

**EFFECTO ANTIGENOTÓXICO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE
LIPPIA ORIGANOIDES HBK, DEL TIMOL Y DEL CARVACROL
CONTRA EL DAÑO EN EL ADN INDUCIDO POR BLEOMICINA EN
EL SOS CHROMOTEST**

GLORIA CAROLINA VICUÑA GIRALDO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2009**

**EFFECTO ANTIGENOTÓXICO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE
LIPPIA ORIGANOIDES HBK, DEL TIMOL Y DEL CARVACROL
CONTRA EL DAÑO EN EL ADN INDUCIDO POR BLEOMICINA EN
EL SOS CHROMOTEST**

GLORIA CAROLINA VICUÑA GIRALDO

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

**DIRECTOR:
JORGE LUIS FUENTES, MICROBIÓLOGO, Ph.D.**

**CO-DIRECTORA:
ELENA STASHENKO, QUÍMICA, Ph.D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2009**

*A Dios que me ha bendecido con esta
experiencia maravillosa.*

*A mis padres y mi hermano, por su apoyo
incondicional, y por enseñarme que sin
importar todos los obstáculos que se
presenten en el camino siempre se debe
mantenerla la mirada fija en lo que se quiere
alcanzar.*

*A toda mi familia, por estar presentes en cada
momento de mi vida.*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Luis fuentes por incentivar este proyecto y depositar en mi la confianza para el desarrollo del mismo. Por su invaluable y constante apoyo tanto personal como intelectual, pero especialmente por su admirable dedicación, enseñanzas y consejos que van a ser útiles toda mi vida.

A la Dra. Elena Stashenko por su generosidad, colaboración incondicional, recomendaciones, comentarios y aporte intelectual para permitir que culminara de manera satisfactoria este trabajo. De igual forma, por sus enseñanzas y lecciones que siempre llevare presente en cada momento.

A Vicerrectoria de Investigación y Extensión (VIE) y CENIVAM por la financiación de este proyecto.

A mis padres William Vicuña y Gloria Giraldo porque su confianza y amor incondicional incentivaron en mi el esfuerzo y la perseverancia para realizar mi carrera, porque siempre fueron y serán mi ejemplo de vida para sobre llevar las situaciones adversas que se puedan presentar y por ser el fundamento para el logro de todas mis metas.

A mi familia que siempre ha estado junto a mí apoyándome, motivándome y acompañándome en cada momento de mi vida.

A todos los miembros del Laboratorio de Cromatografía y el CENIVAM por su compañerismo y confianza, especialmente a Cristina, Hans,

Miguel, Carlos y Ginna por sus asesorías técnicas, conocimientos y consejos.

A todos los integrantes del Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental por su colaboración y amistad, especialmente a Molkary Lopez por ser un gran apoyo en todos los momentos difíciles y en las largas jornadas de trabajo que se presentaron en el desarrollo de este estudio.

A todos los profesores de la carrera de Biología por sus grandes enseñanzas.

A mis amigos que estuvieron a mi lado en el transcurso de la carrera: Darlis, Helber, Luis, Jaime, Eliana y Leo.

A todas las personas que contribuyeron de una y otra forma a la realización de esta investigación, mil gracias.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEORICO	5
1.1 LOS ACEITES ESENCIALES	5
1.2 MERCADO DE LOS ACEITES ESENCIALES	6
1.3 METODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES	7
1.4 DETERMINACIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES	8
1.5 EL GENERO LIPPIA	9
1.6 LIPPIA ORIGANOIDES	11
1.7 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE LIPPIA ORIGANOIDES	13
1.8 EL SOS CHROMOTEST	15
1.9 BLEOMICINA	17
2. METODOLOGIA	18
2.1 MATERIAL VEGETAL	18
2.2 EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES	18
2.3 PREPARACIÓN DE MUESTRAS	19
2.4 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	19

2.5 IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LOS ACEITES	20
2.6 CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LOS ACEITES	22
2.7 CEPA DE ENSAYO Y CONDICIONES DE CULTIVO	23
2.8 ENSAYO DE GENOTOXICIDAD.	23
2.8.1 Ensayos Enzimáticos.	24
2.8.1.1 <i>Ensayo Enzimático β-Galactosidasa (βg).</i>	25
2.8.1.2 <i>Ensayo Enzimático Fosfatasa Alcalina (FA).</i>	25
2.8.2 Cálculo del Factor de Inducción SOS.	26
2.9 ENSAYO DE ANTIGENOTOXICIDAD	26
2.9.1 El criterio de antigenotoxicidad.	27
2.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	28
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
3.1 EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES	29
3.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES	29
3.3 ENSAYO DE GENOTOXICIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES	35
3.4 ENSAYO DE ANTIGENOTOXICIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES	38

3.5 IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS TIMOL Y CARVACROL EN LA FRACCIÓN ACUOSA	42
3.6 ENSAYO DE ANTIGENOTOXICIDAD DEL TIMOL Y EL CARVACROL	45
4. CONCLUSIONES	49
5. RECOMENDACIONES	50
6. BIBLIOGRAFIA	51
6. ANEXOS	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Lippia origanoides</i> .	12
Figura 2. Estructura química del Timol y Carvacrol.	14
Figura 3. Perfiles cromatográficos de los aceites esenciales de <i>Lippia origanoides</i> . A. Espécimen A, B. Espécimen B, C. Comparación de los perfiles cromatográficos de los dos especímenes.	32
Figura 4. Perfiles cromatográficos del aceite esencial y de la extracción líquido-líquido de <i>Lippia origanoides</i> espécimen A (COL519799).	43
Figura 5. Perfiles cromatográficos del aceite esencial y de la extracción líquido-líquido de <i>Lippia origanoides</i> espécimen A (COL519799).	44

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos utilizados en el ensayo de genotoxicidad de los aceites esenciales de <i>Lippia origanoides</i> .	24
Tabla 2. Composición química de los aceites esenciales de <i>Lippia origanoides</i> obtenidos por la técnica Hidrodestilación Asistida por Radiación Microonda.	29
Tabla 3. Clasificación de los compuestos presentes en los aceites esenciales de <i>Lippia origanoides</i> .	33
Tabla 4. Quimiotipos de <i>Lippia origanoides</i> basados en el porcentaje de los constituyentes mayoritarios reportados por la literatura.	34
Tabla 5. Análisis de genotoxicidad de los aceites esenciales de <i>L. origanoides</i> en <i>Escherichia coli</i> PQ37.	35
Tabla 6. Genotoxicidad inducida por la Bleomicina en <i>Escherichia coli</i> PQ37.	38
Tabla 7. Efecto de los diferentes solventes sobre la genotoxicidad inducida por la Bleomicina en <i>Escherichia coli</i> PQ37.	39
Tabla 8. Antigenotoxicidad de los extractos acuosos de los aceites esenciales de <i>L. origanoides</i> contra el daño producido por la Bleomicina en <i>Escherichia coli</i> PQ37.	41
Tabla 9. Antigenotoxicidad de Timol y Carvacrol contra el daño inducido por la Bleomicina en <i>Escherichia coli</i> PQ37.	46

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Equipo de Hidrodestilación Asistida por Radiación Microondas (MWHD).	67
Anexo 2. Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890 plus Series GC System acoplado a un detector selectivo de masas Agilent Technologies 5973 Network.	61
Anexo 3. Esquema del ensayo SOS Chromotest.	69
Anexo 4. Espectrofotómetro HACH DR/2000.	70

RESUMEN

TITULO: EFECTO ANTIGENOTÓXICO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *LIPPIA ORIGANOIDES* HBK, DEL TIMOL Y DEL CARVACROL CONTRA EL DAÑO EN EL ADN INDUCIDO POR BLEOMICINA EN EL SOS CHROMOTEST¹

AUTOR: GLORIA CAROLINA VICUÑA GIRALDO^{††}

PALABRAS CLAVE: *Lippia origanoides*, Bleomicina, antigenotoxicidad, quimioprevención, SOS Chromotest.

En el presente trabajo se evaluó el efecto protector en el ADN de los aceites esenciales de dos especímenes de la especie *Lippia origanoides* y sus compuestos mayoritarios Timol y Carvacrol contra la genotoxicidad inducida por el mutágeno Bleomicina en el ensayo SOS Chromotest. La bacteria utilizada fue la *Escherichia coli* PQ37. Los constituyentes de los aceites esenciales se determinaron por un análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS).

Los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de los dos especímenes de *Lippia origanoides* estudiados fueron, Timol (58%) y Timol (34%) / Carvacrol (26%), respectivamente. Adicionalmente se encontró que los dos especímenes comparten el 87% de la composición química.

La antigenotoxicidad de los aceites esenciales y de sus compuestos mayoritarios se analizó en procedimientos de co-incubación del aceite esencial o compuesto mayoritario, el mutágeno y las células. Tanto los aceites esenciales como sus compuestos mayoritarios, protegen a las células contra la genotoxicidad inducida por la Bleomicina indicando que estos dos compuestos (Timol y Carvacrol) son los principales responsables de la antigenotoxicidad detectada en los aceites. Los resultados se discuten en relación con el potencial quimiopreventivo de los aceites esenciales de *Lippia origanoides* y sus compuestos mayoritarios Timol y Carvacrol.

¹ Proyecto de Grado.

^{††}Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Director: Jorge Luis Fuentes, Ph.D. y CO-Directora: Elena Stashenko, Ph.D.

ABSTRACT

TITLE: ANTIGENOTOXICITY OF THE ESSENTIAL OILS FROM *LIPPIA ORIGANOIDES* HBK, THYMOL AND CARVACROL AGAINST BLEOMYCIN-INDUCED DNA DAMAGE MEASURED BY SOS CHROMOTEST.²

AUTHOR: GLORIA CAROLINA VICUÑA GIRALDO^{‡‡}

KEYWORDS: *Lippia origanoides*, antigenotoxicity, chemoprevention, bleomycin, SOS Chromotest.

The present work evaluated the DNA protective effect of the essential oils of two specimens of the species *Lippia origanoides* and its majority compounds Thymol and Carvacrol against bleomycin-induced genotoxicity in SOS Chromotest test. The bacteria used was *Escherichia coli* PQ37. The constituents of essential oils were determined by Gas Chromatography/Mass Spectrometric (GC-MS) analysis.

The majority compounds of two *L. origanoides* specimens were Thymol (58 %) and Thymol (34 %)/Carvacrol (26 %), respectively. Additionally it was found that two species share 87% of the chemical composition.

The antigenotoxicity of the essential oils and its majority compounds was assayed in co-incubation procedures of the essential oil or majority compound, the mutagen and cells. Both essential oils and its majority compounds protected bacterial cells against bleomycin-induced genotoxicity indicating these two compounds (Thymol and Carvacrol) as the principal responsible for antigenotoxicity detected in the oils. The results are discussed in relation to the chemopreventive potential of EO of *L. origanoides* and its majority compounds Thymol and Carvacrol.

² Thesis Project.

^{‡‡} Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Director: Jorge Luis Fuentes, PH. D. y CO-Directora: Elena Stashenko, PH. D.

