1. OBJETIVOS	14
1.1 OBJETIVO GENERAL	14
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
2. MARCO TEÓRICO	15
2.1 LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA	16
2.2 USO DE LAS PLANTAS MEDICINALES COMO FOTOPROTECTORES	18
2.3 EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO	19
2.4 EL ENSAYO SOS CHROMOTEST	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1 MATERIAL VEGETAL	23
3.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS CON CO ₂ SUPERCRÍTICO	23
3.3 CEPA BACTERIANA Y CONDICIONES DE CULTIVO	24
3.4 ANÁLISIS DE GENOTOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS	24
3.5 ANÁLISIS DE ANTIGENOTOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS	26
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	27
3.7 CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE LOS EXTRACTOS	27
4. RESULTADOS	28
4.1 EFECTO GENOTÓXICO DE LOS EXTRACTOS	28
4.2 EFECTO ANTIGENOTÓXICO DE LOS EXTRACTOS	28
4.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS	32
5. DISCUSIÓN	38
6. CONCLUSIONES	45
7. RECOMENDACIONES	46
BIBLIOGRAFÍA	47

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Relación de los extractos vegetales evaluados en este estudio junto con el lugar de colecta y concentración inicial de cada extracto	23
Tabla 2. Efecto antígenotóxico de extractos de especies del género <i>Lippia</i> contra la genotoxicidad inducida por UVC en la cepa PQ-37 de <i>E. coli</i>	30
Tabla 3. Efecto antígenotóxico de extractos de especies de la familia Asteraceae contra la genotoxicidad inducida por UVC en la cepa PQ-37 de <i>E. coli</i> .	31
Tabla 4. Efecto antígenotóxico de los extractos SFE 030, SFE 019, SFE 017 y RT 003 SFE contra la genotoxicidad inducida por UVC en la cepa PQ-37 de <i>E. coli</i> .	32
Tabla 5. Composición química de los extractos con CO ₂ supercrítico de especies vegetales del género <i>Lippia</i> (Verbenaceae) por GC-MS.	34
Tabla 6. Composición química de los extractos con CO ₂ supercrítico de especies de la familia Asteraceae por GC-MS	36

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Espectro electromagnético de la radiación solar y sus principales efectos biológicos. DPC: dímeros de pirimidina ciclobutano; 6-4 PP: 6-4 pirimidina pirimidona; ROS (por sus siglas en inglés): especies reactivas de oxígeno	16
Figura 2. Principio del ensayo SOS Chromotest. Parte superior: Célula no inducida; el represor LexA impide la expresión de la fusión <i>sfiA::lacZ</i> . Parte inferior: Célula inducida; el daño genético promueve la activación de la proteína RecA, la cual promueve la autodegradación de LexA y provoca la inducción de la expresión de la fusión <i>sfiA::lacZ</i> . El nivel de expresión puede ser medido a través de un sustrato cuya degradación produce color, como el ONPG (orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido). Tomado y modificado de Quillardet & Hofnung (1985)	22

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Efectos de agentes naturales con potencial fotoprotector contra la exposición a la radiación UV en ensayos in vitro e in vivo.	61
Anexo B. Análisis de genotoxicidad de los 13 extractos a través del ensayo SOS Chromotest. Se presentan los valores correspondientes al factor de inducción (I) y su correspondiente error estándar. En [] se describe la concentración (mg/ml) utilizada en cada tratamiento. C-, control negativo (agua destilada); C+, control positivo (2,26 μ M/ml 4NQO, agente carcinogénico y mutagénico estándar conocido como 4-nitroquinolina-1-óxido utilizado). * Se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al C-.	63

RESUMEN

TÍTULO: ESTUDIO DEL POTENCIAL ANTIGENOTÓXICO DE EXTRACTOS DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS OBTENIDOS DE ESPECIES VEGETALES DE LA DIVERSIDAD COLOMBIANA (ASTERACEAE, BURSERACEAE, ERICACEAE, LAURACEAE, SOLANACEAE Y VERBENACEAE) FRENTE AL DAÑO GENÉTICO PRODUCIDO POR RADIACIÓN ULTRAVIOLETA *

Autor: Nathalia Rey Castellanos **

Palabras claves: Antigenotoxicidad, SOS Chromotest, Radiación ultravioleta, Extracción con CO₂ supercrítico.

Descripción: El presente estudio evaluó el potencial genotóxico y antigenotóxico (fotoprotector) de 13 especies de plantas frente al daño genético producido por la radiación ultravioleta de tipo C (UVC). Los extractos vegetales se obtuvieron por extracción con CO₂ supercrítico y su composición química fue determinada por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés). El efecto antigenotóxico de los extractos fue evaluado en el ensayo SOS Chromotest en un procedimiento de co-incubación con la cepa PQ-37 de *Escherichia coli*. Este trabajo reporta por primera vez el efecto fotoprotector de *Lippia origanoides* (extractos SFE 042 y SFE 008, RT SFE 007), *Persea caerulea* (SFE 030), *Baccharis cf. nítida* (SFE 033), *Lourteigia sp* (SFE 015), *Austroeupatorium inulifolium* (SFE 038), *Chromolena pelli* (SFE 001) y *Solanum crotonifolium* (SFE 019). Esta actividad antigenotóxica podría estar relacionada con los componentes mayoritarios de los extractos encontrados en los análisis fitoquímicos. Los compuestos mayoritarios fueron el carvacrol (56.96%) para el SFE 042; pinocembrina (54.89%) para el SFE 008; hidrocarburos triterpénicos no identificados (29.3%, IRL= 3497; 18.92%, IRL= 3586; 38.34%, IRL= 3420) para los extractos SFE 033, 038 y 001; Norolean-12-ene (32.42%) para el SFE 0015. La caracterización química de los extractos SFE 030 y SFE 019 no fue conclusiva.

* Tesis de grado.

** Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander. Director: Jorge L. Fuentes Lorenzo, Microbiólogo Ph.D. Codirectora: Elena E. Stashenko Ph. D.

ABSTRACT

Title: STUDY OF THE ANTIGENOTOXIC POTENTIAL OF SUPERCRITICAL FLUID (CO₂) EXTRACTS FROM PLANT SPECIES OF THE COLOMBIA DIVERSITY (ASTERACEAE, BURSERACEAE, ERICACEAE, LAURACEAE, SOLANACEAE AND VERBENACEAE) AGAINST ULTRAVIOLET RADIATION-INDUCED DNA DAMAGE *

Author: Nathalia Rey Castellanos **

Keywords: antigenotoxicity, SOS Chromotest, UV radiation, supercritical CO₂ extraction.

Description:

This study evaluated the genotoxic and antigenotoxic (photoprotector) potential of 13 botanical species, collected in east of Santander, against induced UVC genetic damage. The extracts were obtained by supercritical CO₂ extraction and their chemical compositions were determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The antigenotoxic effects were assayed in co-incubation procedure using the SOS chromotest in *Escherichia coli* PQ-37. This work presents the first report on photoprotective properties of *Lippia origanoides* (extractos SFE 042 y SFE 008, RT SFE 007), *Persea caerulea* (SFE 030), *Baccharis cf. nitida* (SFE 033), *Lourteigia sp* (SFE 015), *Austroeupatorium inulifolium* (SFE 038), *Chromolena pellia* (SFE 001) and *Solanum crotonifolium* (SFE 019). This effect could be related with the major constituents reported in phytochemical analysis. The major constituents were carvacrol (\approx 56.96%) in SFE 042, pinocembrine (\approx 55%) in SFE 008; unidentified triterpenics hydrocarbons (29.3%, IRL= 3497; 18.92%, IRL= 3586; 38.34%, IRL= 3420) in SFE 033, 038 y 001; Norolean-12-ene (32.42%) in SFE 015. The chemical characterization of extracts SAFE 030 and SFE 019 were inconclusive.

* Thesis Project.

** Faculty of Sciences, Program of Biology. Director: Jorge L. Fuentes Lorenzo, Microbiologist, Ph.D. Codirector: Elena E. Stashenko, chemist, Ph.D.

INTRODUCCIÓN

Actualmente se acepta que la carcinogénesis es un proceso con múltiples estadios, fruto de la acumulación en una célula de sucesos genéticos y epigenéticos (Pleasant et al., 2010; Visvader, 2011; Zaidi, Day, & Merlino, 2008). La estabilidad celular, que evita la acumulación de mutaciones potencialmente oncogénicas, depende de la frecuencia con que se producen las lesiones en el ADN y de su capacidad para reparar dichas lesiones (Laval, Jurado, Saparbaev, & Sidorkina, 1998; Peltomäki, 2001).

El efecto mutagénico que tienen diferentes factores de estrés ambiental puede generar inestabilidad genética que inician procesos carcinogénicos. Entre dichos factores de estrés ambientales, la radiación ultravioleta (RUV) es considerada como un factor de riesgo importante para el desarrollo de cáncer de piel (Tsatsou & Trakatelli, 2012). La acción genotóxica de la RUV se debe, principalmente, a la producción de dímeros de pirimidina ciclobutano (DPC), 6-4 pirimidina pirimidona (6-4 PP) y 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG), que parecen ser iniciadores del cáncer de piel (Halliday, Norval, Byrne, Huang, & Wolf, 2008; Ravanat, Douki, & Cadet, 2001). En este contexto, la prevención del cáncer de piel en las poblaciones humanas sanas implica evitar la exposición a los rayos solares y tener una adecuada fotoprotección (Gilaberte & González, 2010; González, Fernández, & Gilaberte, 2008).

El desarrollo de fotoprotectores con base en productos naturales que contribuyan a mitigar la incidencia de la radiación solar es una temática de creciente interés mundial. En este contexto, los antimutágenos o agentes que reducen la producción de mutaciones espontáneas e inducidas en las células, son de particular utilidad. Estos agentes también se han clasificado con base en sus mecanismos de acción (Wattenberg, 1985). Una simple pero práctica clasificación

es aquella que separa a los antimutágenos en dos grandes grupos: desmutágenos y bioantimutágenos (Kada & Shimoi, 1987). Los desmutágenos inactivan el mutágeno, ya sea química o bioquímicamente antes de que puedan dañar el material genético, mientras que los bioantimutágenos interfieren con los procesos celulares involucrados en la fijación del daño genético en mutaciones; por ejemplo, ciclo celular, replicación y/o reparación del daño en el ADN, entre otros (Kuroda & Inoue, 1988). Sobre la base de los diferentes mecanismos de acción que éstos presentan, se han propuesto detalladas guías que indican los puntos del proceso carcinogénico donde es posible detener o bloquear el desarrollo del cáncer usando antimutágenos (De Flora & Ferguson, 2005; De Flora & Ramel, 1988; De Flora, 1998). Varios de estos puntos de intervención incluyen inhibición de efecto genotóxico, actividad antioxidante, inhibición de la proliferación celular, inducción de la diferenciación celular e interferencia con señales de transducción; conduciendo a la protección en más de un punto del proceso carcinogénico y soportando la implementación racional de estrategias de quimioprevención para el control del cáncer. Aunque algunos de estos mecanismos son hipotéticos, y probablemente haya otros desconocidos hasta el momento, trabajos como los mencionados contribuyen sin lugar a dudas a un estudio más racional de este tipo de agentes quimiopreventivos.

El Grupo de Investigación en Microbiología y Genética (Escuela de Biología – UIS) desarrolla un proyecto dirigido a identificar compuestos naturales de la flora colombiana con potencial quiopreventivo y/o fotoprotector frente al daño genético inducido por radiación ultravioleta. La presente tesis, desarrollada en el marco del proyecto mencionado, estudió tal efecto fotoprotector en 13 extractos de especies de plantas provenientes de las familias Verbenaceae, Solanaceae, Asteraceae, Burseraceae, Ericaceae y Lauraceae.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial antigenotóxico de 13 extractos de plantas frente al daño genético inducido por la radiación de tipo UVC.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto genotóxico de los 13 extractos en el ensayo SOS Chromotest.
- Evaluar el efecto antigenotóxico de los 13 extractos frente al daño ocasionado por radiación UVC en el ensayo SOS Chromotest.
- Conocer la composición química de los extractos con potencial fotoprotector mediante un análisis cromatográfico.

2. MARCO TEÓRICO

Los estudios sobre mutagénesis adquieren cada vez mayor importancia a nivel mundial, debido a la acción de diferentes agentes genotóxicos y/o mutagénicos sobre la salud del hombre moderno (M. González, Vernhe, & Sánchez, 2009). Entre dichos agentes se encuentra la radiación ultravioleta, la cual se cataloga como el carcinógeno ambiental más ubicuo de la tierra (Zaidi et al., 2008).