INTRODUCCIÓN

Es de amplio conocimiento que las plantas han jugado un papel fundamental en el tratamiento y la prevención de enfermedades a lo largo de la historia de la civilización humana. Propiedades anti-inflamatorias, anti-fúngicas, anti-virales, anti-bacterianas, anti-oxidantes, analgésicas, insecticidas, entre otras; se les han atribuido a un gran número de especies vegetales (Light *et al.* 2005, Saika *et al.* 2006, Kumar *et al.* 2007). Reportes de la Organización Mundial de la Salud demuestran que en países que se encuentran en vía de desarrollo, entre el 65 y el 80 % de la población todavía dependen del uso de plantas medicinales para el tratamiento de sus enfermedades (Calixto 2005, Gilani y Atta-ur-Rahman 2005).

Hoy se acepta que las plantas medicinales de uso tradicional contienen compuestos con potencial terapéutico. Se estima que alrededor del 25 al 30 % del total de los medicamentos disponibles en el mercado tienen un origen natural (Newman *et al.* 2003, Boldi 2004, Clardy y Walsh 2004, Koehn y Carter 2005, Cordell y Colvard 2005). Dado estas razones, existe un creciente interés por la identificación de especies vegetales con propiedades terapéuticas y preventivas.

El cáncer es un proceso con múltiples estadios, fruto de la acumulación en una célula de sucesos genéticos y epigenéticos (Sugimura y Ushijima 2000, Williams 2001). El riesgo celular de acumular mutaciones potencialmente oncogénicas depende de la frecuencia con la que se produzcan lesiones en el DNA y de la capacidad que tengan las células de reparar dichas lesiones. El equilibrio adecuado entre

ambos procesos garantiza una determinada estabilidad genética (Laval *et al.* 1998, Schulz *et al.* 2000, Kawanashi *et al.* 2001, Peltomäki 2001). En este contexto, el efecto mutagénico que tienen diferentes agentes ambientales físicos y químicos, incluidos los mutágenos celulares endógenos, puede claramente alterar la mencionada estabilidad genética y estar en la base de distintos procesos tumorales (Sakaranarayanan 1999, Barrett 2000, Ames 2001).

La quimioprevención, o inhibición de los procesos carcinogénicos por medio de agentes químicos o naturales, está cobrando cada día mayor relieve por el impacto que esta puede tener en la incidencia de los procesos tumorales en poblaciones humanas. El consumo de suplementos dietéticos y una buena alimentación con productos que contengan compuestos con propiedades antimutagénicas y anticancerígenas son importantes en el mantenimiento de una adecuada quimioprevención (Sugimura 1998, 2000, Schwab *et al.* 2000, Tomatis 2000). Es por ello, que la búsqueda de compuestos quimiopreventivos en aras de disminuir la incidencia de procesos carcinogénicos y de otras enfermedades relacionadas con las mutaciones, es una necesidad y una línea prioritaria en el campo de las biociencias médicas.

Dentro de la biodiversidad del mundo de las plantas vasculares, el género *Lippia* perteneciente a la Familia *Verbenacea* es prometedor como fuente de compuestos de utilidad para las industrias médico-farmacéutica, textil, alimenticia y cosmética (Stashenko *et al.* 2003). Dicho género está integrado por más de 200 especies que se distribuyen en zonas tropicales y subtropicales de Asia, África, América del Sur, Centro América y el Caribe y, muchas de ellas, han sido

usadas en la medicina tradicional para el tratamiento de diferentes dolencias gastrointestinales, por su actividad antimicrobiana, como calmante y analgésico, y como expectorante (Gupta 1995). El género se caracteriza por su amplia diversidad química, demostrada en su variedad de metabolitos secundarios que depende aparentemente del ecotipo; aunque estos pueden ser diferentes incluso dentro de una misma especie indicando la presencia de diferentes quimiotipos (Zoghbi *et al.* 1998, Stashenko *et al.* 2003).

Trabajos recientes apuntan hacia un posible potencial terapéutico de los aceites esenciales, dado sus probadas propiedades antimicrobianas, quimiopreventivas y antitumoral (Burt 2004, Bakkali *et al.* 2008, Kaefer y Milner 2008). Adicionalmente, los aceites esenciales pueden contener compuestos con efectos antimutagénicos frente a diferentes tipos de mutágenos conocidos (Ipek *et al.* 2003, 2005, Aydin *et al.* 2005, Mezzoug *et al.* 2007); sugiriendo que estos son una fuente adecuada de compuestos quimiopreventivos.

La especie *Lippia origanoides* HBK, conocida comúnmente en Colombia como “Orégano de monte”, habita en zonas semiáridas y está bien distribuida por diferentes departamentos colombianos como: Guajira, Magdalena, Cauca, Cundinamarca, Santander y Norte de Santander (García-Barriga 1992, Albesiano *et al.* 2003). Sus aceites esenciales muestran actividad antimicrobiana contra patógenos causales de enfermedades respiratorias y gastrointestinales (dos Santos *et al.* 2004, Oliveira *et al.* 2007). Recientemente, se ha demostrado que los aceites esenciales de *L. origanoides* tienen actividad anti-protozoaria contra *Leishmania chagasi*, el agente causal de la Leishmaniasis (Celis *et al.* 2007) y que inhibe la replicación *in vitro* del Virus de la Fiebre Amarilla (Meneses *et al.* 2009). Adicionalmente,

se ha demostrado una fuerte actividad antioxidante *in vitro* para esta especie (Stashenko *et al.* 2008).

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto, en el presente trabajo se evalúa el efecto antígenotóxico de los aceites esenciales de la especie *Lippia origanoides* frente al daño inducido por la Bleomicina usando el ensayo SOS Chromotest. En él se presenta, una completa caracterización química de los especímenes en estudio, se demostró un potente efecto antígenotóxico de los aceites frente a la Bleomicina y su relacionó dicha actividad con los compuestos mayoritarios del aceite Timol y Carvacrol.

1. MARCO TEORICO

LOS ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales (AE) son líquidos oleosos muy aromáticos, productos del metabolismo secundario de diferentes especies vegetales. Generalmente, presentan un color ligeramente amarillo, con densidades menores a la del agua pero con mayor viscosidad que esta, sus índices de refracción son elevados, y sufren degradación química en presencia de luz solar, aire, calor, ácidos y álcalis fuertes (Muñoz 2002). Se componen de mezclas de compuestos volátiles en su gran mayoría hidrocarburos tipo terpenos, y sus derivados oxigenados; los cuales son responsables del aroma característico del aceite (Stashenko *et al.* 1998). De los terpenos presentes en los aceites se pueden mencionar hidrocarburos monoterpénicos (ej. Limoneno, α y β pineno), alcoholes (ej. Mentol, Geraniol), aldehídos (ej. Citral, Geranial), cetonas (ej. Carvona, Alcanfor), ésteres (ej. Metil Salicilato) éteres (ej. Cineol, Ascaridol) y fenoles (ej. Timol, Carvacrol) entre otros (Sangwanet *et al.* 2001, Bakkali *et al.* 2008).

Los aceites esenciales no son exclusivos de un grupo de plantas. Por el contrario, estos se pueden encontrar en una gran número de familias vegetales emparentadas o no entre sí; aunque las familias Mirtaceae, Laureaceae, Rutaceae, Labiatae, Compositae, Umbelliferae, Pinaceae, Poaceae, Verbenácea, Zingiberaceae y Piperaceae, sobresalen por la amplia presencia de estos aceites (Lawrence 1995). Los aceites esenciales, se pueden extraer de distintas partes de la plantas según la

especie, como son: flores, hojas, tallos, semillas, cortezas, frutos, raíces, resina y madera (Burt 2004). A estos, se les han atribuido diferentes funciones en las plantas como son: agentes antimicrobianos, insecticidas, defensa contra los herbívoros; y en algunas especies, como sustancias que atraen los polinizadores a las flores (Bakkali *et al.* 2008).

MERCADO DE LOS ACEITES ESENCIALES

El mercado internacional de los aceites esenciales es de alrededor de 1300 millones de dólares anuales, siendo los mayores exportadores Estados Unidos, Francia, Reino Unido, Brasil, China y Argentina (Fundación ExportAr 2003). En Colombia, las importaciones de AE en el año 2002 superaron los 162 millones de dólares, y los principales países de origen de estos aceites fueron Estados Unidos, México, Suiza, Venezuela, Perú, entre otros. El mayor volumen de estas importaciones, representa sustancias odoríferas utilizadas por las grandes casas multinacionales de saborizantes que operan en nuestro país (Biocomercio Sostenible 2003). En menor magnitud, los aceites esenciales en Colombia se utilizan en: *i) Industria Química*, como lubricantes para maquinaria, disolventes biodegradables, bases para pesticidas, aromatizantes de pinturas y plásticos, *ii) Industria Alimenticia*, como condimentos, en la producción de confitería, licores, productos lácteos y cárnicos, *iii) Industria Cosmética*, para la preparación de perfumes, aguas de colonia, cremas, jabones, champús, talcos, entre otros, *iv) Industria Tabacalera*, como aromatizante de sus

productos y, v) **Industria Farmacológica**, para enmascarar los sabores de los medicamentos.

En Colombia, los volúmenes de aceites esenciales que se producen son limitados, y en su mayoría, estos son extraídos de especies como el eucalipto, el anís y de algunos cítricos (Fundación ExportAr 2003, Biocomercio Sostenible 2003).

METODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

Como los aceites esenciales son sustancias que pueden ser evaporadas de las plantas por acción del agua y el calor, la técnica utilizada para su extracción es la destilación. Y esta pueda ser de tres tipos (Burt 2004, Bandoni 2007).

Hidrodestilación: Consiste en colocar el material vegetal en el destilador con agua hasta que este totalmente sumergido, y someterlo a la acción del calor con el fin de evaporar en agua junto con los AE.

Destilación agua-vapor: En éste método el agua es colocada en el fondo del destilador y el material vegetal sobre esta en un falso fondo, para que no estén en contacto directo, luego se aplica calor para lograr la evaporación del agua. Cuando el vapor del agua entra en contacto con las plantas este libera los AE del tejido vegetal.

Destilación por arrastre con vapor: Para éste tipo de destilación es necesaria una fuente de vapor externa (caldera) que se conecta al

destilador donde se encuentra el material vegetal. Este vapor atraviesa el tejido vegetal y volatiliza los compuestos que conforman el aceite.

En los tres métodos la mezcla de vapor de agua y aceite esencial es arrastrado hacia un condensador que se encargan de convertirlo de nuevo a fase líquida donde es posible su posterior separación por decantación (Cerpa 2007).

DETERMINACIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES

La determinación química de los compuestos presentes en los aceites se puede llevar a cabo por resonancia magnética nuclear, espectroscopia infrarroja, espectrometría de masas, y cromatografía de gases; siendo las dos últimas técnicas las más utilizadas (Stashenko *et al.* 1998, Biocomercio Sostenible 2003, Burt 2004).

La cromatografía de gases es una técnica de separación basada en los diferentes tiempos de retención de los compuestos en una fase estacionaria, la cual consiste de un material sólido (polar o apolar) distribuido uniformemente en una columna. Las mezclas son evaporadas y arrastradas a través de la columna cromatográfica por una fase móvil (gas), la distribución de los compuestos en la fase estacionaria se da por las solubilidades diferenciales de estos en la fase a medida que son arrastrados. Los componentes de la muestra (solutos) se separan de los demás por sus presiones y afinidades con la fase estacionaria, proceso el cual es llamado elución. Los analitos se detectan a medida que salen de la columna por detectores

especializados como el detector de ionización en llama (FID), de Nitrógeno-Fósforo (NPD), de captura de electrones (ECD), entre otros (McNair & Miller 1998).

La espectrometría de masas es una técnica que determina los iones derivados de una molécula. La cual consiste en someter al analito a impacto de iones, átomos o moléculas, para poder separar sus iones. Cada compuesto genera un patrón único de fragmentos por el cual se puede realizar su identificación. El espectro de masas que se genera es un gráfico que representa la abundancia relativa de los iones producidos en relación de su masa-carga m/z (Hoffmann & Stroobant 2005).

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se reportó por primera vez en 1960 (Holmes *et al.* 1960). En esta cromatografía, a diferencia de la tradicional, el detector utilizado es un espectrómetro de masas; de tal manera que se combina los principios de ambas técnicas.

EL GENERO LIPPIA

El género *Lippia*, el cual pertenece a la familia Verbenaceae, cuenta con aproximadamente 200 especies que se distribuyen en las zonas tropicales de África, Centro y Sur de América (Judd *et al.* 1999). Sus especies se pueden presentar como hierbas, arbustos o árboles pequeños (Bandoni *et al.* 2000). Sus hojas se disponen en posición opuesta, son simples, con un margen entero o cerrado. Sus flores son

pequeñas, individuales y comúnmente de color blanco o amarillo (Maisch 1985, Judd *et al.* 1999, Bandoni *et al.* 2000). El género se caracteriza por contener especies muy aromáticas. Sus aceites esenciales contienen generalmente monoterpenos, sesquiterpenos, algunos compuestos fenólicos y flavonoides. Entre los más frecuentes se pueden mencionar el limoneno, carvacrol, camfor, linalool, timol, p-cimeno, β -cariofileno, α -pineno, entre otros (Pascual *et al.* 2001a).

Las especies del género *Lippia* se usan frecuentemente en la medicina tradicional, atribuyéndoles propiedades analgésicas, anti-inflamatorias, bactericida, anti-hipertensiva, diuréticas, entre otras (Pascual *et al.* 2001a). En América Central y del Sur, se utilizan como remedios para la bronquitis, el resfriado, la gripe y el asma; además de su uso como condimentos en la dieta típica de sus pueblos (Maisch 1985, Gupta 1995, Pascual *et al.* 2001a).

Estudios recientes, han demostrado actividades biológicas importantes en diferentes especies de este género. Por ejemplo, el extracto etanólico de la especie *Lippia alba* presenta efecto antiviral frente al Virus del Herpes Tipo I (HSV-1) en células humanas Hela y de mono verde africano Vero (Abad *et al.* 1997, Andrighetti-Fröhner *et al.* 2005). Adicionalmente, su aceite esencial tiene efectos analgésico, anti-inflamatorio, anti-ulcérico y anti-fúngico (Glauce *et al.* 1998, Pascual *et al.* 2001b, Teixeira *et al.* 2005). Otras especies con propiedades anti-inflamatoria y analgésica, respectivamente, son *Lippia dulcis* y *Lippia multiflora* (Abena *et al.* 2003, Pérez *et al.* 2005). Esta última especie, muestra además efecto bactericida frente a *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica*, *Shigella disentería*, *Staphylococcus*

aureus y *Staphylococcus camorum* (Bassole *et al.* 2003). Otras especies cuyos aceites esenciales muestran propiedades bactericidas son *Lippia gracillis* (Pessoa *et al.* 2005) y *Lippia chevalieri* (Mevy *et al.* 2006).

La especie *Lippia nodiflora* protege del alcohol etílico impidiendo el desarrollo de las úlceras estomacales provocadas por este agente (Khalil *et al.* 2007). Otra especie con propiedades gastroprotectora es *Lippia sidoides*; la cual muestra además propiedades anti-helmíntica frente a *Haemonchus contortus* (Barros *et al.* 2006, Camurca-Vasconcelos *et al.* 2007). Por último, la especie *Lippia berlandieri* presenta una clara actividad antioxidante basada en sus propiedades de secuestro de radicales libres (Rocha-Guzmán *et al.* 2007). Todos estos estudios, y otros no mencionados, demuestran que este género tiene un gran potencial como fuentes de compuestos de utilidad en Farmacología y Cosmética.

LIPPIA ORIGANOIDES

Dentro de la diversidad del género *Lippia*, la especie *Lippia origanoides* es originaria de Sur América, encontrándose principalmente en la región del Amazonas (García 1992, Gupta 1995). En Colombia, se puede encontrar en los departamentos del Cauca, Cundinamarca, Guajira, Magdalena, Santander y Norte de Santander (García-Barriga 1992, Albelsiano 2003).

Esta especie es un arbusto que alcanza una altura de 3.5 metros. Sus hojas presentan una conformación opuesta y decusada, una lamina foliar ovada con ápice redondeado y margen foliar dentado y pubescente (Bandoni *et al.* 2000). Además, las hojas son aromáticas con un olor muy penetrante. Sus flores son axilares y pequeñas con cáliz bifido de color blanco (García 1992). Por su aroma característico, muy similar al del orégano, la especie *Lippia origanoides* se conoce como orégano cimarrón, orégano de cerro, orégano ancho, orégano de monte; y en algunas regiones, se le conoce simplemente como orégano (Bandoni *et al.* 2000, Pascual *et al.* 2001b).



Figura 1. *Lippia origanoides*.

Tradicionalmente, las hojas de *Lippia origanoides* se han usado en la preparación de infusiones para infecciones bronquiales y pulmonares, como antiespasmódico, y para el tratamiento del asma (Pascual *et al.* 2001b). El aceite esencial de *Lippia origanoides* presenta actividad contra microorganismos como: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*,

Candida guilliermondii, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* y *Trychophyton rubrum* (Dos Santos *et al.* 2004, Oliveira *et al.* 2007). Estudios recientes demostraron que el aceite esencial de *Lippia organoides* presenta actividad anti-protozoaria contra *Leishmania chagasi*, el agente causal de la Leishmaniasis (Celis *et al.* 2007) y que inhibe la replicación *in vitro* del Virus de la Fiebre Amarilla (Meneses *et al.* 2009). Adicionalmente, se le encontraron propiedades antioxidantes al aceite relacionadas con su composición química (Celis *et al.* 2007, Stashenko *et al.* 2008).

COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE LIPPIA ORGANOIDES

El aceite esencial de esta especie contiene hidrocarburos tipo monoterpenos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos y sesquiterpenos oxigenados; encontrándose entre los componentes mayoritarios del aceite esencial dos monoterpenos oxigenados isoméricos, el Carvacrol y el Timol (Oliveira *et al.* 2007, Castañeda *et al.* 2007, Ruiz *et al.* 2007). Otros compuestos como el p-cimeno, el β -carifileno y el γ -terpineno también se encuentran en el aceite esencial, pero en menores proporciones (Pascual *et al.* 2001b, Dos Santos *et al.* 2004, Oliveira *et al.* 2007).

La composición química del aceite esencial define los quimiotipos, los cuales se nombran de acuerdo a sus componentes mayoritarios,

encontrándose principalmente en la naturaleza los quimiotipos Timol, Carvacrol, Carvacrol-Timol y p-cymeno (Dos Santos *et al.* 2004, Castañeda *et al.* 2007, Oliveira *et al.* 2007, Stashenko *et al.* 2008).

El Timol y el Carvacrol son monoterpenos oxigenados de fórmula química $C_{10}H_{14}O$, pertenecientes a la clase de los fenilpropanos; que difieren entre sí en la posición de un grupo hidroxilo en el anillo fenólico.

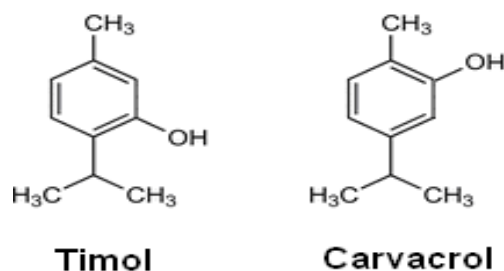


Figura 2. Estructura química del Timol y Carvacrol.

El Timol (2-*isopropil*-5-metilfenol) es un sólido cristalino de color blanco, con una masa de 150,22 g/mol y una densidad de 0,965 g/mL. El Carvacrol (5-*isopropil*-2-metilfenol) es un líquido viscoso de color amarillo claro, su masa es de 150,22 g/mol y su densidad de 0,976 g/mL. Ambos compuestos son ligeramente solubles en agua y muy solubles en alcoholes y solventes orgánicos (Vinzenci *et al.* 2004). Estos compuestos se pueden encontrar además en otras especies de plantas conocidas en conjunto como “Oréganos” como son: *Caridothymus capitatus*, *Thymus capitatus*, *Thymus vulgaris*, *Thymus serpyllum*, *Origanum onites*, *Origanum compactum*, *Origanum vulgare*, *Satureja hortensis*, *Satureja montana*, *Satureja tymbra*, entre otras (Karpouhtsis *et al.* 1998, Mezzoug *et al.* 2007, Ipek *et al.* 2005, Vinzenci *et al.* 2004).

El Timol y el Carvacrol presentan propiedades antimicrobianas frente a las especies *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Lactobacillus*, *Salmonella enterica*, *Salmonella typhii*, *Staphylococcus aureus* y *Shigella sonnei* (Varel 2002, Bagamboula *et al.* 2004, Kuncle *et al.* 2005, Michiels *et al.* 2007, Burt *et al.* 2007); siendo más pronunciado su efecto frente a bacterias que responde positivamente a la tinción de Gram.

Estudios recientes demostraron que el Carvacrol impide la inducción de Intercambio de Cromátidas Hermanas (SCE) producto de la acción del mutágeno Mitomicina C en *Drosophila melanogaster* (Stammati *et al.* 1999, Ipek *et al.* 2003). Este compuesto además inhibe el crecimiento de líneas celulares de cáncer de pulmón (A549) en humanos y de mieloblastomas de ratón que contienen el oncogen N-ras (Koparal & Zeytinoglu 2003, Zeytinoglu 2003). Por su parte, el Timol afecta la biosíntesis de la micotoxina Aflatoxina B1 producida por el hongo *Fusarium verticillioides* (Buyukleyla & Rencuzegullari 2009); uno de los principales carcinógenos presentes en alimentos.

EL SOS CHROMOTEST

El ensayo SOS chromotest fue descrito por Quillardet *et al.* (1982). Este ensayo se basa en la inducción de la respuesta SOS en la enterobacteria *Escherichia coli* (cepa PQ37) por agentes que causan daño en el ADN. Es un ensayo colorimétrico donde la inducción del gen *sfiA* (*sulA*), el cual codifica un péptido involucrado en la formación del septo celular durante su división que es regulado bajo la respuesta

SOS; es monitoreada mediante un gen reportero (β -galactosidasa) que se encuentra fusionado en su promotor en la dirección de la transcripción. La bacteria presenta además una mutación en el gen *uvrA* que la hace deficiente en el mecanismo de reparación por escisión de bases y otra en el gen *rfa* que la hace deficiente en la síntesis de polisacáridos de membrana, permitiéndole mayor permeabilidad al compuesto evaluado (Quillardet *et al.* 1982, Quillardet & Hofnung 1984, Quillardet & Hofnung 1988).