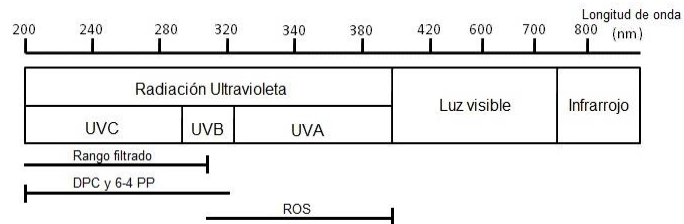
El cáncer de piel, el cual incluye el carcinoma de células basales y escamosas así como el melanoma cutáneo (BCC, SCC y CM por sus siglas en inglés), se ha relacionado con una serie de factores endógenos y ambientales (Garbe & Leiter, 2009). Diversos estudios han evidenciado que la exposición a la RUV, ya sea por luz solar o por medio de cámaras o lámparas bronceadoras, constituye el principal factor de riesgo exógeno para padecer cáncer de piel (de Gruijl, 2002; Garbe & Leiter, 2009; Marks, 2000). El CM, uno de los tipos de cáncer de piel más peligrosos, se origina en los melanocitos que se encargan de producir un pigmento en la piel, generalmente de color café, conocido como melanina. La melanina es un cromóforo importante que actúa como filtro, absorbiendo la radiación UV, para proteger al organismo (Acosta, Fierro, Velásquez, & Rueda, 2009; Hussein, 2005). De acuerdo a la Sociedad Americana Contra el Cáncer, la tasa de CM ha estado aumentando en los últimos 30 años. Este representa aproximadamente del 2 al 7% de los casos de cáncer de piel, pero es causa casi del 90% de la mortalidad. Para el año 2014 en los Estados Unidos de América el melanoma es uno de los cánceres más comunes en los adultos jóvenes, especialmente en mujeres menores de 30 años. Aunque en Colombia no existen estudios epidemiológicos exhaustivos sobre la incidencia del CM, Sánchez, Nova, de la Hoz, & Castañeda (2011) reportan un incremento en la incidencia de CM, pasando de 4 casos/100.000 habitantes en el año 2003 a 6 casos/100.000 habitantes en el 2007. Ante esa problemática, diferentes mecanismos de fotoprotección se han

propuesto tales como: agentes fotoprotectores de bloqueo (ropa, sombrero, gafas, etc.), agentes fotoprotectores tópicos (protectores solares) y agentes fotoprotectores orales (Gilaberte & González, 2010; González, Fernández, & Gilaberte, 2008).

2.1 LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA

La luz solar se compone de un espectro continuo de radiación electromagnética que se divide en tres partes principales de longitud de onda (Figura 1): luz infrarroja, luz visible y luz UV. Esta última a su vez se divide en tres regiones: onda larga UVA (400-320nm), onda media UVB (320-290nm) y onda corta UVC (Hussein, 2005).

Figura 1. Espectro electromagnético de la radiación solar y sus principales efectos biológicos. DPC: dímeros de pirimidina ciclobutano; 6-4 PP: 6-4 pirimidina pirimidona; ROS (por sus siglas en inglés): especies reactivas de oxígeno.



Fuente: Tomado y modificado de Hussein, 2005

La radiación UV representa sólo una pequeña porción de los rayos del sol, sin embargo, es el componente más nocivo y mutagénico del espectro de radiación solar (Hussein, 2005). Energéticamente hablando, $UVC > UVB > UVA$. Dado que estos tipos de radiación UV son filtrados diferencialmente por la capa de ozono, la importancia relativa de estos tipos en términos de su exposición no es directamente proporcional a su energía. Así, la radiación UVA, aunque menos

energética, es epidemiológicamente más importante ya que es filtrada solo en un ~5% por la capa de ozono; mientras que las radiaciones UVB y UVC son filtradas mayoritariamente (95%) y en su totalidad, respectivamente. Es claro, que un deterioro gradual de la capa de ozono permitirá que cantidades crecientes de las radiaciones UVC y UVB lleguen a la superficie de la Tierra, incrementando así su importancia en términos de su exposición (Diffey, 2002; Matsumura & Ananthaswamy, 2002; Nichols & Katiyar, 2010). En análisis de bioprospección de fotoprotectores de ADN, la UVC presenta ventajas frente a la UVB y UVA debido a que las ondas cortas se encuentran cercanas al máximo de absorción de las bases nucleotídicas; por lo tanto, las reacciones fotoquímicas son más eficientes en esta longitud de onda (Ravanat, Douki, & Cadet, 2001).

La acción genotóxica de la radiación UV se debe principalmente al daño celular y molecular ocasionado por los fotones de la luz UV a través de dos mecanismos (Ravanat et al., 2001): por absorción directa de la luz UVB y UVC por parte del ADN y por una acción indirecta conocida también como fotosensibilización. La acción directa, promueve la formación de fotoproductos diméricos que involucran dos pares de pirimidinas adyacentes, como los dímeros de pirimidina ciclobutano (DPC) y 6-4 pirimidina pirimidona (6-4 PP). Se ha demostrado que una cantidad pequeña de DPCs puede desencadenar la respuesta SOS (Quillardet, Frelat, Nguyen, & Hofnung, 1989), de la cual se hará referencia más adelante. En segundo lugar, los mecanismos de acción indirecta o mecanismos de fotosensibilización se generan por la absorción de la luz UVA y UVB por parte de cromóforos endógenos (fotosensibilizadores). Esta acción facilita la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) tales como radicales hidroxilo y aniones súper óxido.

2.2 USO DE LAS PLANTAS MEDICINALES COMO FOTOPROTECTORES

Numerosos reportes apoyan el uso de la diversidad química de los productos naturales como fuente de moléculas con grandes potenciales terapéuticos. Se ha registrado el uso tanto clínico como tradicional de extractos de plantas (principalmente en forma de infusión) o de sus constituyentes en tratamientos antimicrobianos, insecticidas, tranquilizantes, contra desordenes intestinales, antitumorales, entre otros (Farnsworth, Akerele, Bingel, Soejarto, & Guo, 1985; Ganesan, 2008; Newman & Cragg, 2007). Hasta el 2008, alrededor de 100 nuevos productos de origen natural se encontraban en desarrollo clínico, en particular como agentes quimiopreventivos y antiinfecciosos, con vista a la creación de nuevos fármacos (Fabricant & Farnsworth, 2001; Harvey, 2008). Así mismo, estudios preclínicos y clínicos han reportado en una amplia variedad de especies vegetales con propiedades fotoprotectoras, las cuales tiene uso potencial contra el daño causado por la radiación UV. Se han descrito diferentes blancos terapéuticos a nivel celular y molecular para retardar y/o prevenir el desarrollo de tumores en la piel. (Anexo 1). Por ejemplo, los alcoholes grasos polihidroxiados (PFA) de *Persea americana* (Lauraceae), conocida comúnmente como aguacate, han mostrado potencial fotoprotector y antiinflamatorio contra el daño inducido por UVB en queratinocitos y explantes de piel humana (Rosenblat et al., 2011). Se ha demostrado que estos alcoholes promueven notablemente la remoción de fotoproductos (DPC), posiblemente a través de una acción directa y/o indirecta en los mecanismos de reparación del daño genético; de igual manera, disminuyen significativamente los niveles de IL-6 y PGE₂, mediadores de la respuesta inflamatoria. Otro ejemplo es el caso de la silibinina, un flavonoide que se encuentra en *Silybum marianum* o cardo de leche de la familia Asteraceae. Se ha observado su acción contra la fotocarcinogénesis en el modelo de ratones SKH:HR-1 libres de pelo (Gu, Singh, Dhanalakshmi, Agarwal, & Agarwal, 2007). Posiblemente este compuesto actúe a través de la inhibición de los mediadores de la inflamación, Ciclooxygenasa-2 y óxido nítrico sintasa inducible (COX-2 y iNOS,

respectivamente). Otros ejemplos de especies vegetales con acción fotoprotectora y posibles mecanismos de acción se describen en el Anexo 1.

2.3 EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO

El estudio de la composición química de las especies vegetales por medio de diferentes técnicas de extracción ha permitido ampliar el conocimiento de los diferentes metabolitos secundarios que se encuentran en cada una, así como conocer los beneficios y perjuicios que posiblemente puedan tener las plantas que por tradición se han utilizado en la medicina popular (Stashenko, Martínez, Cala, Durán, & Caballero, 2013). Dentro de esta gran diversidad de técnicas se destacan los métodos extractivos en los cuales el aislamiento de analitos está basado en diferencias de solubilidades en disolvente(s) o de su capacidad de adsorción o absorción sobre un sorbente o un polímero poroso (Stashenko & Martínez, 2011). Una de las técnicas extractivas que ha experimentado creciente acogida dentro de la comunidad científica, principalmente en la química sostenible, es la extracción con fluido supercrítico (SFE por sus siglas en inglés; Stashenko & Martínez, 2011). Entre las ventajas que presenta la SFE están la eficiencia en la preparación de la muestra, su amplio campo de aplicación, uso restringido de solventes y acoplamiento de la extracción para integrar la preparación de la muestra y la determinación analítica (Zougagh, Valcárcel, & Ríos, 2004). Con respecto al uso de solventes, la SFE permite obtener, si se desea, extractos libres de solventes, además de disminuir las probabilidades de degradación y pérdida del analito-*target* ya que utiliza la propiedad de disolución de algunos fluidos, como el CO₂, en estado supercrítico (Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2007). Entre los solventes disponibles para uso como fluido supercrítico están el CO₂, etano, propano, n-pentano, amonio, fluoroforno, agua, entre otros. El CO₂ es actualmente el solvente más usado ya que puede llegar fácilmente a condiciones supercríticas y presenta claras ventajas frente a otros fluidos supercríticos como baja toxicidad, inflamabilidad, costo y alta pureza. Sin embargo, el CO₂ está

restringido por su baja solvatación para analitos altamente polares; no obstante, se ha recomendado el uso de cosolventes que aumenten la eficiencia de la extracción, como por ejemplo el metanol (Zougagh et al., 2004).

2.4 EL ENSAYO SOS CHROMOTEST

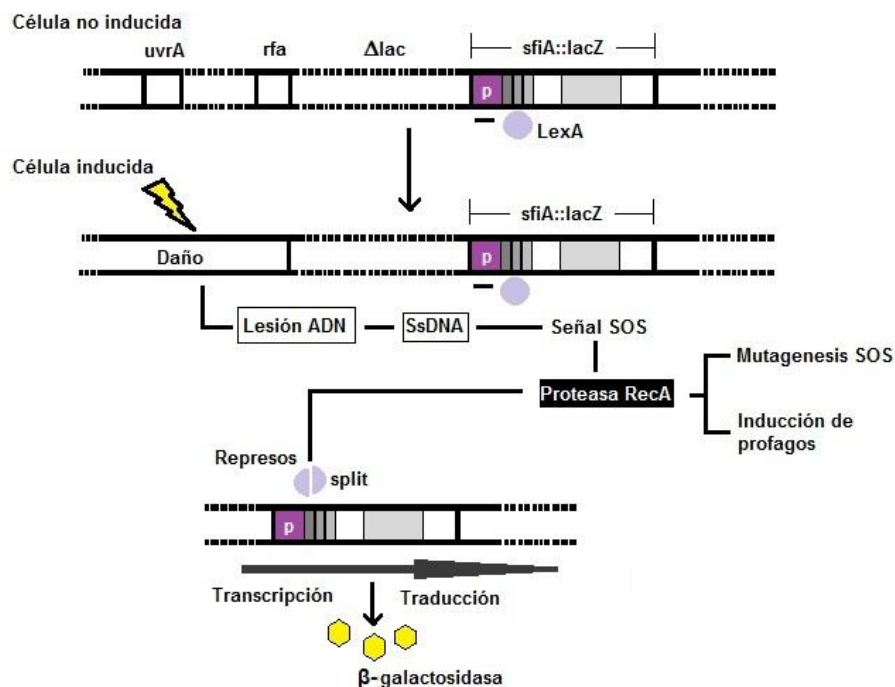
En bacterias algunas de las respuestas celulares, inducidas por agentes que causan daño al ADN celular, involucran un conjunto de funciones (productos génicos) conocidas como respuesta SOS o genes inducibles por el daño (din, por sus siglas en ingles). Se ha evidenciado que esta respuesta no solo promueve la reparación del daño celular, sino además, el incremento de eventos mutacionales, inducción de profagos y la interrupción de la división celular (Quillardet & Hofnung, 1985). El desarrollo de todas estas funciones depende de la activación de la proteína RecA, la cual regula de manera positiva la auto-degradación del represor general del sistema SOS, LexA (Figura 2; Serment, Breña, & Espinosa, 2005).

SOS Chomotest (Quillardet & Hofnung, 1985; Quillardet, Huisman, D'Ari, & Hofnung, 1982) es un ensayo bacterial colorimétrico que fue inicialmente desarrollado para detectar agentes genotóxicos, especialmente carcinógenos, en el Instituto Pasteur de Francia. En el ensayo es monitoreada la respuesta SOS en la enterobacteria *Echerichia coli* cepa PQ-37 (F^- thr leu his-4 pyrD thi galE galK or galT lac Δ U169 srl300::Tn10 rpoB rpsL rfa trp::Muc⁺ sfiA::Mud(Ap, lac) cts.) mediante una fusión genética (sula::LacZ) entre el gen *sulA* (*sfiA*), cuya función es la inhibición de la formación del septo celular durante la respuesta SOS, y el gen estructural de la β -galactosidasa (β G) del operón Lactosa; el cual fue previamente truncado en el cromosoma de la cepa *E. coli* PQ37. De esta manera, la expresión β G es un indicador indirecto del daño inducido al ADN; es decir, es un indicador del nivel de inducción de la respuesta SOS. Como la mayor parte de los eventos mutacionales en *E. coli* están relacionados con la mutagénesis SOS (Echols &

Goodman, 1990), la inducción de color en este ensayo es un buen indicador del potencial mutagénico del agente inductor evaluado (Figura 2).