El ensayo es cuantitativo y define un único parámetro (Factor de Inducción SOS o SOSIF), el cual representa la potencia de inducción SOS del compuesto ensayado. Como el SOSIF es una relación entre la actividad enzimática inducida β -galactosidasa y la actividad enzimática constitutiva Fosfatasa Alcalina, este puede ser utilizado aún para rangos de dosis tóxicos del compuesto; dado que los datos son normalizados y corrigen una posible inhibición de la síntesis de proteínas por parte del agente en estudio.

Varios estudios han demostrado que el SOS Chromotest es útil para detección de compuestos mutagénicos y carcinogénicos (Quillardet *et al.* 1985, Von der Hude *et al.* 1988, Ohta *et al.* 1984, Miertus *et al.* 1987, Mersch-Sundermann *et al.* 1994, White & Rasmussen 1996). Adicionalmente, es sensible al daño inducido por agentes físicos como los rayos gamma y UV (Quillardet & Hofnung 1983, Kozubek *et al.* 1990).

El SOS Chromotest presenta varias ventajas respecto a otros ensayos como son: *i)* no requiere de un laboratorio muy especializado, *ii)* es rápido dado que solo se requieren unas horas para obtener los

resultados, *iii*) la muestra no requiere de esterilidad, *iv*) tiene una sensibilidad comparable con ensayos de referencia como el test de Ames, *v*) los resultados son altamente reproducibles, entre otras (Quillardet & Hofnung 1984, Ohta *et al.* 1984, Miertus *et al.* 1987, Quillardet & Hofnung 1988, Von der Hude *et al.* 1988, Mersch-Sundermann *et al.* 1991, Mersch-Sundermann *et al.* 1994, White & Rasmussen 1996, Rosenkranz *et al.* 1999).

BLEOMICINA

La Bleomicina es un antibiótico compuesto por una mezcla de oligopéptidos producidos por la bacteria *Streptomyces verticillus* que ha sido ampliamente usado como antitumoral en la quimioterapia de diferentes tipos de cáncer. El compuesto es considerado un agente radio-mimético debido a que tiene la capacidad de inducir daño en el ADN muy similares a los inducidos por las radiaciones ionizantes; siendo la rotura del enlace fosfodiéster del esqueleto azúcar fosfato de la molécula de ADN el más frecuente (Chen & Stubbe 2005). Este compuesto además inhibe la síntesis de proteínas y causa rompimiento en cadenas de ARN (Abraham *et al.* 2003), induce aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos (Benkhaled *et al.* 2008) y es un potente inductor de la respuesta SOS en *Escherichia coli* (Quillardet *et al.* 1982, Ohta *et al.* 1984, Quillardet *et al.* 1985); razones por las que fue escogido como mutágeno del presente estudio.

2. METODOLOGIA

MATERIAL VEGETAL

Las plantas de *Lippia origanoides* empleadas para la extracción de los aceites esenciales fueron colectadas de las riberas del cañón del Chicamocha (Santander, Colombia) y cosechadas en los cultivos experimentales del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), localizado en el campus de la Universidad Industrial de Santander. La identificación taxonómica de la especie se realizó en el Herbario Nacional Colombiano del Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias (Universidad Nacional de Colombia, Bogotá), por el Dr. José Luis Fernández Alonso, con los vouchers COL519799 y COL516290, quedando muestras permanentes de las plantas en el Herbario Nacional Colombiano y en el Herbario de CENIVAM.

EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

La extracción de los aceites esenciales se realizó a partir de hojas e inflorescencias de la especie *Lippia origanoides* especímenes COL519799 y COL 516290. La técnica empleada para tal fin fue Hidrodestilación Asistida por Radiación Microondas (MWHD) según el procedimiento descrito por Stashenko *et al.* (2004). El equipo de destilación utilizado en el procedimiento es de tipo *Clevenger* con reservorio de destilación *Dean-Stark* y con una adaptación al

calentamiento por radiación de microondas en un horno doméstico marca *LG-Intelowave* (Anexo 1). Se pesaron 300 gramos de material vegetal para la extracción de cada aceite. El tiempo total de extracción fue de 60 min. y ésta se desarrolló de forma fraccionada en cuatro períodos de 15 min. cada uno con intervalos de 5 min. entre ellos. La potencia del horno se fijó a 60% (720W) de su potencia total. Los aceites esenciales obtenidos en las extracciones se almacenaron a 4 °C para su posterior análisis.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Los aceites esenciales se sometieron a un proceso de eliminación del agua que pudo quedar después de la extracción, para esto se añadió al recipiente que los contenía Sulfato de Sodio anhidro (Na_2SO_4) que posteriormente fue retirado. Con los aceites ya deshidratados se procedió a la preparación de la muestra para el análisis cromatográfico, la cual se realizó mezclando 25 μL de aceite esencial y 1 μL de N-tetradecano, y posteriormente, se enrasó con diclorometano a un volumen final de 1mL.

ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

El análisis de los componentes de los AE se realizó por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS). Las muestras fueron inyectadas por triplicado en el cromatógrafo de gases. El equipo utilizado en el análisis fue un *Agilent Technologies 6890 plus Series GC System* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent*

Technologies 5973 Network (con analizador de cuádruplo), equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250°C, relación de *split* 30:1) y un inyector automático *Agilent 7863* (Anexo 2). Se empleó una columna apolar DB5-MS (*J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.*) de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 μm , df, con fase estacionaria de 5% fenilpoli (metilsiloxano). El gas de arrastre utilizado fue helio, con una presión de entrada a la cabeza de la columna 16.47 psi y un flujo constante de 1 mL min⁻¹. La temperatura del horno se programó de manera escalonada con una temperatura inicial de 45 °C durante 5 min., luego se aumentó a 4 °C.min⁻¹ hasta 150 °C y se mantuvo esa temperatura durante 2 min., después se aumentó hasta 250 °C (5min.) a razón de 5 °C.min⁻¹, y finalmente se aumentó hasta 275 °C (15 min.) a razón de 10 °C.min⁻¹ (Figura 4). La temperatura del inyector y el detector fueron 250 °C y 285 °C respectivamente. Los datos cromatográficos y espectrométricos se recopilaron y procesaron en el programa *Hewlett-Packard ChemStation G17001DA* (Versión 00.01.27, 2002).

IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LOS ACEITES

La identificación de los componentes presentes en los aceites esenciales se llevó a cabo teniendo en cuenta los índices de retención (I_k) y el porcentaje de coincidencia con el espectro de masas de la literatura. El Índice de retención de cada compuesto se determinó utilizando el tiempo de retención t_R del compuesto y los tiempos de retención de una serie homóloga de sustancias de referencia (hidrocarburos lineales desde C₈ hasta C₂₅) corridos en GC-MS usando los mismos parámetros operativos que fueron utilizados para los aceites esenciales (Kováts, 1965). Los I_k calculados para cada compuesto

fueron comparados con los I_k reportados en la literatura (Adams, 2007), identificándose el compuesto si el I_k calculado no tenía una variación mayor a 8 unidades respecto al I_k teórico.

$$I_K = 100 \cdot n + 100 \left[\frac{t_{RX} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right] \quad \text{Ecuación 1.}$$

Donde:

n : Numero de átomos de carbono del hidrocarburo que eluye antes del compuesto de interés,

t_{RX} : Tiempo del retención del compuesto de interés (min.),

t_{Rn} : Tiempo del retención del hidrocarburo que eluye antes del compuesto de interés (min.),

t_{RN} : Tiempo del retención del hidrocarburo que eluye después del compuesto de interés (min.).

Los espectros de masas de cada uno de los componentes fueron comparados con los almacenados en las bases de datos Willey 138K y Adams 2005. Para la identificación se tuvo en cuenta los espectros de masas de la literatura que compartieran más del 90% de similitud con los compuestos encontrados en los aceites. Los compuestos que se identificaron con nombres distintos en los dos criterios o no se lograron identificar en alguno de ellos, se definieron como compuestos no identificados (N.I.).

CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LOS ACEITES

Dos parámetros para la cuantificación de los compuestos fueron calculados: el porcentaje relativo y la concentración relativa del compuesto en el aceite. El porcentaje relativo se determinó tomando el área del compuesto en relación con el área total bajo la curva de todo el cromatograma, designada como el 100% del aceite (**Ecuación 2**). Para el cálculo de la concentración relativa se tuvo en cuenta el área del compuesto, el área del todo el cromatograma, el volumen y masa del aceite agregado en la muestra antes de ser inyectada como indica la **Ecuación 3**.

$$\% \text{ relativo} = \frac{A_x \cdot 100}{A_T} \quad \text{Ecuación 2.}$$

$$[]_{\text{relativa}} = \left[\frac{A_x \cdot M_A}{A_T \cdot V_A} \right] \quad \text{Ecuación 3.}$$

Donde:

A_x: Área bajo la curva del pico correspondiente al compuesto de interés,

A_T: Área bajo la curva de todo el cromatograma,

M_A: Masa del aceite incorporada a la muestra cromatográfica,

V_A: Volumen del aceite incorporado a la muestra cromatográfica.

CEPA DE ENSAYO Y CONDICIONES DE CULTIVO

Para el estudio del efecto antigenotóxico de los aceites esenciales de *Lippia organoides* se utilizó como modelo biológico la enterobacteria *Escherichia coli* PQ37 de genotipo: *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*; gentilmente suministrada por la Dra. Montserrat Llagostera Casal del Laboratorio de Genética y Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Barcelona.

El cultivo base para los ensayos biológicos se realizó creciendo la cepa PQ37 en medio Luria Bertani (10 g Triptona, 5 g Extracto de Levadura, 10 g Cloruro de Sodio, pH 7.4) suplementado con ampicilina (50 µg/L) y tetraciclina (17 µg/mL) con agitación (100 rpm) a una temperatura de 37 °C durante toda la noche. Para ello se tomó una alícuota de 2 mL la cepa conservada y se inoculó en 20 mL de medio LB. Al día siguiente, se diluyó el cultivo en medio fresco (2 mL de cultivo crecido en 20 mL), y se dejó crecer bajo idénticas condiciones experimentales a las descritas hasta que alcanzó una densidad óptica DO_{600nm} de 0.4.

ENSAYO DE GENOTOXICIDAD.