La cepa PQ-37 de *E. coli* deriva de la cepa GC4436, la cual fue desarrollada por transducción bacteriana usando el bacteriófago Mu(Ap,lac)cts (Huisman & D'Ari, 1981). Tal bacteriófago contiene el gen de la β -lactamasa, que confiere resistencia a la ampicilina, y los genes estructurales, *lacZ* y *lacY*, del operón lactosa de *E. coli* sin su promotor (Casadaban & Cohen, 1979). Dado que la integración del bacteriófago Mu(Ap,lac)cts ocurre dentro de un gen, en este caso del gen *sulA*, en dirección de su transcripción, la expresión de los genes estructurales del operón lactosa se dará a partir del promotor de este gen. Adicionalmente, la cepa PQ-37 presenta varios marcadores genéticos adicionales. Por ejemplo, una mutación en el gen *uvrA* (A Sancar et al., 1981) provoca deficiencia en la reparación por escisión de nucleótidos (A Sancar & Rupp, 1983) que la hace sensible a una amplia variedad de mutágenos que inducen daños en el ADN reparados por este mecanismo, como la RUV. Contiene una mutación que la hace constitutiva para la actividad fosfatasa alcalina (Torriani & Rothman, 1961). Presenta una mutación *galE* que afecta la integridad de los lipopolisacáridos de la membrana externa celular (Koplow & Goldfine, 1974); y una mutación *rfa* que aumenta la deficiencia de lipopolisacáridos de la membrana celular y permite una mejor difusión de ciertas sustancias químicas en la célula (Quillardet & Hofnung, 1985).

Figura 2. Principio del ensayo SOS Chromotest. Parte superior: Célula no inducida; el represor LexA impide la expresión de la fusión *sfiA::lacZ*. Parte inferior: Célula inducida; el daño genético promueve la activación de la proteína RecA, la cual promueve la autodegradación de LexA y provoca la inducción de la expresión de la fusión *sfiA::lacZ*. El nivel de expresión puede ser medido a través de un sustrato cuya degradación produce color, como el ONPG (orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido)..



Fuente: Tomado y modificado de Quillardet & Hofnung (1985)

SOS Chromotest se presenta como un ensayo eficiente y fiable para la evaluación rápida de agentes que pueden dañar, proteger y/o estimular los mecanismos de reparación del ADN. Se ha demostrado su utilidad en trabajos de bioprospección de nuevos agentes radioprotectores (Fuentes et al., 2006a) y quimiopreventivos (Quillardet & Hofnung, 1993).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal correspondiente a 13 especímenes (Tabla 1) fue colectado en la cordillera oriental de Colombia por especialistas etnobotánicos, quienes con base a sus conocimientos seleccionaron las plantas. La identificación taxonómica se realizó en el Herbario Nacional Colombiano (COL) por especialistas etnobotánicos.

Tabla 1. Relación de los extractos vegetales evaluados en este estudio junto con el lugar de colecta y concentración inicial de cada extracto.

Extracto	Familia	Especies	Concentración stock (mg/ml)	Lugar de colecta
SFE 042	Verbenaceae	<i>Lippia origanoides</i>	35,7	Umpalá
SFE 008		<i>Lippia origanoides</i>	31	Los Santos
SFE 023		<i>Lippia</i> sp.	33,8	Barichara
RT 007 SFE		<i>Lippia origanoides</i>	30	Los Santos
SFE 001	Asteraceae	<i>Chromolena pellia</i>	30	Los Santos
SFE 015		<i>Lourteigia</i> sp.	30	Los Santos
SFE 033		<i>Baccharis</i> cf. <i>nitida</i>	30	Villanueva
SFE 038		<i>Austroeupatorium inulifolium</i>	30	Curití
SFE 024		<i>Wedelia calycina</i>	30	Barichara
SFE 017	Burseraceae	<i>Bursera tomentosa</i>	30	Los Santos
RT 003 SFE	Ericaceae	<i>Bejaria aestuans</i>	30	Los Santos
SFE 030	Lauraceae	<i>Persea caerulea</i>	33,3	Charalá
SFE 019	Solanaceae	<i>Solanum crotonifolium</i>	34,2	Umpalá

Fuente: Autor

3.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS CON CO₂ SUPERCRÍTICO

La obtención de estos extractos se realizó mediante extracción con fluido (CO₂) supercrítico (SFE, por sus siglas en inglés) siguiendo la metodología propuesta

por (Stashenko et al., 2013). Inicialmente, el material vegetal fue secado en un horno a temperatura de 60 °C, durante 5 días. El proceso de secado se continuó en vivero hasta alcanzar una humedad máxima del 20%. Luego, el material vegetal fue picado en un molino de cuchillas con un tamiz de 1 mm y se depositó en frascos de vidrio para su extracción con CO₂ supercrítico. La extracción se realizó en un equipo Thar SFE-2000–2-FMC50 (Thar Instruments, Pittsburgh, PA, USA). Las condiciones de extracción fueron: presión de 300 bar, temperatura de 40 °C, con flujo continuo de CO₂ (30 g/min) durante 5 horas. Los extractos obtenidos fueron diluidos en metanol, hasta alcanzar una concentración stock (Tabla 1), y almacenados a 8 °C antes de su uso experimental.

3.3 CEPA BACTERIANA Y CONDICIONES DE CULTIVO

Con el fin de evaluar el potencial genotóxico y antigenotóxico (fotoprotector) de cada extracto se utilizó el ensayo SOS Chromotest (Quillardet & Hofnung, 1985; Quillardet et al., 1982). El análisis inició con un cultivo base de la bacteria *Escherichia coli* cepa PQ-37 (F⁻ thr leu his-4 pyrD thi galE galK or galT lac ΔU169 srl300::Tn10 rpoB rpsL rfa trp::Muc⁺ sfiA::Mud(Ap, lac) cts.), desarrollado durante toda una noche (overnight) en medio Luria–Bertani (LB) suplementado con ampicilina (50 µg/ml) y tetraciclina (17 µg/ml), a una temperatura de 37°C y agitación constante (100 rpm). Al siguiente día, se inoculó 2 ml del cultivo overnight en 20 ml de LB suplementado con los antibióticos y se dejó crecer bajo las condiciones experimentales descritas anteriormente hasta alcanzar una D.O_{600nm} de 0.4 (cultivo bacteriano en fase exponencial).

3.4 ANÁLISIS DE GENOTOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS

El cultivo de la cepa en fase exponencial fue diluido 10 veces en medio fresco LB. A continuación se dispensó en tubos de microcentrífuga a los cuales se les agregó nueve concentraciones diferentes del extracto a evaluar (tratamientos); las cuales

fueron determinadas experimentalmente. Como control negativo de los experimentos se usó agua destilada y como control positivo, una solución 2,26 μM de 4-nitroquinolina-1-óxido. Los tratamientos y controles se incubaron a 3°C durante 30 min para facilitar la incorporación de extractos al interior de la célula. Posteriormente se incubaron a 37°C por 2 horas para que ocurra la inducción del gen reportero β -galactosidasa. Finalmente se desarrolló el ensayo enzimático con el fin de cuantificar tanto la actividad β -galactosidasa como la fosfatasa alcalina (actividad constitutiva utilizada como control interno del ensayo).

Ensayo enzimático de β -galactosidasa (βG): En placas de microtitulación se mezclaron 135 μl de buffer Z y 15 μl de células de los tratamientos y controles, para facilitar la lisis celular. Posterior a 20 min, la reacción enzimática inició al adicionar 30 μl de solución stock de orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) preparada a 4 mg/ml de buffer fosfato (0.1 M, pH 7.0) y se dejó en incubación durante 40 min. La reacción se detuvo añadiendo 100 μl de solución 1 M Na_2CO_3 . La lectura espectrofotométrica se realizó a una $\text{DO}_{420\text{nm}}$ en un espectrofotómetro Multiskan GO (Thermo Scientific, MA, USA).

Ensayo enzimático fosfatasa alcalina (FA): Simultáneamente al ensayo βG , se efectuó el de FA. En la placa de microtitulación se dispensaron 135 μl de buffer T (1 M Tris HCl, pH 8.8) y 15 μl de células de los tratamientos y controles, para facilitar la lisis celular. Posterior a 20 min se adicionó 30 μl de la solución stock de *p*-nitrofenilfosfato (PNPP) preparada a 4 mg/ml de buffer T y se incubó durante 40 minutos para desarrollar la reacción enzimática. La reacción se detuvo añadiendo 50 μl de la solución 2,5 M HCl y cinco minutos después se agregó 50 μl de solución 2 M TRIS. Se realizó la lectura espectrofotométrica como se describió anteriormente.

El criterio de genotoxicidad utilizado fue el factor de inducción SOS (Quintero, Stashenko, & Fuentes, 2012), el cual representa la inducción del gen *sfiA* en cada tratamiento y controles y es considerado como una medida indirecta del daño

(genotóxico) primario causado sobre el ADN celular. La ecuación se describe a continuación:

$$I = \frac{Rt}{Rnt}$$

donde R es la relación entre las unidades de la βG y FA ($R = \frac{\text{Unidades } \beta G}{\text{Unidades FA}}$) en las células tratadas (t) y no tratadas (nt , control negativo) del ensayo. El extracto fue considerado como no genotóxico si $I < 1.5$, inconcluso si $1.5 < I < 2.0$ y genotóxico si $I > 2.0$ y existe una clara relación dosis respuesta.

3.5 ANÁLISIS DE ANTIGENOTOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS

El potencial antigenotóxico, frente a la RUV-C, fue evaluado en los 13 extractos vegetales ya que ninguno de estos evidenció acción genotóxica. El potencial antigenotóxico se evaluó mediante ensayos de co-incubación (Fuentes et al., 2006b), básicamente, como el descrito para el protocolo de genotoxicidad. En este caso, las células son expuestas simultáneamente a diferentes concentraciones del extracto (iguales a las evaluadas en el ensayo de genotoxicidad) y a la dosis de RUV-C (20,28 J/m²). Un extracto fue considerado como antigenotóxico (fotoprotector) si presenta una reducción significativa del I (factor de inducción SOS) en los ensayos de co-tratamiento y fue expresado como un porcentaje de inhibición de la genotoxicidad (%IG; Quintero et al., 2012) y si existe una clara relación dosis-efecto:

$$\%IG = 1 - \frac{I_{co} - I_{basal}}{I_{mut} - I_{basal}} \times 100$$

donde I_{co} es el factor de inducción SOS en células del co-tratamiento (extracto + UVC), I_{basal} es el factor de inducción SOS basal (control negativo) e I_{mut} es el factor de inducción SOS de las células tratadas solo con RUV (control positivo). De esta manera, el %IG representa la capacidad de la sustancia ensayada para proteger el material genético del efecto genotóxico de la RUV-C.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

En todos los casos se desarrollaron al menos tres experimentos independientes con cuatro réplicas cada uno. Los datos fueron expresados como el promedio \pm EE del factor de inducción (*I*) junto con el porcentaje de inhibición de la genotoxicidad. Las diferencias entre los tratamientos fueron sustentadas mediante una prueba de Dunnet. Para evaluar la relación dosis-respuesta se usó el análisis de rangos de Spearman. Para todos los análisis estadísticos se consideró una $p < 0.05$. Todos los análisis se realizaron con el programa R (R 0.98.932).

3.7 CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE LOS EXTRACTOS

El análisis de la composición química de extractos promisorios se llevó a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés), siguiendo la metodología propuesta por (Stashenko et al., 2013). La caracterización de los compuestos se basó en criterios cromatográficos [índice de retención lineal (LIR) y el uso de compuestos estándar] y espectroscópicos (espectro de masas, comparación en bases de datos y compuestos estándar). Los datos cromatográficos y espectroscópicos se obtuvieron con un equipo GC 7890 Plus (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) acoplado a un detector selectivo de masas MSD 5975C (*Agilent Technologies*, Palo Alto, CA, USA) con ionizador por impacto de electrones (EI) 70 eV. Los índices de retención se determinaron en un columna, polar [DB-WAX de 60 m x 0.25 mm 0.25 μ m, con fase estacionaria entrecruzada e inmovilizada de poli(etilenglicol)] y una apolar [DB5-MS de 60 m x 0.25 mm 0.25 μ m con fase estacionaria de 5% poli(dimetilsiloxano)]. Así mismo, se usó el sistema de datos MS-ChemStation G1701-DA que incluye las librerías WILEY, NIST y QUADLIB 2007.

4. RESULTADOS

4.1 EFECTO GENOTÓXICO DE LOS EXTRACTOS

Los datos correspondientes a los ensayos de evaluación genotóxica de los extractos mediante SOS Chromotest son presentados en el Anexo 2. Ninguno de los extractos evaluados mostró incremento en los valores del *I* en las concentraciones evaluadas. Por el contrario, la mayoría de los extractos (excepto el RT 007 SFE) mostró una reducción significativa de la expresión basal β G, respecto al control negativo, sugiriendo potencial efecto inhibidor de la respuesta SOS en *E. coli*.

4.2 EFECTO ANTIGENOTÓXICO DE LOS EXTRACTOS

En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenido en los ensayos de antigenotoxicidad mediante SOS Chromotest para los cuatro extractos del género *Lippia* (SFE 042, SFE 008, RT 007 SFE, SFE 023), perteneciente a la familia Verbenaceae. En todos los casos, los extractos mostraron una reducción significativa del *I* respecto al control positivo, indicando que dichos extractos reducen el efecto genotóxico de la RUV. Las concentraciones biológicamente efectivas estuvieron entre 0.016 mg/ml y 1 mg/ml dependiendo del extracto. El potencial antigenotóxico de estos extractos fue como sigue: SFE 008 > SFE 042 > RT 007 SFE > SFE 023. El extracto SFE 008 mostró curvas de antigenotoxicidad frente a UVC claramente dependientes de la dosis ($R = 0.89$, $p < 0.05$) en un rango de siete concentraciones (0.250 - 0.004 mg/ml), sugiriendo que tal efecto es consecuencia de uno de los componentes del extracto. Por el contrario, los extractos SFE 042 y RT 007 SFE mostraron completa inhibición de la genotoxicidad únicamente a dosis altas (1.0 - .0250 mg/ml); pero la reducción de la genotoxicidad no fue dependiente de la dosis del extracto. Por último, aunque

significativa a dosis altas y con una clara relación dosis efecto ($R = 0.99$, $p < 0.05$), la reducción de la genotoxicidad mostrada por el extracto SFE 023 fue menor en magnitud y relativamente menos importante que en los anteriores extractos.