El ensayo de genotoxicidad de los aceites esenciales se realizó usando el SOS Chromotest según el procedimiento descrito por Quillardet *et al.* (1982). El cultivo de la cepa PQ37, crecido hasta una DO_{600nm} de 0.4, fue diluido 10 veces en medio LB 2X (1mL del cultivo en 9mL de LB 2X) suplementado con ampicilina a una concentración de 100 µg/mL y tetraciclina a una concentración 34 µg/mL. Este fue dispensado a razón

de 500 μ L por tubo de ensayo tapa rosca PIREX, que contenía igual volumen del aceite esencial en rangos de concentraciones determinados empíricamente o la sustancia química según sea el caso (Tabla 1). Las células fueron expuestas al aceite esencial o sustancia durante 30 min. a 8 °C, con el fin de garantizar la incorporación de las sustancias a las células, y luego se incubaron durante 2 horas a 37 °C para la inducción del gen reportero. En cada experimento se incluyó un control negativo (agua destilada), un control del solvente (Dimetilsulfosido, DMSO) cuando aplica y un control positivo (Bleomicina 1 μ g/mL). La concentración de trabajo del mutágeno Bleomicina se determinó experimentalmente por medio de curva de genotoxicidad. En todos los casos, se desarrollaron al menos tres experimentos independientes.

Tabla 1. Tratamientos utilizados en el ensayo de genotoxicidad de los aceites esenciales de *Lippia origanoides*.

Tratamientos	Células	Aceite esencial	Solvente	Agua Destilada	Bleomicina (1 μ g/mL)
Control (-)	500 μ l	-	-	500 μ l	-
Control solvente	500 μ l	-	500 μ l	-	-
Concentración 1	500 μ l	500 μ l	-	-	-
Concentración 2	500 μ l	500 μ l	-	-	-
Concentración 3	500 μ l	500 μ l	-	-	-
Concentración 4	500 μ l	500 μ l	-	-	-
Concentración 5	500 μ l	500 μ l	-	-	-
Concentración 6	500 μ l	500 μ l	-	-	-
Control (+)	500 μ l	-	-	-	500 μ l

Ensayos Enzimáticos. Los ensayos enzimáticos β -galactosidasa y fosfatasa alcalina se desarrollaron para cada experimento por triplicado y siguiendo el procedimiento descrito a continuación.

Ensayo Enzimático β -Galactosidasa (β g). En tubos de ensayo que contenían 1,42 mL de Buffer Z (Na_2HPO_4 60 mM, NaH_2PO_4 40 mM, KCl 10 mM, Mg_2SO_4 1 mM, SDS 0.1%, β -mercaptoetanol 40 mM, pH 7.0) se le adicionaron 150 μL de células de cada tratamiento y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente para que ocurra la lisis celular. Posteriormente, se adicionaron 300 μL de la solución Stock del sustrato β -galactosidasa (2-nitrofenil- β -D-galactopiranosido, ONPG) preparado a 4 mg/mL en Buffer T (Tris-HCL 1M pH 8.8), y se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente para desarrollo del color. La reacción se detuvo añadiendo 500 μL de la solución de Na_2CO_3 (1M) y, posteriormente se estabilizó adicionando 500 μL de la solución TRIS (2M). Por último, se homogenizó la mezcla de reacción y se desarrolló la lectura de cada tubo a $\text{DO}_{420 \text{ nm}}$ en un espectrofotómetro *HACH DR/2000 Spectrophotometer*.

Ensayo Enzimático Fosfatasa Alcalina (FA). En tubos de ensayo que contenían 70 μL de cloroformo, 50 μL de SDS (0.1 %) y 1300 μL de Buffer T se le adicionaron 150 μL de células de cada tratamiento y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente para que ocurra la lisis celular. Posteriormente, se adicionaron 300 μL de la solución Stock del sustrato de la fosfatasa alcalina (4-nitrofenil fosfato, PNPP) preparado a 4 mg/mL en Buffer T, y se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente para desarrollo color. La reacción se detuvo añadiendo 500 μL de la solución de HCl (2M) y, posteriormente se estabilizó adicionando 500 μL de la solución TRIS (2M). Por último, se homogenizó la mezcla de reacción y se desarrolló la lectura de cada

tubo a DO_{420 nm} en un espectrofotómetro *HACH DR/2000*.

Cálculo del Factor de Inducción SOS. El criterio de genotoxicidad usado fue el factor de inducción SOS (SOSIF); el cual se calcula para cada concentración del compuesto evaluado según la siguiente ecuación:

$$SOSIF = \frac{\left[\frac{\beta G (tto)}{\beta G (C-)} \right]}{\left[\frac{FA (tto)}{FA (C-)} \right]} \quad \text{Ecuación 4.}$$

Donde:

βG: Actividad enzimática β-galactosidasa;

FA: Actividad enzimática Fosfatasa Alcalina;

Tto: Tratamientos con el compuesto evaluado;

C- : Control negativo del experimento.

La interpretación de los resultados se realiza considerando los valores del SOSIF menores de 1.5 como “no genotóxico”, entre 1.5 – 2.0 “inconclusos”, y mayores de 2.0 y una clara relación dosis-respuesta “genotóxico”.

ENSAYO DE ANTIGENOTOXICIDAD

La antigenotoxicidad de los aceites esenciales de *Lippia origanoides* y de sus componentes mayoritarios frente al mutágeno Bleomicina se realizó de acuerdo a lo descrito por Fuentes *et al.* (2006). Los aceites esenciales o compuestos se evaluaron en procedimientos de co-incubación donde se mezclaron diferentes concentraciones de los mismos con el mutágeno.

Para tales ensayos, se tomaron 9 mL del cultivo de la cepa PQ37 diluido 10 veces en medio LB 2X y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min. Las células (pellet) se re-suspendieron en LB 2X suplementado con Bleomicina 2 µg/mL y se dispensaron a razón de 500 µL en tubos de ensayo que contenían igual cantidad de compuesto en estudio. El tiempo de exposición fue de 30 minutos a 8°C, y el tiempo de recuperación de la bacteria fue de 2 horas a 37 °C. Para cada concentración se desarrollaron al menos 3 experimentos independientes. Las mediciones de la actividad enzimática β-galactosidasa (**βG**) y de la actividad enzimática Fosfatasa Alcalina (**FA**) se desarrollaron siguiendo los procedimientos anteriormente descritos.

El criterio de antigenotoxicidad. Como criterio de antigenotoxicidad se usó el porcentaje de inhibición de genotoxicidad (%IG), el cual representa la capacidad de protección del ADN por la sustancia probada y se calcula para cada tratamiento según la siguiente ecuación:

$$\%IG = 1 - \frac{SOSIF_{CO} - SOSIF_{BASAL}}{SOSIF_{BLEO} - SOSIF_{BASAL}} \times 100 \quad \text{Ecuación 6.}$$

Donde:

SOSIF_{co}: Es el factor de inducción SOS en las células co-tratadas (sustancia + Bleomicina)

SOSIF_{BASAL}: Es el factor de inducción SOS basal

SOSIF_{BLEO}: Es el factor de inducción SOS en las células tratadas con Bleomicina.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Para todos los tratamientos se calculó los valores medios de SOSIF y sus correspondientes errores estándares. La normalidad de los datos se comprobó mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza de los datos por medio de una prueba de F-máxima. Las diferencias entre tratamientos se constataron usando un ANOVA de clasificación simple. Los valores medios fueron comparados usando una prueba *t*-student. La relación dosis respuesta en el análisis de genotoxicidad se comprobó por medio de un análisis de correlación producto-momento (correlación de Pearson). En todos los análisis se usó el paquete estadístico STATISTICA V.6 (StatSoft Inc, 2003) y una significación, $p < 0.05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los especímenes de la especie *Lippia origanoides* objeto de estudio (A: COL519799 y B: COL516290), mostraron diferencias en el rendimiento de sus aceites esenciales extraídos mediante la técnica hidrodestilación asistida por radiación microondas. El rendimiento se expresó como el porcentaje de la relación entre el peso en gramos del AE y del material vegetal de partida; y este fue de 1.4 % para el espécimen A y de 2.0 % para el espécimen B. Las densidades para los aceites de los especímenes A y B, estimadas con picnómetro de 9,814 mL (BRAND, Wertheim, Alemania) calibrado a una temperatura de 20°C, fueron de 0,949 g/mL y 0,946 g/mL, respectivamente.

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los compuestos identificados en los aceites esenciales de *Lippia origanoides* mediante un análisis de GC-MS considerando el orden de elución en la columna DB-5MS son presentados en la Tabla 2. Los especímenes A y B presentan en su aceite esencial 35 y 36 compuestos respectivamente, lográndose identificar más del 90% de los componentes de los aceites. No se pudieron identificar cuatro compuestos con índices de retención calculados (I_{k_c}) en 1011, 1033, 1394 y 1437.

Tabla 2. Composición química de los aceites esenciales de *Lippia organoides* obtenidos por la técnica Hidrodestilación Asistida por Radiación Microonda.

No.	Compuesto	I _{kE}	Especimen A (COL519799)				Especimen B (COL516290)			
			%C _{MS}	I _{kC}	%	Conc.	%C _{MS}	I _{kC}	%	Conc.
1	α -Tujeno	930	91	928	1,21	11,5	91	928	1,32	12,5
2	α -Pineno	939	94	936	0,37	3,5	94	936	0,33	3,1
3	Canfeno	954	97	954	0,04	0,4	96	954	0,03	0,3
4	Sabineno	975	94	976	0,03	0,3	93	976	0,06	0,6
5	β -Pineno	979	96	982	0,17	1,6	95	982	0,18	1,7
6	Mirceno	990	94	990	3,56	33,7	93	990	2,97	28,1
7	α -Felandreno	1002	94	1007	0,20	1,9	94	1009	0,24	2,3
8	α -Terpineno	1017	95	1019	2,15	20,4	95	1017	2,37	22,4
9	p-Cimeno	1024	94	1028	8,41	79,8	95	1027	9,31	88,1
10	Limoneno	1029	90	1031	1,03	9,8	94	1030	0,84	8,0
11	1,8-Cineol	1033	95	1035	1,18	11,2	-	-	-	-
12	<i>trans</i> - β -Ocimeno	1050	94	1045	0,25	2,4	95	1044	0,23	2,2
13	γ -Terpineno	1059	96	1060	7,32	69,5	96	1060	9,09	86,0
14	<i>cis</i> -Hidrato de Sabineno	1070	96	1072	0,64	6,1	97	1071	0,47	4,5
15	Terpinoleno	1088	94	1085	0,26	2,5	95	1085	0,09	0,8
16	ρ -Cimeneno	1091	93	1090	0,11	1,0	92	1090	0,06	0,6
17	Linalol	1096	90	1096	0,26	2,4	92	1096	0,34	3,2
18	<i>trans</i> -Hidrato de Sabineno	1098	94	1103	0,21	2,0	93	1102	0,10	0,9
19	Umbellulona	1171	-	-	-	-	95	1177	0,11	1,0
20	4-Terpineol	1177	93	1185	1,08	10,2	94	1184	0,84	7,9
21	Timol metil éter	1235	95	1228	2,66	25,3	92	1228	2,27	21,4

Tabla 2, Continuación.