En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos en los ensayos de antigenotoxicidad para los cinco extractos de las especies vegetales pertenecientes a la familia Asteraceae (SFE 001, SFE 015, SFE 033, SFE 038, SFE 024). En todos los casos, los extractos mostraron significativa reducción del factor de inducción (I) indicando que dichos extractos reducen el efecto genotóxico de la RUV. Las concentraciones biológicamente efectivas estuvieron entre 0.004 mg/ml y 0.97 mg/ml dependiendo del extracto. El potencial antigenotóxico de los extractos fue como sigue: SFE 033 > SFE 015 > SFE 038 > SFE 001 > SFE 024. El efecto antigenotóxico de los extractos SFE 033 y SFE 015 mostraron una clara relación dosis-dependiente ($R = 0.91$ y 0.98 , $p < 0.05$) entre las concentraciones 0.968 - 0.004 mg/ml y 0.968 - 0.060 mg/ml respectivamente, sugiriendo que tal efecto se debe a uno de los componentes en el caso particular de cada extracto. Los extractos SFE 038, SFE 001 mostraron una clara reducción de la genotoxicidad dosis-dependiente ($R = 0.99$ y 0.95 , $p < 0.05$) menor en magnitud a los extractos anteriores pero no por ello menos importante. Finalmente la reducción de la genotoxicidad para el SFE 024 fue menor en magnitud y relativamente menos importante que los anteriores.

Finalmente, en la Tabla 4 se presentan los resultados obtenidos en la evaluación del efecto antigenotóxico de los extractos SFE 030, SFE 019, SFE 017 y RT 003 SFE pertenecientes a las especies *Persea Caerulea* (Lauraceae), *Solanum crotonifolium* (Solanaceae), *Bursera tomentosa* (Burseraceae) y *Bejaria aestuans* (Ericaceae) respectivamente. El potencial antigenotóxico de los extractos fue como sigue: SFE 030 > SFE 019 > RT 003 SFE > SFE 017. El extracto SFE 030 mostró completa inhibición de la genotoxicidad a dosis altas (1.0 - 0.50 mg/ml) y una clara relación dosis-efecto ($R = 0.82$, $p < 0.05$) entre las concentraciones 0.50 - 0.031 mg/ml, sugiriendo que dicho efecto se debe a uno de los componentes del

extracto. Por otra parte, el extracto SFE 019 evidenció una reducción significativa de la genotoxicidad por UVC en todas las dosis evaluadas, pero la reducción de la genotoxicidad no fue dependiente de la dosis del extracto. Para los extractos RT 003 SFE y SFE 017 no se evidenció un efecto antigenotóxico relevante contra la RUV.

Tabla 2. Efecto antigenotóxico de extractos de especies del género *Lippia* contra la genotoxicidad inducida por UVC en la cepa PQ-37 de *E. coli*.

Tratamientos	I^{\dagger} (%IG)			
	<i>Lippia origanoides</i> SFE 042	<i>Lippia origanoides</i> SFE 008	<i>Lippia origanoides</i> RT 007 SFE	<i>Lippia sp.</i> SFE 023
Agua destilada	1 ± 0.03	1 ± 0.0	1.02 ± 0.04	0.58 ± 0.03
UVC (20.28 J/m ²)	13.63 ± 0.63	11.6 ± 0.5	13.43 ± 0.97	11.29 ± 0.25
SFE (1.000 mg/ml)	0.42 ± 0.03	0.76 ± 0.03	1.02 ± 0.04	0.58 ± 0.03
SFE (1.000 mg/ml) + UVC	0.63 ± 0.04 (100)*	0.6 ± 0.0 (100)*	1.07 ± 0.04 (99)*	4.7 ± 0.25 (64)*
SFE (0.500 mg/ml) + UVC	0.69 ± 0.02 (100)*	0.6 ± 0.0 (100)*	1.1 ± 0.04 (99)*	6.84 ± 0.27 (43)*
SFE (0.250 mg/ml) + UVC	0.97 ± 0.02 (100)*	0.7 ± 0.1 (100)*	1.26 ± 0.05 (98)*	8.58 ± 0.28 (26)*
SFE (0.125 mg/ml) + UVC	11.93 ± 1.27 (13) n.s.	1.9 ± 0.2 (92)*	11.96 ± 0.87 (12) n.s.	11.55 ± 0.61 (0) n.s.
SFE (0.063 mg/ml) + UVC	16.27 ± 1.68 (0) n.s.	4.2 ± 0.4 (70)*	12.52 ± 0.43 (7) n.s.	11.05 ± 0.31 (2) n.s.
SFE (0.031 mg/ml) + UVC	16.40 ± 1.3 (0) n.s.	7.4 ± 0.7 (39)*	12.61 ± 0.67 (7) n.s.	9.57 ± 0.4 (17)*
SFE (0.016 mg/ml) + UVC	13.73 ± 0.64 (0) n.s.	9.4 ± 0.8 (26)*	12.88 ± 0.55 (4) n.s.	11.55 ± 0.32 (0) n.s.
SFE (0.008 mg/ml) + UVC	14.35 ± 1.35 (0) n.s.	10.2 ± 0.6 (13) n.s.	13.19 ± 0.55 (12) n.s.	10.98 ± 0.45 (3) n.s.
SFE (0.004 mg/ml) + UVC	10.79 ± 0.57 (22) n.s.	10.9 ± 0.6 (7) n.s.	12.67 ± 0.42 (6) n.s.	10.11 ± 0.29 (11) n.s.

Fuente: Autor

I^{\dagger} , valores promedio del factor de inducción SOS de un mínimo de tres experimentos independientes con cuatro réplicas cada uno ± su error estándar.

(%IG), porcentaje de inhibición de la genotoxicidad calculado como se indica en materiales y métodos.

*, reducción significativa ($p < 0.05$) con respecto al control positivo encontrada con la prueba de Dunnet.

n.s., no se encontró una reducción significativa de factor de inducción SOS (I).

Tabla 3. Efecto antígenotóxico de extractos de especies de la familia Asteraceae contra la genotoxicidad inducida por UVC en la cepa PQ-37 de *E. coli*.

Tratamientos	<i>I</i> [†] (%IG)				
	<i>Chromolena pelli</i> SFE 001	<i>Lourteigia</i> sp. SFE 015	<i>Baccharis</i> cf. <i>nitida</i> SFE 033	<i>Austroeupatorium inulifolium</i> SFE 038	<i>Wedelia calycina</i> SFE 024
Agua destilada	1 ± 0.03	1 ± 0.03	1 ± 0.03	1 ± 0.03	1 ± 0.02
UVC (20.28 J/m ²)	14.37 ± 0.41	16.35 ± 1.13	16.95 ± 0.8	14.46 ± 0.8	15.02 ± 1.12
SFE (0.968 mg/ml)	0.60 ± 0.03	0.66 ± 0.06	0.97 ± 0.05	0.89 ± 0.07	0.65 ± 0.02
SFE (0.968 mg/ml) + UVC	4.37 ± 0.21 (75)*	3 ± 0.17 (87)*	3.18 ± 0.41 (86)*	3.22 ± 0.22 (84)*	5.55 ± 0.19 (67)*
SFE (0.484 mg/ml) + UVC	6.61 ± 0.39 (58)*	7.38 ± 0.41 (58)*	4.21 ± 0.36 (80)*	7.71 ± 0.71 (50)*	10.21 ± 0.36 (34)*
SFE (0.242 mg/ml) + UVC	10.11 ± 0.24 (32)*	12.13 ± 0.46 (28)*	7.45 ± 0.54 (60)*	11.59 ± 1.38 (21) n.s.	10.42 ± 0.42 (33)*
SFE (0.121 mg/ml) + UVC	10.15 ± 0.48 (32)*	13.92 ± 0.59 (16) n.s.	8.9 ± 0.62 (50)*	12.84 ± 1.44 (12) n.s.	10.22 ± 0.56 (34)*
SFE (0.060 mg/ml) + UVC	14.16 ± 0.59 (0) n.s.	15.53 ± 1.23 (5) n.s.	10.8 ± 0.5 (38)*	15.23 ± 1.77 (0) n.s.	11.05 ± 0.76 (28)*
SFE (0.030 mg/ml) + UVC	14.4 ± 1.11 (0) n.s.	15.66 ± 1.01 (5) n.s.	12.71 ± 1.21 (26)*	16.07 ± 1.3 (0) n.s.	12.55 ± 0.61 (18)*
SFE (0.015 mg/ml) + UVC	14.46 ± 1.12 (0) n.s.	16.76 ± 0.55 (0) n.s.	13.02 ± 0.88 (25)*	15.26 ± 1.4 (0) n.s.	11.16 ± 0.49 (27)*
SFE (0.008 mg/ml) + UVC	14.09 ± 1.14 (0) n.s.	17.89 ± 1.4 (0) n.s.	13.33 ± 0.84 (23)*	15.39 ± 1.45 (0) n.s.	14.6 ± 0.94 (3) n.s.
SFE (0.004 mg/ml) + UVC	16.31 ± 0.8 (0) n.s.	13.53 ± 0.64 (18) n.s.	13.07 ± 1.19 (24)*	16.77 ± 1.39 (0) n.s.	12.73 ± 0.92 (16)*

Fuente: Autor

I[†], valores promedio del factor de inducción SOS de un mínimo de tres experimentos independientes con cuatro réplicas cada uno ± su error estándar.

(%IG), porcentaje de inhibición de la genotoxicidad calculado como se indica en materiales y métodos.

*, reducción significativa (p<0.05) con respecto al control positiva encontrada con la prueba de Dunnett.

n.s., no se encontró una reducción significativa de *I*.

Tabla 4. Efecto antigenotóxico de los extractos SFE 030, SFE 019, SFE 017 y RT 003 SFE contra la genotoxicidad inducida por UVC en la cepa PQ-37 de *E. coli*.

Tratamientos	<i>I</i> [†] (%IG)			
	<i>Persea Caerulea</i> (Lauraceae) SFE 030	<i>Solanum</i> <i>crotonifolium</i> (Solanaceae) SFE 019	<i>Bursera</i> <i>tomentosa</i> (Burseraceae) SFE 017	<i>Bejaria aestuans</i> (Ericaceae) RT 003 SFE
Agua destilada	1 ± 0.03	1 ± 0.06	1 ± 0.02	1 ± 0.03
UVC (20.28 J/m ²)	17.88 ± 1.01	9.97 ± 0.63	13.97 ± 0.87	15.92 ± 0.72
SFE (1.000 mg/ml)	0.56 ± 0.03	0.57 ± 0.02	0.72 ± 0.09	0.5 ± 0.01
SFE (1.000 mg/ml) + UVC	0.7 ± 0.04 (100)*	4.43 ± 0.27 (62)*	12.32 ± 0.63 (13) n.s	8.97 ± 0.69 (47)*
SFE (0.500 mg/ml) + UVC	1.07 ± 0.09 (100)*	4.09 ± 0.23 (66)*	13.03 ± 0.35 (7) n.s	13.56 ± 0.67 (16) n.s
SFE (0.250 mg/ml) + UVC	2.44 ± 0.2 (91)*	4.15 ± 0.25 (65)*	14.00 ± 0.72 (0) n.s	17.43 ± 0.79 (0) n.s
SFE (0.125 mg/ml) + UVC	4.2 ± 0.43 (81)*	5.63 ± 0.3 (48)*	14.13 ± 0.55 (0) n.s	17.03 ± 0.83 (0) n.s
SFE (0.063 mg/ml) + UVC	9.93 ± 0.54 (47)*	7.03 ± 0.44 (33)*	14.07 ± 0.7 (0) n.s	17.65 ± 0.89 (0) n.s
SFE (0.031 mg/ml) + UVC	14.06 ± 0.38 (23)*	6.99 ± 0.5 (33)*	14.55 ± 0.63 (0) n.s	19.59 ± 1.57 (0) n.s
SFE (0.016 mg/ml) + UVC	16.15 ± 0.72 (10) n.s.	7.1 ± 0.2 (32)*	14.40 ± 0.69 (0) n.s	19.5 ± 1.37 (0) n.s
SFE (0.008 mg/ml) + UVC	15.88 ± 1.14 (12) n.s.	6.97 ± 0.5 (33)*	15.22 ± 0.62 (0) n.s	14.82 ± 0.72 (7) n.s
SFE (0.004 mg/ml) + UVC	12.4 ± 0.21 (35)*	7.16 ± 0.4 (30)*	15.17 ± 0.72 (0) n.s	14.6 ± 0.69 (9) n.s

Fuente: Autor

I[†], valores promedio del factor de inducción SOS de un mínimo de tres experimentos independientes con cuatro réplicas cada uno ± su error estándar.

(%IG), porcentaje de inhibición de la genotoxicidad calculado como se indica en materiales y métodos.

*, reducción significativa ($p < 0.05$) con respecto al control positivo encontrada con la prueba de Dunnet.

n.s., no se encontró una reducción significativa de *I*.

4.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS

Los compuestos identificados mediante un análisis por GC-MS en los extractos de especies del género *Lippia* (excepto para el extracto RT 007 SFE), son presentados en la Tabla 5. Para los extractos SFE 042, SFE 008 y SFE 023 se identificaron 11, 16 y 22 compuestos de los cromatogramas correspondientes; los cuales representan el 82, 94 y 36% de sus constituyentes, respectivamente. Se

observó que estos extractos comparten aproximadamente el 15% de sus constituyentes. Ellos contienen una mayor proporción de hidrocarburos sesquiterpénicos (28.57%), seguidos de hidrocarburos monoterpénicos (18.37%) y triterpénicos (16.33%). Los análisis de composición química muestran que los compuestos mayoritarios son carvacrol (56.96%) y p-Cimeno (19.44%) en el extracto SFE 042, pinocembrina (54.89%) y trans- β -cariofileno (10.94%) en el extracto SFE 008 y, hidrocarburos triterpénicos no identificados en el extracto SFE 023 [N.I., IRL=3391 (25.68%) N.I., IRL= 3482 (32.31%)].

La caracterización química de los cinco extractos de las especies correspondientes a la familia Asteraceae mediante GC-MS son presentados en la Tabla 6. Para los SFE 001, SFE 015, SFE 033, SFE 038 y SFE 024 se identificaron 21, 17, 16, 17 y 12 compuestos que representan el 43, 38, 31, 13 y 40% de los constituyentes, respectivamente. Se observó que estos extractos comparten aproximadamente el 20% de sus constituyentes. Los extractos de la familia Asteraceae muestran altos porcentajes de hidrocarburos triterpénicos (54.22%) seguido de otros no identificados (30.12%). Los compuestos mayoritarios de los extractos son como sigue: SFE 001, un hidrocarburo triterpénico no identificado IRL = 3420 (38.34%), SFE 015 Norolean-12-ene (32.42%) y β -Amirin (19.5%), SFE 033 un hidrocarburo triterpénico no identificado IRL = 3497 (29.3%) y α -Eudesmol (17.4%), SFE 038 un hidrocarburo triterpénico con IRL = 3586 (18.92%) y, SFE 024 Norolean-12-ene (36.74%) y β -Amirin (22.33%). La caracterización química de los extractos RT 007 SFE, SFE 030, SFE 19, RT 003 SFE y SFE 17 no fue conclusiva y por tal motivo no se presenta.

Tabla 5. Composición química de los extractos con CO₂ supercrítico de especies vegetales del género *Lippia* (Verbenaceae) por GC-MS.

No.	Compuesto	Tipo ^x	IRL	Área relativa (%) [†]		
				<i>Lippia organoides</i> SFE 042	<i>Lippia organoides</i> SFE 008	<i>Lippia</i> sp. SFE 023
1	β-Mirceno	HM	989	1.64		
2	α-Felandreno	HM	1010		0.92	
3	α-Terpineno	HM	1020	0.85		
4	p-Cimeno	HM	1028	19.44	6.22	
5	Limoneno	HM	1033		1.05	
6	β-Felandreno	HM	1036		0.67	
7	1,8-Cineol	MO	1037		3.54	
8	γ-Terpineno	HM	1062	9.48	0.83	
9	Borneol	MO	1180		0.56	
10	Timil metil éter	CO	1231	1.83		
11	Timol	CO	1290	4.12	4.62	
12	Carvacrol	CO	1302	56.96	6.29	
13	α-Copaeno	HS	1386		0.85	0.79
14	N.I.	O	1396			1.02
15	trans-β-Cariofileno	HS	1434	3.21	10.94	6.11
16	α-Humuleno	HS	1470	1.40	4.60	0.55
17	N.I.	O	1479	0.64		
18	γ-Muuroleno	HS	1486		0.78	
19	Germacreno D	HS	1493			3.77
20	N.I.	O	1507			1.69
21	γ-Cadineno	HS	1527			0.72
22	δ-Cadineno	HS	1528		1.32	
23	cis-Calameno	HS	1532			0.64
24	Espatuleno	SO	1591			0.72
25	Óxido de cariofileno	SO	1598			1.19
26	N.I.	O	1674		1.34	
27	Pinocembrina [‡]	SO	-		54.89	
28	N.I.	HT	3337			6.46
29	C ₃₀ H ₄₈ O	HT	3344			10.30
30	N.I.	HT	3352			11.04
31	N.I.	HT	3391			25.68
32	N.I.	HT	3449			2.06
33	N.I.	HT	3468			2.35
34	N.I.	HT	3482			23.31
Hidrocarburos monoterpénicos (HM)				36.4	31.3	0.0
Monoterpenos oxigenados (MO)				0.0	12.5	0.0
Compuestos oxigenados (CO)				27.3	12.5	0.0
Hidrocarburos sesquiterpénicos (HS)				27.3	31.3	27.3
Sesquiterpenos oxigenados (SO)				0.0	6.3	9.1
Hidrocarburos triterpénicos (HT)				0.0	0.0	36.4
No identificados (O)				9.1	6.3	27.3

Fuente: Autor

No., el orden de elución está dado por una columna DB-5. †, la pinocembrina fue ubicada por los tiempos de retención (datos no mostrados).

ℵ, tipo de compuesto (%): hidrocarburos monoterpénicos (HM), monoterpenos oxigenados (MO), compuestos oxigenados (CO), hidrocarburos sesquiterpénicos (HS), sesquiterpenos oxigenados (SO), hidrocarburos triterpénicos (HT), no identificados (O).

IRL, valores del índice de retención lineal calculados a partir de tres cromatogramas independientes. Los compuestos con índices de retención por encima de 3000, corresponden a triterpenos.

†, únicamente se consideraron los componentes cuya cantidad relativa fue mayor al 1%. **N.I.**, compuesto no identificado.

Tabla 6. Composición química de los extractos con CO2 supercrítico de especies de la familia Asteraceae por GC-MS.

No	Compuesto	Tipo ^x	IRL	Área relativa (%) [†]				
				<i>Chromole na pelli</i>	<i>Lourteigi a sp.</i>	<i>Bacchar is cf. nitida</i>	<i>Austroeupatori um inulifolium</i>	<i>Wedeli a calycin a</i>
				SFE 001	SFE 015	SFE 033	SFE 038	SFE 024
1	N.I. [†]	O	-		1.01			
2	N.I. [†]	O	-		1.88			
3	Limoneno	HM	1032		1.37			
4	<i>trans</i> -β-Cariofileno	HS	1433	1.15				
5	α-Cariofileno	HS	1468	1.14				
6	N.I.	O	1486	1.17				
7	Germacreno D	HS	1493	2.83				
8	N.I.	O	1495	1.34	0.80			
9	β-Selineno	HS	1502			1.0		
10	γ-Cadineno	HS	1527		0.57			
11	N.I.	O	1573	1.44				
12	Espatulenol	SO	1592	1.20		1.3		
13	Óxido de cariofileno	SO	1598	4.77	0.81	1.2		
14	N.I.	O	1672	1.24				
15	α-Eudesmol	SO	1675			17.4		
16	N.I.	O	1827	1.23				
17	1-(1,1-dimetiletil)-7-metoxi naftaleno	CO	1852	0.96				
18	N.I.	O	1855	5.61				
19	N.I.	O	1884		0.65			0.51
20	N.I.	O	1896	2.37				
21	N.I.	O	1943	2.08				
22	N.I.	O	2114	1.96				
23	N.I.	O	2310		1.01			0.75
24	N.I.	O	2480					0.46
25	N.I.	O	2575				0.54	
26	N.I.	O	2683				4.51	
27	N.I.	O	2807			0.7		
28	Escualeno	HT	2815	5.57	3.50	1.1		1.78
29	N.I.	O	2847			4.0		
30	N.I.	HT	3103				3.96	
31	N.I.	HT	3135				6.22	
32	N.I.	HT	3268			1.2		
33	N.I.	HT	3273		1.41			
34	N.I.	HT	3284			1.4		
35	N.I.	HT	3341			2.3		
36	C ₃₀ H ₄₈ O	HT	3345		12.76		6.47	18.45
37	N.I.	HT	3373			1.4		
38	β-Amirin	HT	3377	5.53	19.50		6.49	22.33
39	N.I.	HT	3388			8.9		
40	N.I.	HT	3389	7.33				12.61
41	N.I.	HT	3390				10.42	
42	N.I.	HT	3391		10.57			
43	N.I.	HT	3418			15.9	6.65	

44	N.I.	HT	3419					1.74
45	C ₃₀ H ₅₀ O	HT	3420	38.34	5.54			
46	N.I.	HT	3430			1.9		
47	N.I.	HT	3445				1.79	
48	N.I.	HT	3450			10.8		
49	Norolean-12-ene	HT	3453	4.84	32.42		8.52	36.74
50	N.I.	HT	3468				1.02	
51	N.I.	HT	3481				4.85	
52	N.I.	HT	3494	7.87				3.81
53	N.I.	HT	3495		5.93			
54	N.I.	HT	3497			29.3		
55	N.I.	HT	3498				14.76	
56	N.I.	HT	3510				1.92	
57	N.I.	HT	3572				2.72	
58	N.I.	HT	3586				18.92	
Hidrocarburos monoterpénicos (HM)				0.0	5.9	0.0	0.0	0.0
Monoterpenos oxigenados (MO)				0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Compuestos oxigenados (CO)				4.8	0.0	0.0	0.0	0.0
Hidrocarburos sesquiterpénicos (HS)				14.3	5.9	6.3	0.0	0.0
Sesquiterpenos oxigenados (SO)				9.5	5.9	18.8	0.0	0.0
Hidrocarburos triterpénicos (HT)				28.6	47.1	62.5	82.4	58.3
No identificados (O)				42.9	35.3	12.5	17.6	41.7

Fuente: Autor

No., el orden de elución está dado por una columna DB-5. †, la pinocembrina fue ubicada por los tiempos de retención (datos no mostrados).

№, tipo de compuesto (%): hidrocarburos monoterpénicos (HM), monoterpenos oxigenados (MO), compuestos oxigenados (CO), hidrocarburos sesquiterpénicos (HS), sesquiterpenos oxigenados (SO), hidrocarburos triterpénicos (HT), no identificados (O).

IRL, valores del índice de retención lineal calculados a partir de tres cromatogramas independientes. Los compuestos con índices de retención por encima de 3000, corresponden a triterpenos.

†, únicamente se consideraron los componentes cuya cantidad relativa fue mayor al 1%. **N.I.**, compuesto no identificado.

5. DISCUSIÓN

El presente trabajo estuvo enfocado en el análisis del efecto antígenotóxico frente al daño genético ocasionado por la RUV y la caracterización química de extractos de plantas de las familias Verbenaceae, Asteraceae, Lauraceae, Solanaceae, Ericaceae y Burseraceae. Los extractos SFE 001, SFE 015, SFE 038 (Asteraceae), RT 003 SFE (Ericaceae) y SFE 017 (Burseraceae) no evidenciaron un efecto antígenotóxico relevante contra la RUV, por esta razón no serán abordados en la discusión.

Para la familia Verbenaceae, los extractos que mostraron el mejor efecto antígenotóxico, en términos de magnitud, fueron SFE 008 > SFE 042 > RT 007 SFE. Estos extractos corresponden a la especie *Lippia origanoides* que es un arbusto aromático que se distribuye desde el sur de Norte América hasta el norte de América del Sur (Oliveira, Leitão, Fernandes & Leitão, 2014). En Colombia, esta especie se encuentra ampliamente distribuida en zonas semiáridas caracterizadas por suelos secos, pobres en nutrientes y de alta incidencia lumínica (Albesiano, Rangel-Ch & Cadena, 2003). Diferentes trabajos apoyan el uso de *L. origanoides* en la medicina tradicional debido a la actividad antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antiviral y antiprotozoaria que presenta esta especie (dos Santos et al., 2004; D Oliveira et al., 2007; Pinto et al., 2013; Stashenko & Ruiz, 2007).

Basados en la composición química de los aceites esenciales de *L. origanoides*, diferentes quimiotipos se han reportado en Brasil, Venezuela y Colombia (dos Santos et al., 2004; Oliveira et al., 2007; Rojas-Graü et al., 2007; Stashenko & Ruiz, 2007). Para Colombia se han identificado al menos tres quimiotipos: quimiotipo A rico en felandreno, p-cimeno, limoneno, cariofileno y α -humuleno, quimiotipo B rico en carvacrol y quimiotipo C rico en timol (Stashenko et al., 2010,

2013). Cuando la extracción con CO₂ supercrítico fue utilizada para evaluar la composición química de los especímenes de *L. origanoides*, los quimiotipos B y C mostraron una composición similar a los correspondientes para los aceites esenciales en tanto que el quimiotipo A muestra una alta concentración de pinocembrina y cariofileno. De acuerdo con la clasificación descrita anteriormente, el extracto SFE 042 corresponde al quimiotipo B, rico en carvacrol (56.96%) y el extracto SFE 008 al quimiotipo A, rico en pinocembrina y cariofileno (54.89 y 10.94%, respectivamente). Estos resultados resaltan la importancia de implementar diferentes técnicas extractivas con el fin de obtener un panorama más real de los diferentes metabolitos presentes en una muestra.