22	Carvacrol metil éter	1244	-	-	-	-	96	1238	0,14	1,3
23	Timol	1290	91	1297	59,64	566,0	91	1296	34,47	326,1
24	Carvacrol	1298	-	-	-	-	93	1301	25,80	244,1
25	Timol acetato	1352	95	1346	1,59	15,1	95	1347	0,68	6,4
26	<i>trans</i> -Cariofileno	1418	99	1433	4,26	40,4	99	1432	3,41	32,2
27	<i>trans</i> - α -Bergamoteno	1434	98	1439	0,88	8,4	98	1439	0,53	5,0
28	α -Humuleno	1454	98	1468	2,28	21,6	98	1468	1,93	18,3
29	γ -Muuroleno	1479	92	1484	0,22	2,1	-	-	-	-
30	Germacreno D	1485	-	-	-	-	98	1492	0,14	1,3
31	β -Bisaboleno	1505	97	1511	0,26	2,4	97	1512	0,31	2,9
32	β -Alaskeno	1498	-	-	-	-	96	1521	0,05	0,5
33	α -Alaskeno	1512	94	1521	0,05	0,5	-	-	-	-
34	γ -Cadineno	1513	97	1523	0,04	0,3	-	-	-	-
35	δ -Cadineno	1523	97	1525	0,06	0,6	93	1526	0,04	0,4
36	<i>trans</i> - γ -Bisaboleno	1531	97	1532	0,08	0,8	94	1532	0,08	0,7

Ik_E, Índice de retención (Índice de Kovats) esperado de acuerdo con Adams (2007). **%C_{MS}**, Porcentaje de concordancia con el espectro de masas correspondiente al compuesto en la base de datos Adams. **Ik_C**, Valores calculados para el índice de retención (Kovats, 1965) de un mínimo de tres cromatogramas independientes. **%**, Porcentaje del compuesto basado en el área del cromatograma. **Conc.**, Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de cada compuesto estimada a partir de la densidad de cada aceite esencial.

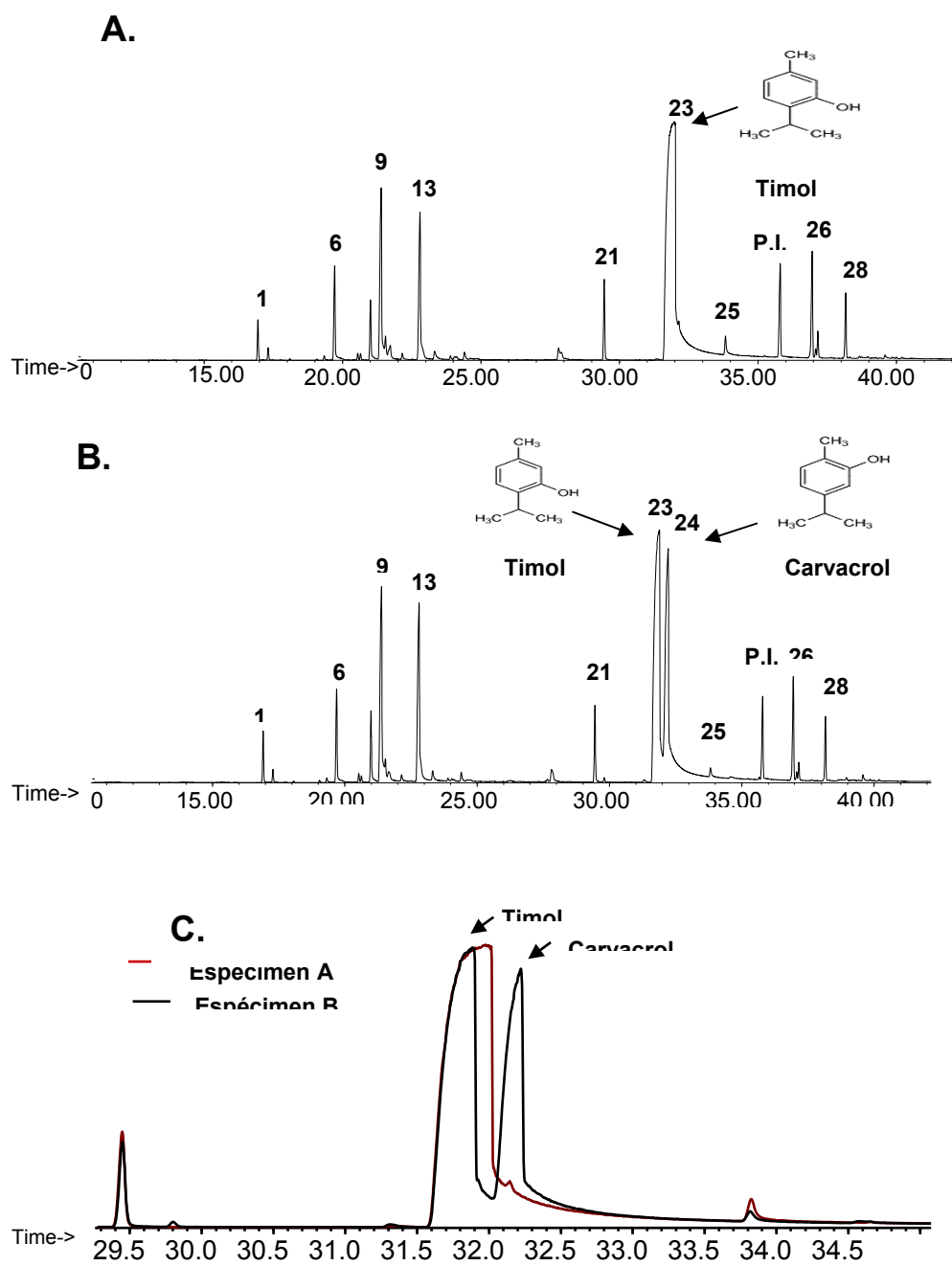


Figura 3. Perfiles cromatográficos de los aceites esenciales de *Lippia organoides*. **A.** Especimen A, **B.** Especimen B, **C.** Comparación de los perfiles cromatográficos de los dos especímenes.

El análisis de la composición química de los aceites esenciales extraídos de dos especímenes de *Lippia origanoides* muestra que los componentes que se encuentran en mayor proporción en los aceites esenciales corresponden a los monoterpenos oxigenados timol, carvacrol, p-cimeno y γ-terpineno (Tabla 2.). Se observó que los aceites esenciales de la especie *Lippia origanoides* comparten alrededor del 87% (27 compuestos) de sus componentes químicos. Estos contienen compuestos monoterpenos, monoterpenos oxigenados y sesquiterpenos. El espécimen A presenta un alto contenido de Timol (~60%) y el espécimen B se caracterizó por presentar proporciones altas de Timol (~34%) y Carvacrol (~26%). En ninguno de los especímenes se encontraron sesquiterpenos oxigenados (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de los compuestos presentes en los aceites esenciales de *Lippia origanoides*.

Clase de compuesto	Espécimen A	Espécimen B
	%	%
Hidrocarburos monoterpénicos	39,4	36,1
Monoterpenos oxigenados	27,3	30,6
Hidrocarburos sesquiterpénicos	27,2	22,2
Sesquiterpenos oxigenados	0,0	0,0
Otros no identificados	6,0	11,1
Total	100	100

Distintos estudios sobre la composición química de los aceites esenciales de *Lippia origanoides* se encuentran en la literatura, estos son presentados en la Tabla 4. Basado en la proporción del constituyente mayoritario dentro de los aceites, se evidencian la existencia de tres quimiotipos en la naturaleza: i) Quimiotipo A que presentan como

compuesto mayoritario el carvacrol, *ii*) Quimiotipo B caracterizado por su alto contenido de timol, *iii*) Quimiotipo C que se distingue de los demás por la ausencia del timol y carvacrol, pero con ρ -Cimeno y 1,8-Cineol como compuestos mayoritarios. De acuerdo con esta clasificación planteada los especímenes COL519799 y COL516290 corresponden al Quimiotipo B.

Tabla 4. Quimiotipos de *Lippia organoides* basados en el porcentaje de los constituyentes mayoritarios reportados por la literatura.

Quimiotipos	Constituyentes Mayoritarios (%)					Referencias
	Carvacrol	Timol	ρ -Cimeno	1,8-Cineol	γ -Terpineno	
A	33-43	5-8	-	-	8-10	Dos Santos <i>et al.</i> (2004)
	~ 39	~ 18	~ 10	-	-	Oliveira <i>et al.</i> (2007)
	44-52	7-14	9-10	-	7-10	Stashenko <i>et al.</i> (2008)
B	8-17	48-62	-	-	-	Rojas <i>et al.</i> (2006)
	-	~ 60	~ 8	-	~ 7	En este trabajo
	~ 26	~ 34	~ 9	-	~ 9	En este trabajo
C	-	-	11-16	7-11	-	Stashenko <i>et al.</i> (2008)

Solo se consideraron los compuestos con un porcentaje mayor a 5%. Orden de los quimiotipos se asigno teniendo en cuenta la potencial utilidad como Orégano en condimentos por su alta fracción de carvacrol.

Los datos reportados en la literatura y los obtenidos en este trabajo muestran diferentes composiciones químicas de los aceites esenciales de *Lippia organoides*, aunque en su mayoría presentan los mismos compuestos mayoritarios con variaciones en las proporciones relativas de estos en los aceites.

Estudios sugieren que la existencia de quimiotipos en la especie *Lippia organoides* está influenciada por los factores intrínsecos a la planta,

como las condiciones de cultivo, factores ambientales, estado vegetativo, tipo de suelo, entre otros (Dos Santos *et al.* 2004). En este estudio se encontró diferencias en la proporción del carvacrol en especímenes de *Lippia organoides* con similar origen (rivera del Cañón de Chicamocha, Santander, Colombia) y propagados bajo las mismas condiciones climáticas (campus de la Universidad Industrial de Santander). Este resultado sugiere, que otros factores diferentes a los ya mencionados pueden influir en la composición química de los aceites esenciales. Estudios sobre la composición química de especímenes de *Lippia organoides* sometidos a micro-propagación *in vitro* deberían proporcionar nueva información sobre los factores que influyen en la planta para que ocurra esta variación química en el aceite.

ENSAYO DE GENOTOXICIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES

Antes de realizar los ensayos de antigenotoxicidad de los aceites esenciales, se comprobó que estos no producen daños genéticos que induzcan la respuesta SOS en *Escherichia coli* PQ37 (Tabla 5). Se evaluaron nueve concentraciones diferentes de los aceites esenciales (1.8 – 475.0 mg/mL) y siempre se incluyeron en los experimentos un control negativo (agua destilada), un control del solvente (DMSO) y un control positivo (1 µg/mL de Bleomicina).

Tabla 5. Análisis de genotoxicidad de los aceites esenciales de *L. organoides* en *Escherichia coli* PQ37.

Tratamientos	Especímenes †	
	A	B
Agua Destilada	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.3
Bleomicina (1µg/mL)	5.1 ± 1.3 *	5.3 ± 1.0 *
Dimetilsulfosido	0.9 ± 0.4 n.s	0.7 ± 0.3 n.s
AE (475.0 mg/mL)	0.3 ± 0.1 *	1.2 ± 0.3 n.s
AE (237.5 mg/mL)	0.2 ± 0.1 *	1.1 ± 0.3 n.s
AE (118.7 mg/mL)	0.2 ± 0.0 *	0.6 ± 0.3 n.s
AE (59.3 mg/mL)	0.3 ± 0.1 *	0.6 ± 0.2 *
AE (29.7 mg/mL)	0.3 ± 0.1 *	0.2 ± 0.0 *
AE (14.8 mg/mL)	0.4 ± 0.2 *	0.2 ± 0.0 *
AE (7.4 mg/mL)	0.4 ± 0.2 *	0.2 ± 0.0 *
AE (3.7 mg/mL)	0.4 ± 0.2 *	0.3 ± 0.1 *
AE (1.8 mg/mL)	0.7 ± 0.1 n.s	0.6 ± 0.3 n.s

†, Se presentan los valores medios de Factor de inducción SOS, y sus correspondientes errores estándar. *, Se encontró una diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto a la dosis cero (Control negativo) usando el test t-Student's. **n.s.**, No se encontró diferencia significativa respecto a la dosis cero.