Este trabajo reporta por primera vez el efecto antigenotóxico (fotoprotector) de los extractos de *L. origanoides* frente a la RUV. Los extractos evaluados (SFE 008, SFE 042 y RT 007 SFE) reducen significativamente el daño genético provocado por UVC en la cepa PQ-37 de *E. coli*. Este efecto podría estar relacionado con los compuestos mayoritarios de cada extracto; carvacrol (SFE 042) y pinocembrina (SFE 008). La cepa PQ-37 de *E. coli* es un modelo que permite la evaluación *in vitro* del potencial fotoprotector de extractos de plantas aromáticas contra el daño genético inducido por la radiación UV (Fuentes & Alonso, 2006; Quillardet & Hofnung, 1984). A diferencia de la cepa silvestre (*uvr⁺*), la cepa mutante PQ-37 (ver marco teórico) es deficiente en el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (*uvrA*) lo que la hace sensible al daño ocasionado sobre el ADN por la RUV (Quillardet & Hofnung, 1984; Sancar & Rupp, 1983; Sancar, Wharton & Seltzer, 1981). Es ampliamente aceptado que la radiación UV provoca alteraciones tanto a nivel cutáneo como genético; dentro de estas alteraciones se destaca el desbalance en el sistema antioxidante y la formación de fotoproductos diméricos en el ADN (Hussein, 2005; Ravanat et al., 2001; Rosenblat et al., 2011). Los aceites esenciales de *L. origanoides* poseen una fuerte actividad antioxidante (Stashenko & Ruiz, 2007). Este efecto antioxidante, tanto de *L. origanoides* como de otras especies del género, ha sido relacionado con la presencia de carvacrol y

timol en sus aceites esenciales (Lagouri, Blekas, & Tsimidou, 1993; Stashenko & Ruiz, 2007). Puesto que, estos compuestos reducen significativamente las roturas de cadena sencilla del ADN producidas por agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno (Slameňová, Horváthová, Šramková & Maršálková, 2007). Con base en esto, se podría esperar que la actividad antígenotóxica del extracto SFE 042, rico en carvacrol (~57%), ocurra por captación de radicales libres y por una reducción en la producción de fotoproductos diméricos, como los DPC y 6-4 PP, provocados principalmente por la UVB y UVC. Adicionalmente, el timol, carvacrol y extractos de plantas aromáticas ricos en estos compuestos (i.e., *Origanum compactum*, *Origanum onites* and *Thymus spicata*) han mostrado actividad antígenotóxica contra mutágenos conocidos como 4-nitro-o-fenilendiamina (4-N-O-P), 2-aminofluoreno (2-AF), 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]-quinolina (IQ), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), mitomicina C (MMC), uretano y radiación γ (Archana, Nageshwar, & Satish, 2011; Aydin, Bařaran, & Bařaran, 2005; Horvathova, Turcaniova, & Slamenova, 2007; Ipek et al., 2005; Mezzoug et al., 2007; Slameňová et al., 2007).

Por otra parte, estudios recientes mostraron que la pinocembrina atenúa significativamente los procesos inflamatorios inducidos por lipopolisacáridos (LPS) en modelos de ratón *in vitro* e *in vivo* a través de la regulación de factores moleculares como el TNF- α , IL-1 β , IL-6 y IL-10 (Soromou et al., 2012). La pinocembrina es uno de los fitoquímicos más importantes entre los flavonoides incorporados a la industria farmacéutica y dentro de sus actividades biológicas se destacan la antioxidante, antimicrobiana, antiparasitaria, antiinflamatoria y antitumoral (Rasul et al., 2013).

Numerosos estudios soportan el uso del carvacrol y la pinocembrina como agentes quimioterapéuticos para diferentes líneas tumorales. Se ha comprobado que el carvacrol evita el crecimiento, *In vitro* e *in vivo*, del melanoma B16 en modelos de mamíferos (He, Mo, & Hadisusilo, 1997). Inhibe la viabilidad y la

proliferación de las células del carcinoma epidermoide humano, Hep-2, probablemente activando los mecanismos de la muerte celular programada o apoptosis (Stammati et al., 1999). Mecanismos de acción similar fueron descritos recientemente para los efectos antiproliferativos del carvacrol en las células metastásicas del cáncer de mama, MDA-MB231, y para las líneas celulares del carcinoma hepatocelular humano, HepG-2 (Arunasree, 2010; Yin et al., 2012). Adicionalmente, se ha encontrado que el carvacrol presenta actividad antitumoral para líneas celulares de cáncer de pulmón, del leiomioma y las células de leucemia mieloide crónicas (Horvathova et al., 2007; Karkabounas et al., 2006; Koparal & Zeytinoglu, 2003). Uno de los mecanismos por los cuales diversos fármacos anticancerígenos inhiben el crecimiento de células cancerígenas es a través de la activación de los mecanismos de la muerte celular programada. Se ha demostrado que el tratamiento con pinocembrina en líneas celulares de cáncer de colon (HCT116) y en células de leucemia promielocítica humana (HL-60) induce la apoptosis a través de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial. Así mismo, se han reportado efectos citotóxicos en líneas celulares de fibroblastos de pulmón humano (LF-1) y de cáncer cervical (Hsu, Yu & Yen, 2010; Kumar, Nair, Hema, Mohan & Santhoshkumar, 2007). El carvacrol y la pinocembrina presentan un potencial terapéutico de alto espectro que podría explicar la disminución de la respuesta SOS en los extractos de *L. origanoides*, lo cual a su vez, está relacionado con la disminución del daño genético causado por la RUV en *E. coli*.

Para la familia Asteraceae, los extractos SFE 033 y SFE 024, correspondientes a las especies *Baccharis* cf. *nítida* y *Wedelia calycina* (Tabla 3), evidenciaron la mayor actividad antigenotóxica. Aunque estos extractos no presentaron inhibición total de la respuesta SOS ante el daño por UVC, mostraron una disminución significativa de la respuesta SOS en una clara relación de dosis-efecto. Esto sugiere que la actividad antigenotóxica en la familia podría estar relacionada con un compuesto del extracto. El género *Baccharis* se distribuye exclusivamente en América, extendiéndose desde el sur de América del Norte hasta el norte de Sur

América. En esta área se encuentra una gran diversidad de especies que ocupan distintos ambientes (Giuliano, 2001). Las especies del género *Baccharis* son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional en América del Sur, para el tratamiento de alteraciones gastrointestinales y hepáticas (Schmeda-Hirschmann & Bordas, 1990). Los efectos benéficos de algunas especies del género han sido atribuidos, en parte, a su actividad antioxidante y de eliminación de radicales libres; debidas probablemente a su amplio contenido en compuestos fenólicos y flavonoides (Brighente, Dias, Verdi, & Pizzolatti, 2007; Melo et al., 2001; Tapia et al., 2004). Adicionalmente, se han reportado para el género actividades antimicrobianas, insecticidas, repelentes, antiprotozoarias y antigenotóxica frente a mutágenos conocidos como el peróxido de hidrógeno y 3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3-b]-indol (Betoni, Passarelli, Nunes, Di Stasi, & Fernandes, 2006; García, Donadel, Ardanaz, Tonn, & Sosa, 2005; Gillij, Gleiser, & Zygadlo, 2008; Nakasugi & Komai, 1998; Rodrigues et al., 2009; Shima et al., 2005). Los análisis fitoquímicos del extracto SFE 033 presentan un alto contenido de hidrocarburos que no pudieron ser identificados, por esta razón no se puede establecer cuál es el compuesto que podría estar implicado en la actividad antigenotóxica aquí evaluada.

Dentro del género *Wedelia* se encuentran aproximadamente 60 especies, que se distribuyen en regiones templadas y tropicales. Algunas especies del género presentan propiedades antimicrobianas, antifúngicas, insecticidas, antipiréticas, analgésicas, bactericidas, hepatoprotectoras, hipoglicemiantes, molusquicidas, antinociceptivas, antioxidantes, cicatrizantes y antitumorales (Buitrago, Morales, Rojas, & Meléndez, 2012; Li, Dong, Liu, Shi, & Kiyota, 2007). Se ha reportado una alta concentración de hidrocarburos sesquiterpénicos en los aceites esenciales de este género (Buitrago et al., 2012). Sin embargo, para el extracto de *Wedelia calycina* evaluado en el presente trabajo se encontró una alta concentración de hidrocarburos triterpénicos (58.3%) no identificados.

Los extractos SFE 030 y SFE 019, pertenecientes a las especies *Persea caerulea* (Lauraceae) y *Solanum crotonifolium* (Solanaceae), evidenciaron una clara acción antigenotóxica frente a la RUV. Sus actividades se describen a través de curvas dependientes de la dosis; razón por la cual su relación antigenotóxica podría estar relacionada con un compuesto del respectivo extracto. *P. caerulea*, conocida popularmente como aguacatillo, está ampliamente distribuida en el Neotrópico, no obstante, es poco lo que se conoce acerca del su potencial biológico y su composición fitoquímica. Hasta la fecha se conoce que su extracto etanólico posee 100% de actividad acaricida y que los aceites esenciales de su fruto evidencian una significativa acción antiparasitaria (Arévalo et al 2009; cuca-Suárez et al. 2012). Las características fitoquímicas de esta especie han sido descritas únicamente para sus aceites esenciales a través de GC y GC-MS. De manera sobresaliente la especie *P. americana*, congénere de *P. caerulea* y conocida popularmente como aguacate, ha sido una de las más estudiadas debido a su amplio consumo y su uso con propósitos medicinales. Se ha encontrado que los fitoquímicos extraídos de la fruta inducen selectivamente la detección del ciclo celular y la apoptosis en líneas de células precancerosas y cancerosas (Ding, Chin, Kinghorn, & D'Ambrosio, 2007). Gracias a la variedad de fitoquímicos y nutrientes esenciales que contiene el aguacate su consumo proporciona soporte a la salud cardiovascular y al control de peso (Dreher & Davenport, 2013). Sus alcoholes grasos polihidroxilados (PFA, por sus siglas en inglés) juegan un rol importante como agentes antiinflamatorios y fotoprotectores en el daño a la piel inducido por la RUV (Rosenblat et al., 2011). Por otra parte, el género *Solanum* consta de aproximadamente 2.000 especies. Sus hábitos van desde hierbas, arbustos hasta pequeños árboles. Su distribución es exclusivamente de Centro y Sur América con una amplia distribución que va desde el trópico hasta zonas templadas (Magoon, Ramanujam, & Cooper, 1962). Para la especie *Solanum crotonifolium* no se encuentra información acerca de su uso tradicional y/o de la actividad biológica de sus extractos y aceites. No obstante, para algunas especies del género (*S. pseudocapsicum*, *S. torvum*, *S. aculeastrum*, *S. torvum*) se han

reportado una amplia variedad de actividades, dentro de ellas se destacan la actividades antifúngica, antibacterial, antiviral, antioxidante y anticancerígena (Aliero, Grierson, & Afolayan, 2006; Arthan et al., 2002; Badami, Manohara, Kumar, Vijayan, & Suresh, 2003; Bari, Islam, Khan, & Mandal, 2010; Koduru, Grierson, & Afolayan, 2006).

6. CONCLUSIONES

Los extractos evaluados no evidenciaron efecto genotóxico en la cepa PQ-37 de *E. coli*. Por el contrario, en todos los casos, se observó una reducción significativa de la expresión basal β G, respecto al control negativo, sugiriendo un potencial efecto inhibidor de la respuesta SOS en *E. coli*.

Los resultados del presente trabajo proporcionan evidencia del potencial quimiopreventivo/fotoprotector de los quimiotipos de *L. origanoides* (Verbenaceae) ricos en carvacrol, pinocembrina y para el quimiotipo del extracto RT 007 SFE – que no pudo ser determinado ya que la composición química no fue concluyente–, así como para el extracto SFE 030 de *P. caerulea* (Lauraceae). En menor medida, los extractos de las especies *Baccharis* cf. *Nítida*, *Wedelia calycina* (Asteraceae) y *Solanum crotonifolium* (Solanaceae) evidenciaron efecto fotoprotector contra el daño genético de la RUV.

Este trabajo apoya la utilidad del ensayo SOS Chromotest en la evaluación del potencial fotoprotector de extractos de plantas; e impulsa la bioprospección de la flora colombiana que contribuya a la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica.

7. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios confirmatorios de la actividad antígenotóxica de los componentes mayoritarios de los extractos, como fueron los casos del carvacrol y la pinocebrina.

Se recomienda evaluar la genotoxicidad y antígenotoxicidad de los extractos y compuestos mayoritarios en otros ensayos, *in vitro* e *in vivo*, que evalúen diferentes niveles de daño y protección en el ADN.

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA, Á., FIERRO, E., VELÁSQUEZ, V., & RUEDA, X.. Melanoma: patogénesis, clínica e histopatología. *Revista Asociación Colombiana Dermatológica*, (2009). Vol. 17(2), Pág. 87–108.

ALBESIANO, S., RANGEL-CH, J., & CADENA, A.. La vegetación del cañón del río Chicamocha (Santander, Colombia). *Caldasia*, (2003). Vol 25(1), Pág. 73–99.

ALIERO, A., GRIERSON, D., & AFOLAYAN, A.. Antifungal activity of *Solanum pseudocapsicum*. *Research Journal of Botany*, (2006). Vol 1(3), Pág. 129–133.

ARCHANA, P., NAGESHWAR, B., & SATISH, B.. In vivo radioprotective potential of thymol, a monoterpene phenol derivative of cymene. *Mutation Research*, (2011). Vol. 726(2), Pág. 136–45.

ARTHAN, D., SVASTI, J., KITTAKOOP, P., PITTAYAKHACHONWUT, D., TANTICHAROEN, M., & THEBTARANONTH, Y.. Antiviral isoflavonoid sulfate and steroidal glycosides from the fruits of *Solanum torvum*. *Phytochemistry*, (2002). Vol. 59(4), Pág. 459–463.

ARUNASREE, K. M.. Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, (2010). Vol. 17(8-9), Pág. 581–8.

AYDIN, S., BAŞARAN, A., & BAŞARAN, N.. The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. *Mutation Research*, (2005). Vol. 581(1-2), Pág. 43–53.

BADAMI, S., MANOHARA, S., KUMAR, E., VIJAYAN, P., & SURESH, B.. Antitumor activity of total alkaloid fraction of *Solanum pseudocapsicum* leaves. *Phytotherapy Research*, (2003). Vol. 17, Pág. 1001–1004.

BARI, M., ISLAM, W., KHAN, A., & MANDAL, A.. Antibacterial and antifungal activity of *Solanum torvum* (Solanaceae). *International Journal of Agriculture and Biology*, (M), (2010) Pág. 386–390.

BETONI, J., PASSARELLI, R., NUNES, L., DI STASI, L., & FERNANDES, A. (2006). Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz de Janeiro*, Vol. 101(4), Pág. 387–390.

BRIGHENTE, I., DIAS, M., VERDI, L., & PIZZOLATTI, M.. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Some Brazilian Species. *Pharmaceutical Biology*, (2007). Vol. 45(2), Pág. 156–161.

BUITRAGO, D., MORALES, A., ROJAS, L., & MELÉNDEZ, P.. Estudio de los componentes volátiles de *Wedelia calycina* Rich. (Asteraceae). *Revista de La Facultad de Farmacia.*, (2012). Vol. 54(1), Pág. 3–6.

CASADABAN, M., & COHEN, S.. Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage: in vivo probe for transcriptional control sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (1979). Vol. 76(9), Pág. 4530–4533.

DE FLORA, S.. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research*, (1998). Vol. 402(1-2), Pág. 151–158.

DE FLORA, S., & FERGUSON, L. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutation Research*, (2005). Vol. 591(1-2), Pág. 8–15.

DE FLORA, S., & RAMEL, C.. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview. *Mutation Research*, (1988). Vol. 202, Pág. 285–306.

DE GRUIJL, F. R.. Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, (2002). Vol. 15(5), Pág. 316–20.

DIFFEY, B.. Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods*, (2002). Vol. 28(1), Pág. 4–13.

DOS SANTOS, F., LOPES, J., CITO, A., DE OLIVEIRA, E., DE LIMA, S., & REIS, F.. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia origanoides* HBK. *Journal of Essential Oil Research*, (2004). Vol. 16, Pág. 504–506.

ECHOLS, H., & GOODMAN, M.. Mutation induced by DNA damage: a many protein affair. *Mutation Research/DNA Repair*, (1990). Vol. 236(2-3), Pág. 301–311.

FABRICANT, D., & FARNSWORTH, N.. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, (2001). Vol. 109(1), Pág. 69–75.

FARNSWORTH, N. R., AKERELE, O., BINGEL, A. S., SOEJARTO, D. D., & GUO, Z.. Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the World Health Organization*, (1985). Vol. 63(6), Pág. 965–981.

FUENTES, J., & ALONSO, A.. Usefulness of the SOS Chromotest in the study of medicinal plants as radioprotectors. *International Journal of Radiation Biology*, (2006). Vol. 82(5), Pág. 323–329.

FUENTES, J., VERNHE, M., CUETARA, E., SÁNCHEZ-LAMAR, A., SANTANA, J., & LLAGOSTERA, M.. Tannins from barks of *Pinus caribaea* protect *Escherichia coli* cells against DNA damage induced by gamma-rays. *Fitoterapia*, (2006). Vol. 77(2), Pág. 116–120.

GANESAN, A.. The impact of natural products upon modern drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, (2008) Vol. 12(3), Pág. 306–17.

GARBE, C., & LEITER, U.. Melanoma epidemiology and trends. *Clinics in Dermatology*, (2009) Vol. 27(1), Pág. 3–9.

GARCÍA, M., DONADEL, O., ARDANAZ, C., TONN, C., & SOSA, M.. Toxic and repellent effects of *Baccharis salicifolia* essential oil on *Tribolium castaneum*. *Pest Management Science*, (2005). Vol. 61(6), Pág. 612–618.

GILABERTE, Y., & GONZÁLEZ, S.. Update on Photoprotection. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, (2010). Vol. 101(8), Pág. 659–672.

GILLIJ, Y., GLEISER, R., & ZYGADLO, J.. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresource Technology*, (2008). Vol. 99(7), Pág. 2507–2515.

GIULIANO, D.. Clasificación infragenérica de las especies argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). *Darwiniana*, (2001) Vol. 39(1-2), Pág. 131–154.

GONZÁLEZ, M., Vernhe, M., & Sánchez, Á.. LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA. SU EFECTO DAÑINO Y CONSECUENCIAS PARA LA SALUD HUMANA. *Theoria*, (2009). Vol. 18(2), Pág. 69–80.

GONZÁLEZ, S., Fernández, M., & Gilaberte, Y.. The latest on skin photoprotection. *Clinics in Dermatology*, (2008) Vol. 26, Pág. 614–626.

GU, M., Singh, R., Dhanalakshmi, S., Agarwal, C., & Agarwal, R.. Silibinin inhibits inflammatory and angiogenic attributes in photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice. *Cancer Research*, (2007) Vol. 67(7), Pág. 3483–3491.

HALLIDAY, G., Norval, M., Byrne, S., Huang, X., & Wolf, P.. The effects of sunlight on the skin. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, (2008) Vol. 5(2), Pág. 201–209.

HARVEY, A.. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, (2008) Vol. 13(19-20), Pág. 894–901.

HE, L., Mo, H., & HADISUSILO, S.. Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas in vitro and in vivo. *Journal of Nutrition*, (September 1996), Pág. 668–674.

HORVATHOVA, E., TURCANIOVA, V., & SLAMENOVA, D.. Comparative study of DNA-damaging and DNA-protective effects of selected components of essential plant oils in human leukemic cells K562. *Neoplasma*, (2007). Pág. 478–483.

HSU, C., YU, Y., & YEN, G.. Anticancer effects of *Alpinia pricei* Hayata roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2010). Vol. 58(4), Pág. 2201–8.

HUISMAN, O., & D'ARI, R.. An inducible DNA replication–cell division coupling mechanism in *E. coli*. *Nature*, (1981) Vol. 290(5809), Pág. 797–799.

HUSSEIN, M.. Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. *Journal of Cutaneous Pathology*, (2005) Vol. 32, Pág. 191–205.

IPEK, E., ZEYTINOGLU, H., OKAY, S., TUYLU, B., KURKCUOGLU, M., & BASER, K.. Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chemistry*, (2005). Vol. 93(3), Pág. 551–556.

KADA, T., & SHIMOI, K. Desmutagens and bio-antimutagens-their modes of action. *BioEssays*, (1987) Vol. 7(3), Pág. 113–6.

KARKABOUNAS, S., KOSTOULA, O., DASKALOU, T., VELTSISTAS, P., KARAMOUZIS, M., & ZELOVITIS, I.. Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvacrol. *Experimental Oncology*, (2006). Vol. 28(2), Pág. 121–125.

KODURU, S., GRIERSON, D., & AFOLAYAN, A.. Antimicrobial Activity of *Solanum aculeastrum*. *Pharmaceutical Biology*, (2006). Vol. 44(4), Pág. 283–286.

KOPARAL, A., & ZEYTINOGLU, M.. Effects of carvacrol on a human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line, A549. *Cytotechnology*, (2003). Pág. 149–154.

KOPLOW, J., & GOLDFINE, H.. Alterations in the Outer Membrane of the Cell Envelope of Heptose-Deficient Mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, (1974) Vol. 117(2), Pág. 527–543.

KUMAR, M., NAIR, M., HEMA, P., MOHAN, J., & SANTHOSHKUMAR, T. (2007). Pinocembrin Triggers Bax-Dependent Mitochondrial Apoptosis in Colon Cancer Cells. *MOLECULAR CARCINOGENESIS*, 241(May 2006), Pág. 231–241.

KURODA, Y., & INOUE, T.. Antimutagenesis by factors affecting DNA repair in bacteria. *Mutation Research*, (1988) Vol. 202, Pág. 387–391.

LAGOURI, V., Blekas, G., & Tsimidou, M.. Composition and antioxidant activity of essential oils from oregano plants grown wild in Greece. *Z Lebensm Unters Forsch*, (1993) Vol. 197, Pág. 20–23.

LAVAL, J., JURADO, J., SAPARBAEV, M., & SIDORKINA, O.. Antimutagenic role of base-excision repair enzymes upon free radical-induced DNA damage. *Mutation Research*, (1998) Vol. 402(1-2), Pág. 93–102.

LI, X., Dong, M., Liu, Y., Shi, Q., & Kiyota, H.. Structures and biological properties of the chemical constituents from the genus *Wedelia*. *Chemistry & Biodiversity*, (2007) Vol. 4, Pág. 823–836.

MAGOON, M., Ramanujam, S., & Cooper, D.. Cytogenetical Studies in Relation to the Origin and Differentiation of Species in the Genus *Solanum* L. *Caryologia*, (1962). Vol. 15(1), Pág. 151–252.

MARKS, R. Epidemiology of melanoma. *Clinical and Experimental Dermatology*, (2000). Vol. 25(6), Pág. 459–63.

MATSUMURA, Y., & ANANTHASWAMY, H.. Molecular mechanisms of photocarcinogenesis. *Frontiers in Bioscience*, (2002) Vol. 7, Pág. 765–783.

MELO, S., SOARES, S., DA COSTA, R., DA SILVA, C., DE OLIVEIRA, M., BEZERRA, R., ... BERNARDO-FILHO, M.. Effect of the *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, (2001) Vol. 496(1-2), Pág. 33–38.

MEZZOUG, N., ELHADRI, A., DALLOUH, A., AMKISS, S., SKALI, N. S., ABRINI, J., ... IDAOMAR, M.. Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. *Mutation Research*, (2007) Vol. 629(2), Pág. 100–110.

NAKASUGI, T., & KOMAI, K.. Antimutagens in the Brazilian Folk Medicinal Plant Carqueja (*Baccharis trimera* Less.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (1998) Vol. 46, Pág. 2560–2564.

NEWMAN, D., & CRAGG, G.. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, (2007) Vol. 70(3), Pág. 461–77.

NICHOLS, J., & KATIYAR, S. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of Dermatological Research*, (2010) Vol. 302(2), Pág. 71–83.

OLIVEIRA, D., LEITÃO, G., BIZZO, H., LOPES, D., ALVIANO, D., ALVIANO, C., & LEITÃO, S. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. *Food Chemistry*, (2007). Vol. 101(1), Pág. 236–240.

OLIVEIRA, D., LEITÃO, G., FERNANDES, P., & LEITÃO, S. Ethnopharmacological studies of *Lippia organoides*. *Revista Brasileira de ...*, (2014) Vol. 24, Pág. 206–214.

PELTOMÄKI, P. (2001). DNA mismatch repair and cancer. *Mutation Research*, Vol. 488(1), Pág. 77–85.

PINTO, C., DIAS, V., PINTO, F., PINTO, R., TROVATTI, A., RIBEIRO, C., ... LUCCHESI, A. Antimicrobial activity of lippia species from the brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective agents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.

PLEASANCE, E., STEPHENS, P., O'MEARA, S., MCBRIDE, D., MEYNERT, A., JONES, D., ... CAMPBELL, P. J.. A small-cell lung cancer genome with complex signatures of tobacco exposure. *Nature*, (2010) Vol. 463(7278), Pág. 184–90.

POURMORTAZAVI, S., & HAJIMIRSADEGHI, S.. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography A*, (2007). Vol. 1163(1–2), Pág. 2–24.

QUILLARDET, P., FRELAT, G., NGUYEN, V., & HOFNUNG, M.. Detection of ionizing radiations with the SOS Chromotest, a bacterial short-term test for genotoxic agents. *Mutagenesis Research*, (1989) Vol. 216, Pág. 251–257.

QUILLARDET, P., & HOFNUNG, M.. Induction by UV light of the SOS function *sfiA* in *Escherichia coli* strains deficient or proficient in excision repair . Induction by UV Light of the SOS Function *sfiA* in *Escherichia coli* Strains Deficient or Proficient in Excision Repair. *Journal of Bacteriology*, (1984) Vol. 157(1), Pág. 35–38.

QUILLARDET, P., & HOFNUNG, M.. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutation Research*, (1985). Vol. 147(3), Pág. 65–78.

QUILLARDET, P., & HOFNUNG, M.. The SOS chromotest: a review. *Mutation Research*, (1993) Vol. 297(3), Pág. 235–279.

QUILLARDET, P., HUISMAN, O., D'ARI, R., & HOFNUNG, M.. SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (1982). Vol. 79(19), Pág. 5971–5975.

QUINTERO, N., STASHENKO, E., & FUENTES, J.. The influence of organic solvents on estimates of genotoxicity and antigenotoxicity in the SOS chromotest. *Genetics and Molecular Biology*, (2012) Vol. 35(2), Pág. 503–514.

RASUL, A., Millimouno, F., Ali ELTAYB, W., ALI, M., LI, J., & LI, X. (2013). Pinocembrin: a novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities. *BioMed Research International*, 2013.

RAVANAT, J., DOUKI, T., & CADET, J.. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, (2001) Vol. 63(1-3), Pág. 88–102.

RODRIGUES, C., DIAS, J., DE MELLO, R., RICHTER, M., PICADA, J., & FERRAZ, A.. Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, (2009). Vol. 125(1), Pág. 97–101.

ROJAS-GRAÜ, M., AVENA-BUSTILLOS, R., OLSEN, C., FRIEDMAN, M., HENIKA, P., MARTÍN-BELLOSO, O., ... MCHUGH, T.. Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate–apple puree edible films. *Journal of Food Engineering*, (2007) Vol. 81(3), Pág. 634–641.

ROSENBLAT, G., MERETSKI, S., SEGAL, J., TARSHIS, M., SCHROEDER, A., ZANIN-ZHOROV, A., ... HOCHBERG, M.. Polyhydroxylated fatty alcohols derived from avocado suppress inflammatory response and provide non-sunscreen protection against UV-induced damage in skin cells. *Archives of Dermatological Research*, (2011) Vol. 303(4), Pág. 239–246.

SANCAR, A., & RUPP, W.. A novel repair enzyme: UVRABC excision nuclease of *Escherichia coli* cuts a DNA strand on both sides of the damaged region. *Cell*, (1983) Vol. 33(1), Pág. 249–260.

SANCAR, A., WHARTON, R., & SELTZER, S.. Identification of the *uvrA* gene product. *Journal of Molecular ...*, (1981) Vol. 148(1), Pág. 45–62.

SANCAR, A., WHARTON, R., SELTZER, S., MACINSKI, B., CLARKE, N., & RUPP, W.. Identification of the *uvrA* gene product. *Journal of Molecular Biology*, (1981) Vol. 148, Pág. 45–62.

SÁNCHEZ, G., NOVA, J., DE LA HOZ, F., & CASTAÑEDA, C.. Incidencia de cáncer de piel en Colombia, años 2003-2007. *Piel*, (2011) Vol. 26(4), Pág. 171–177.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G., & BORDAS, E.. Paraguayan medicinal compositae. *Journal of Ethnopharmacology*, (1990). Vol. 28, Pág. 163–171.

SERMENT, J., BREÑA, M., & ESPINOSA J. (2005). La respuesta SOS en *Escherichia coli*. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 8(2), 99–105.

SHIMA, P., SHIOJI, T., MORELLO, L., KOREHIZA, P., UEDA-NAKAMURA2, T., DIAS, F., ... VATARU, C.. Effects of medicinal plant extracts on growth of

Leishmania (L.) amazonensis and Trypanosoma cruzi. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, (2005) Vol. 41(1), Pág. 85–94.

SLAMEŇOVÁ, D., HORVÁTHOVÁ, E., ŠRAMKOVÁ, M., & MARŠÁLKOVÁ, L.. DNA-protective effects of two components of essential plant oils carvacrol and thymol on mammalian cells cultured in vitro. *Neoplasma*, (2007) Vol. 54(2), Pág. 108–112.

SOROMOU, L., CHU, X., JIANG, L., WEI, M., HUO, M., CHEN, N., ... DENG, X.. In vitro and in vivo protection provided by pinocembrin against lipopolysaccharide-induced inflammatory responses. *International Immunopharmacology*, (2012) Vol. 14(1), Pág. 66–74.

STAMMATI, a., BONSI, P., ZUCCO, F., MOEZELAAR, R., ALAKOMI, H.-L., & VON WRIGHT, A.. Toxicity of Selected Plant Volatiles in Microbial and Mammalian Short-term Assays. *Food and Chemical Toxicology*, (1999) Vol. 37(8), Pág. 813–823.

STASHENKO, E., & MARTÍNEZ, J.. Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis por GC-MS. *Scientia Chromatographica*, (2011) Vol. 3(1), Pág. 25–49.

STASHENKO, E., MARTÍNEZ, J., CALA, M., DURÁN, D., & CABALLERO, D.. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from Lippia (Verbenaceae) aromatic plants. *Journal of Separation Sciences*, (2013) Vol. 36(1), Pág. 192–202.

STASHENKO, E., MARTÍNEZ, J., RUÍZ, C., ARIAS, G., DURÁN, C., SALGAR, W., & CALA, M.. Lippia organoides chemotype differentiation based on essential oil

GC-MS and principal component analysis. *Journal of Separation Science*, (2010) Vol. 33(1), Pág. 93–103.

STASHENKO, E., & RUIZ, C.. Composition and antioxidant activity of essential oils of *Lippia organoides* HBK grown in Colombia. *Natural Product Communications*, (2007) Vol. 0(0), Pág. 1–3.

TAPIA, A., Rodriguez, J., Theoduloz, C., Lopez, S., Feresin, G., & Schmeda-Hirschmann, G.. Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. *Journal of Ethnopharmacology*, (2004). Vol. 95(2-3), Pág. 155–61.

TORRIANI, A., & Rothman, F.. Mutants of *Escherichia coli* Constitutive FOR Alkaline Phosphatase. *Journal of Bacteriology*, (1961) Vol. 81(5), Pág. 835–837.

TSATSOU, F., & TRAKATELLI, M.. Extrinsic aging: UV-mediated skin carcinogenesis. *Dermato-Endocrinology*, (2012) Vol. 4(3), Pág. 285–297.

VISVADER, J.. Cells of origin in cancer. *Nature*, 469(7330), (2011) Pág. 314–22.

WATTENBERG, L.. Chemoprevention of cancer. *Cancer Research*, (1985) Vol. 45, Pág. 1–8.

YIN, Q.-H., YAN, F.-X., ZU, X.-Y., WU, Y.-H., WU, X.-P., LIAO, M.-C., ... ZHUANG, Y.-Z.. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. *Cytotechnology*, (2012) Vol. 64(1), Pág. 43–51.

ZAIDI, M. R., Day, C.-P., & Merlino, G.. From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. *The Journal of Investigative Dermatology*, (2008) Vol. 128(10), Pág. 2381–91.

ZOUGAGH, M., VALCÁRCEL, M., & RÍOS, A.. Supercritical fluid extraction: a critical review of its analytical usefulness. *Trends in Analytical Chemistry*, (2004) Vol. 23(5), Pág. 399–405.

Anexo A. Efectos de agentes naturales con potencial fotoprotector contra la exposición a la radiación UV en ensayos in vitro e in vivo.

Tipo de extracto/Compuesto botánico	Familia	Nombre de la planta	Blancos moleculares/Mecanismos	Referencias
Extracto liofilizado de ajo	Amaryllidaceae	Ajo (<i>Allium sativum</i>)	Acción antiinflamatoria y antioxidante. Posible acción antagonista del ác. úrocánico.	Reeve et al., 1993
Silibinina (Sigma, St. Louis, MO)	Asteraceae	Cardo mariano (<i>Silybum marianum</i>)	Regulación negativa de los factores de transcripción HIF-1 α , STAT3 y NF-kB, y las enzimas óxido nítrico sintetasa (iNOS) y ciclooxidasas 2 (COX-2). Disminuye la formación de CPD.	Singh y Agarw, 2005
Extracto de alcoholes grasos polihidroxilados (PFA)	Lauraceae	Aguacate (<i>Persea americana</i>)	Inhibición de la inflamación. Promueve la remoción de CPD y disminución de la secreción de IL-6 y PGE2.	Rosenblat et al., 2011
Apigenina en extracto etanólico crudo	Lycopodiaceae	Licopodio (<i>Lycopodium clavatum</i>)	Regulación positiva de los genes del sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER), remoción de los anillos de ciclobutano, disminución en la generación de ROS y regulación negativa de NF-kB y MAPK.	Das et al., 2013
Extracto de granada	Lythraceae	Granada (<i>Punica granatum</i>)	Propiedad antioxidante, antiinflamatoria y antiploriferativa. Modulación de las vías de señalización MAPK y NF-kB así como la inhibición de COX-2, iNOS, PCNA, ciclina D1 y metaloproteínas de matriz.	Khan et al., 2012
Extracto acuoso del fruto de goji	Solanaceae	Goji (<i>Lycium barbarum</i>)	Inducción de moléculas endógenas con actividad fotoimune y antioxidante (e.j. metalotioneínas y hemo-oxigenasa-1).	Reeve et al., 2010
Curcumina en pasta (vía oral) y en crema (vía tópica)	Zingiberaceae	Cúrcuma (<i>Curcuma longa</i>)	Disminuye el tiempo de inicio y el número de tumores.	Phillips et al., 2013

Cafeína (infusión)	Theaceae Rubiaceae	Té (<i>Camellia sinensis</i>) Café (<i>Coffea arabica</i>)	Efecto antioxidante y protector contra quemaduras. Inhibe la formación de dímeros de timina y mejora los procesos de apoptosis en células cancerosas por mecanismos dependientes e independientes (inhibición del factor ATR) de P53.	Huang et al., 1997; Conney et al., 2013
Monoterpenos (ej. Limoneno y sus derivados oxigenados como el alcohol perílico, carveol, carvona, entre otros)	Rutaceae Lamiaceae Rosaceae	Frutas cítricas (<i>Citrus</i> sp.) Menta (<i>Mentha</i> sp.) Cerezo (<i>Prunus</i> sp.)	Actividad quimiopreventiva en cáncer de piel entre otros tipos de cáncer. Inhibición negativa del factor AP-1.	Barthelman et al., 1998; Crowell, 1999
Polifenoles del té verde (GTP)	Theaceae	Té (<i>Camellia sinensis</i>)	Promueven la reparación de CPD sobre el ADN mejorando los niveles de IL-12. Así mismo, reduce la inflamación a través de la regulación de COX-2, PGE2, PCNA, ciclina D1, entre otros.	Meeran et al., 2009

Anexo B. Análisis de genotoxicidad de los 13 extractos a través del ensayo SOS Chromotest. Se presentan los valores correspondientes al factor de inducción (*I*) y su correspondiente error estándar. En [] se describe la concentración (mg/ml) utilizada en cada tratamiento. C-, control negativo (agua destilada); C+, control positivo (2,26 µM/ml 4NQO, agente carcinogénico y mutagénico estándar conocido como 4-nitroquinolina-1-óxido utilizado). * Se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al C-.

Extracto	Factor de inducción (<i>I</i>)										
	C-	C+	[1.152]	[0.576]	[0.288]	[0.144]	[0.072]	[0.036]	[0.018]	[0.009]	[0.004]
SFE 042 <i>Lippia origanoides</i>	1 ± 0.03	21 ± 0.90	0.45 ± 0.03*	0.46 ± 0.03*	0.81 ± 0.02*	0.97 ± 0.02	0.92 ± 0.03	0.96 ± 0.03	0.94 ± 0.05	0.84 ± 0.06*	1.15 ± 0.05*
SFE 008 <i>Lippia origanoides</i>	1 ± 0.05	19.88 ± 2.28	0.76 ± 0.03*	0.87 ± 0.04	0.89 ± 0.06	0.75 ± 0.05*	0.77 ± 0.05*	0.89 ± 0.09	0.92 ± 0.06	0.894 ± 0.06	1.10 ± 0.08
SFE 023 <i>Lippia sp.</i>	1 ± 0.03	17.92 ± 0.6	0.58 ± 0.03*	0.62 ± 0.02*	0.63 ± 0.04*	0.71 ± 0.04*	0.73 ± 0.04*	0.77 ± 0.05*	0.86 ± 0.04	0.8 ± 0.03*	0.93 ± 0.06
SFE 019 <i>Solanum crotonifolium</i>	1 ± 0.02	10.16 ± 0.52	0.57 ± 0.02*	0.6 ± 0.02*	0.66 ± 0.02*	0.77 ± 0.02*	0.82 ± 0.02*	0.82 ± 0.02*	0.92 ± 0.03	0.98 ± 0.03	1.02 ± 0.04
SFE 030 <i>Persea caerulea</i>	1 ± 0.03	13.27 ± 0.62	0.56 ± 0.03*	0.59 ± 0.04*	0.66 ± 0.05*	0.67 ± 0.03*	0.72 ± 0.03*	0.78 ± 0.02*	0.85 ± 0.03*	0.91 ± 0.02	0.91 ± 0.04*
RT 007 SFE <i>Lippia origanoides</i>	1 ± 0.05	17.68 ± 1.14	1.02 ± 0.04	1.05 ± 0.06	1.15 ± 0.1	1.17 ± 0.06	0.87 ± 0.06	0.87 ± 0.04	0.92 ± 0.03	0.85 ± 0.05	0.87 ± 0.04
SFE 001 <i>Chromolena pellia</i>	1 ± 0.04	14.65 ± 1.11	0.6 ± 0.03*	0.63 ± 0.03*	0.67 ± 0.03*	0.72 ± 0.04*	0.82 ± 0.06*	0.83 ± 0.05	0.77 ± 0.05*	0.89 ± 0.06	0.82 ± 0.05*
SFE 015 <i>Lourteigia sp.</i>	1 ± 0.07	16.97 ± 1.49	0.66 ± 0.06*	0.62 ± 0.05*	0.62 ± 0.06*	0.79 ± 0.05	0.79 ± 0.05	0.74 ± 0.07*	0.87 ± 0.04	0.86 ± 0.05	0.89 ± 0.07
SFE 033 <i>Baccharis cf. Nitida</i>	1 ± 0.02	20.01 ± 0.78	0.97 ± 0.05	0.81 ± 0.03*	0.73 ± 0.04*	0.75 ± 0.02*	0.78 ± 0.04*	0.79 ± 0.02*	0.81 ± 0.04*	0.81 ± 0.03*	0.87 ± 0.03*
SFE 038 <i>Austro eupatorium inulifolium</i>	1 ± 0.01	16.85 ± 0.88	0.89 ± 0.07	0.82 ± 0.04*	0.82 ± 0.03*	0.9 ± 0.04	0.91 ± 0.02	1.06 ± 0.04	1 ± 0.03	1.03 ± 0.03	1.14 ± 0.05
SFE 024 <i>Wedelia calycina</i>	1 ± 0.02	13.89 ± 1.1	0.65 ± 0.02*	0.67 ± 0.03*	0.75 ± 0.03*	0.74 ± 0.04*	0.99 ± 0.03	0.94 ± 0.04	0.94 ± 0.04	1.08 ± 0.05	1.25 ± 0.05*
SFE 017 <i>Bursera tomentosa</i>	1 ± 0.03	14.95 ± 0.51	0.72 ± 0.09*	0.42 ± 0.01*	0.45 ± 0.02*	0.53 ± 0.02*	0.53 ± 0.02*	0.56 ± 0.03*	0.59 ± 0.03*	0.67 ± 0.04*	0.68 ± 0.02*
RT 003 SFE <i>Bejaria aestuans</i>	1 ± 0.03	13.89 ± 0.64	0.5 ± 0.01*	0.56 ± 0.04*	0.58 ± 0.03*	0.68 ± 0.03*	0.73 ± 0.03*	0.79 ± 0.02*	0.81 ± 0.02*	0.82 ± 0.03*	0.79 ± 0.03*