Los aceites esenciales de *Lippia origanoides* no indujeron genotoxicidad en el ensayo para el rango de dosis evaluado. Por el contrario, se observó que la mayoría de las dosis evaluadas de los aceites de ambos especímenes (A y B) mostraron valores menores a la unidad; sugiriendo su potencial antigenotóxico. Similarmente, el valor de SOSIF para el solvente (Dimetilsulfosido) no mostró diferencia significativa respecto al control negativo del experimento. Solo el control positivo mostró incrementos significativos en el valor del SOSIF. Estos resultados permiten concluir, que bajo las condiciones experimentales ensayadas los aceites esenciales no inducen daños genéticos en el modelo experimental usado en el presente estudio.

Este resultado es consistente con el que se obtuvo para los aceites esenciales de las especies del Orégano (*O. compactum*, *O. onites* y *O.*

vulgare) en el ensayo de Ames, usando *Salmonella typhimurium* (Adam *et al.* 1998, Ipek *et al.* 2005) y en el ensayo de mutación somática y recombinación (SMART) en *Drosophila melanogaster* (Karpouhtsis *et al.* 1998, Mezzoug *et al.* 2007), donde no se encontró un efecto adverso de estos aceites esenciales sobre el ADN. Estos aceites al igual que los analizados en este estudio presentan altos contenidos de timol y carvacrol.

No obstante, en la literatura se encuentra información ambigua e incompleta sobre la genotoxicidad del timol y carvacrol. Karpouhtsis *et al.* (1998) demostró que el timol presenta un efecto genotóxico en el ensayo SMART en *Drosophila melanogaster* en una de las dosis ensayadas (dosis DL₅₀), pero no demostró una relación dosis respuesta de este en el ensayo. Este resultado a altas dosis probablemente refleja algunos efectos secundarios causados por la toxicidad de este compuesto en lugar de un efecto genotóxico. En el ensayo SOS Chromotest, el timol y carvacrol se reportaron como compuestos no genotóxicos a dosis no tóxicas en presencia y ausencia de activación metabólica (Stammati *et al.* 1999). Estos autores también observaron que el timol y el carvacrol aumentan el número de revertantes en el ensayo de Ames entre 1,5 -1,7 veces más que el observado para el nivel basal, incremento que generalmente no es considerado como significativo. Otro estudio realizado encontró que el carvacrol no induce el intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos (Ipek *et al.* 2003). Considerando el criterio de genotoxicidad que es aceptado comúnmente (i.e., un incremento significativo en al menos el doble del daño basal y una clara relación dosis-respuesta entre el compuesto y el índice de genotoxicidad) todos los resultados mencionados anteriormente se podrían considerar como no genotóxicos. Sin

embargo, trabajos recientes demuestran obvios efectos mutagénicos por parte del timol y carvacrol usando diferentes ensayos de genotoxicidad (Ipek *et al.* 2005, Aydin *et al.* 2005, Buyukleyla and Rencuzogullari 2009). En este punto es necesario normalizar y armonizar el uso de baterías de ensayo *in vitro* e *in vivo* que evalúen diferentes niveles de expresión de daño en el DNA de estos compuestos.

ENSAYO DE ANTIGENOTOXICIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES

La genotoxicidad de la Bleomicina en *Escherichia coli* PQ37 fue ensayada con el fin de determinar la dosis óptima para llevar a cabo el estudio de antigenotoxicidad (Tabla 6). Se estudió un rango de dosis de Bleomicina entre 62 ng/mL a 2000 ng/mL. Se usó siempre agua destilada como control negativo. Los valores medios de Factor de inducción SOS (SOSIF), se calcularon a partir de un mínimo de tres experimentos independientes con tres replicas cada uno.

Tabla 6. Genotoxicidad inducida por la Bleomicina en *Escherichia coli* PQ37.

Dosis (ng/mL)	SOSIF [†]
0	1.1 ± 0.4
62	1.1 ± 0.2 n.s
125	1.1 ± 0.1 n.s
250	3.9 ± 1.2 *
500	6.1 ± 2.5 *
1000	6.0 ± 0.7 *
2000	6.8 ± 0.7 *

†, Valores medios de Factor de Inducción SOS y sus correspondientes errores estándar. *, Se encontró una diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto a la dosis cero (Control negativo) usando el test t-Student's. n.s., No se encontró diferencia significativa respecto a la dosis cero.

Los valores de SOSIF mostraron un incremento dependiente de la concentración de Bleomicina; siendo significativo a partir de 250 ng/mL. Con base en estos resultados, se eligió la dosis de 1µg/mL de Bleomicina para los estudios de antigenotoxicidad, considerando que esta dosis presenta un aumento del SOSIF cercano a seis veces el valor basal. Definida la concentración de trabajo de la Bleomicina, se procedió a evaluar si diferentes solventes orgánicos usados para diluir aceites esenciales interfieren con la inducción de daño por Bleomicina en el SOS Chromotest. Dado que la Bleomicina produce roturas en el ADN por un mecanismo de inducción de radicales (Claussen y Long 1999) y que se ha indicado efecto antioxidante para muchos solventes orgánicos, en el presente trabajo se desarrollaron unos ensayos con el fin de escoger aquel solvente que no interfiere con el SOSIF de la Bleomicina y de esta manera poder evaluar la antigenotoxicidad producida por el aceite esencial.

Tabla 7. Efecto de los diferentes solventes sobre la genotoxicidad inducida por la Bleomicina en *Escherichia coli* PQ37.

Tratamientos celulares	SOSIF[†] (%IG)
Agua destilada (control negativo)	0.9 ± 0.1
Agua destilada + 1µg/mL de bleomicina (C. negativo)	5.8 ± 0.4
Acetona	0.4 ± 0.2
Acetona + 1µg/mL de bleomicina	0.3 ± 0.1 (100 %) *
Tetracloruro de carbono	0.9 ± 0.3
Tetracloruro de carbono + 1µg/mL de bleomicina	0.9 ± 0.2 (100 %) *
Diclorometano	0.9 ± 0.3
Diclorometano + 1µg/mL de bleomicina	0.9 ± 0.2 (100 %) *
Dimetilsulfosido	1.1 ± 0.2
Dimetilsulfosido + 1µg/mL de bleomicina	0.8 ± 0.4 (100 %) *
Etanol	1.1 ± 0.2
Etanol + 1µg/mL de bleomicina	2.8 ± 0.6 (61 %) *
Éter	0.7 ± 0.3
Éter + 1µg/mL de bleomicina	0.6 ± 0.2 (100 %) *
Metanol	1.2 ± 0.3
Metanol + 1µg/mL de bleomicina	1.1 ± 0.4 (96 %) *

†, Valores medios del Factor de inducción SOS y sus correspondientes errores estándar. %IG, Porcentaje de inhibición de genotoxicidad *, Se encontró una diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al Control negativo usando el test t-Student's. n.s., No se encontró diferencia significativa respecto al Control negativo.

Los resultados obtenidos de estos ensayos son presentados en la Tabla 7. Todos los solventes evaluados inhibieron significativamente el efecto genotóxico de la Bleomicina en el SOS Chromotest, aunque en diferente magnitud (varió entre 61-100 % de inhibición); siendo el etanol el solvente de menor efecto. Teniendo en cuenta estos resultados, se escoge el agua destilada como solvente para la preparación de las distintas diluciones de los aceites esenciales; a pesar de que su solubilidad fue parcial. Nueve densidades de las fracciones acuosas de los aceites esenciales fueron ensayadas para su antigenotoxicidad. Se evaluó además, un control positivo (Bleomicina 1 µg/mL) y el control negativo (agua destilada). Los extractos de AE de los especímenes de *Lippia origanoides* estudiados, mostraron una reducción significativa del

efecto genotóxico de la Bleomicina para un rango de concentración entre 7.4 y 475.0 g/mL (Tabla 8).

Tabla 8. Antigenotoxicidad de los extractos acuosos de los aceites esenciales de *L. origanoides* contra el daño producido por la Bleomicina en *Escherichia coli* PQ37.

Tratamientos celulares	SOSIF [†] (%IG)	
	Espécimen A (COL519799)	Espécimen B (COL516290)
Agua destilada (control negativo)	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.3
Bleomicina (control positivo)	8.5 ± 1.6	5.4 ± 1.7
AE (475.0 mg/mL)	0.3 ± 0.1	1.2 ± 0.3
AE (475.0 mg/mL) + Bleomicina	0.3 ± 0.1 (100 %) *	0.6 ± 0.1 (100 %) *
AE (237.5 mg/mL) + Bleomicina	0.6 ± 0.3 (100 %) *	0.6 ± 0.2 (100 %) *
AE (118.7 mg/mL) + Bleomicina	0.6 ± 0.2 (100 %) *	0.6 ± 0.3 (100 %) *
AE (59.3 mg/mL) + Bleomicina	1.4 ± 0.5 (96 %) *	0.7 ± 0.2 (100 %) *
AE (29.7 mg/mL) + Bleomicina	2.0 ± 1.0 (88 %) *	1.1 ± 0.3 (100 %) *
AE (14.8 mg/mL) + Bleomicina	2.3 ± 0.9 (84 %) *	1.5 ± 0.8 (91 %) *
AE (7.4 mg/mL) + Bleomicina	4.4 ± 1.7 (55 %) *	2.4 ± 1.3 (70 %) *
AE (3.7 mg/mL) + Bleomicina	7.0 ± 1.6 (20 %)	5.0 ± 2.5 (9 %)
	n.s	n.s
AE (1.8 mg/mL) + Bleomicina	9.2 ± 1.2 (0 %)	5.8 ± 3.2 (0 %)
	n.s	n.s

†, Concentración de los extractos acuosos del aceite calculada a partir de su densidad. , Valores medios de SOSIF y sus correspondientes errores estándar. %IG, Porcentaje de inhibición *, Se encontró una diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al Control positivo usando el test t-Student's. n.s., No se encontró diferencia significativa respecto al Control positivo.

Los valores de Porcentajes de Inhibición de la Genotoxicidad (%IG) incrementaron con la dosis de los extractos de aceites esenciales, sugiriendo que los compuestos antigenotóxicos de estos tienen un mecanismo directo de acción antigenotóxica. El extracto del aceite esencial extraído del espécimen A mostró inhibición completa de la genotoxicidad en un rango de dosis entre 118.7 y 475.0 g/mL, mientras

que en el espécimen B dicho efecto se observó para un rango de dosis entre 29.7 y 475.0 g/mL. Este resultado sugiere que la mayor actividad antígenotóxica de los extractos del aceite esencial del espécimen B puede originar de la acción sinérgica de más de un compuesto; posiblemente de sus compuestos mayoritarios Timol y Carvacrol.

IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS TIMOL Y CARVACROL EN LA FRACCIÓN ACUOSA

La primeras evidencias que soportan que el Timol y Carvacrol son los compuestos responsables del efecto antígenotóxico detectado en los extractos acuosos de los aceites esenciales de *Lippia origanoides* son presentadas en las Figuras 4 y 5. Estas resumen los resultados de un análisis de cromatografía de gases cualitativo de los aceites esenciales de *Lippia origanoides* extraídos por hidroddestilación asistida con microondas y de sus fracciones acuosas. Para su análisis cromatográfico, fue necesario someter las muestras acuosas a una extracción líquido-líquido usando una mezcla de diclorometano/acetato de etilo (9:1) con el fin de recuperar en una matriz orgánica los compuestos presentes en la fracción acuosa. La preparación de la muestra de los aceites esenciales para el análisis cromatográfico se desarrolló como lo indicado en materiales y métodos, solo que sustituyendo el solvente por el usado en la extracción (mezcla diclorometano/acetato de etilo).

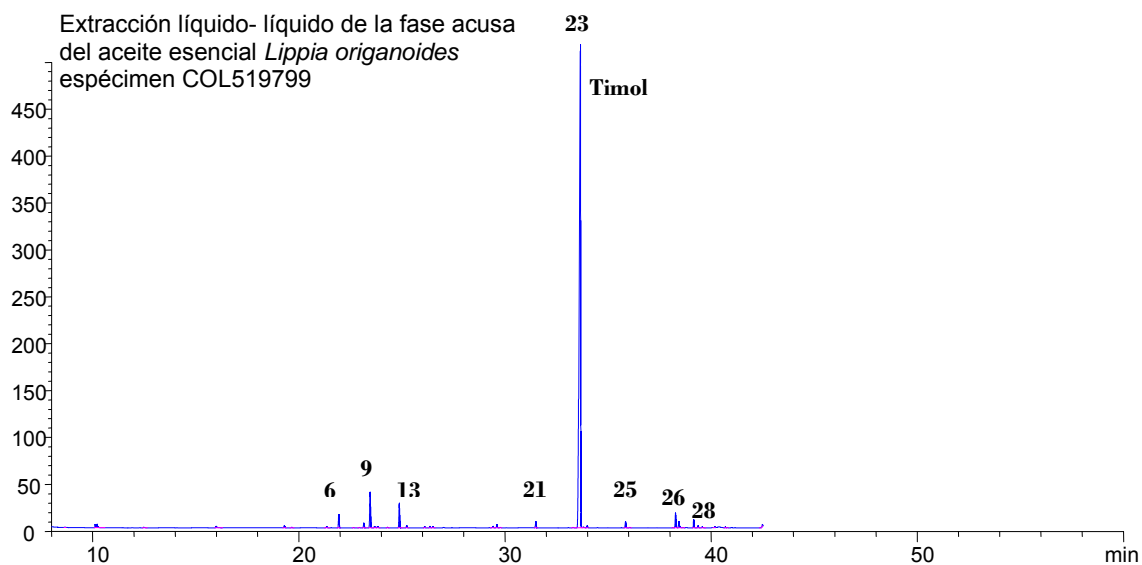
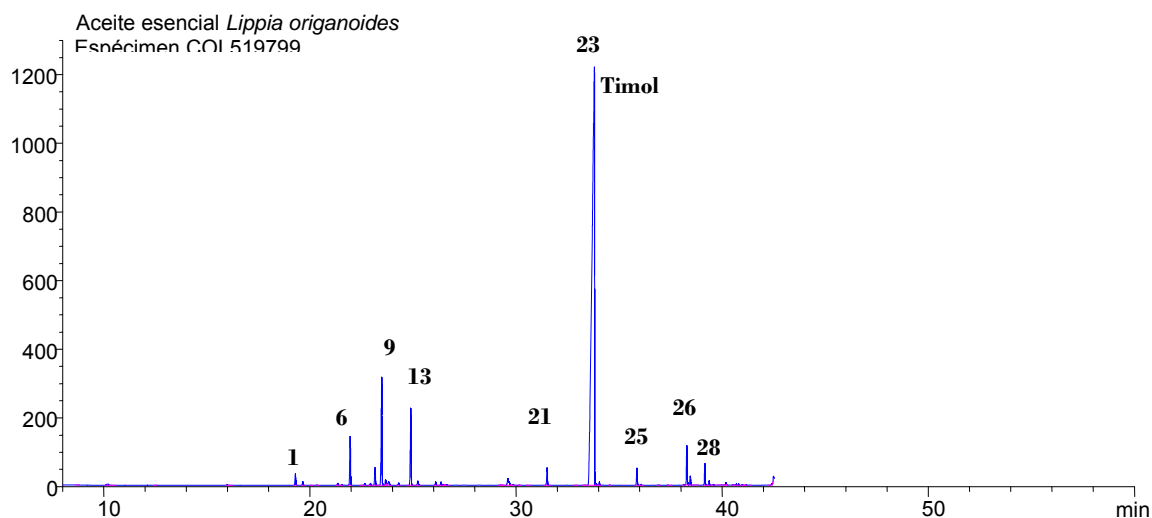


Figura 4. Perfiles cromatográficos del aceite esencial y de la extracción líquido-líquido de *Lippia organoides* espécimen A (COL519799). Se utilizó un cromatógrafo *Agilent Technologies 7890A plus Series GC System*, inyección manual en modo *split/splitless*, con detector de ionización de llama (FID).

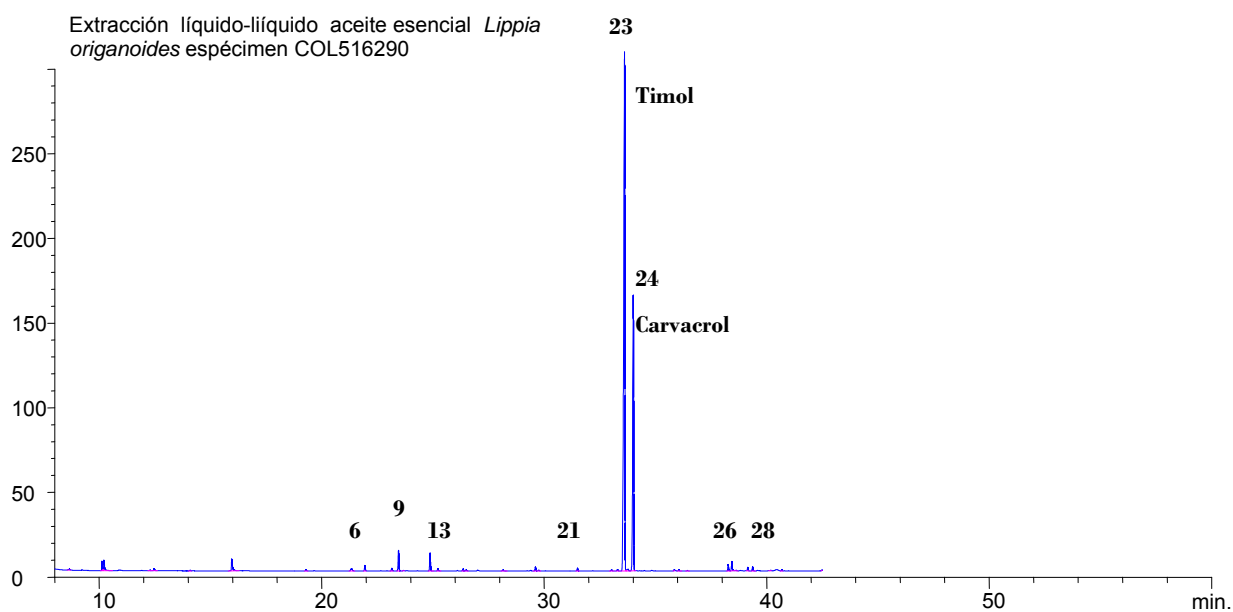
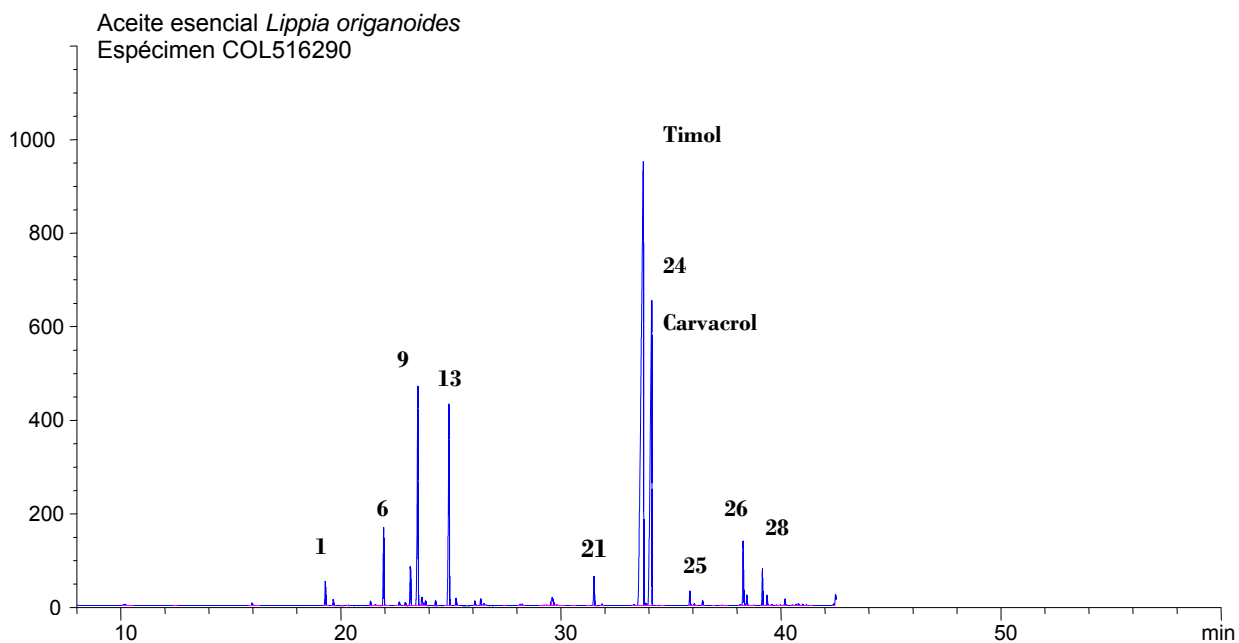


Figura 5. Perfiles cromatográficos del aceite esencial y de la extracción líquido-líquido de *Lippia origanoides* espécimen B (COL516290). Se utilizó un cromatógrafo Agilent Technologies 7890A plus Series GC System, inyección manual en modo split/splitless, con detector de ionización de llama (FID).

Como se indica en la Figuras 4 y 5, la identificación de los picos cromatográficos correspondientes al Timol y Carvacrol en los extractos acuosos se realizó comparando estos picos con los del patrón de Timol-Carvacrol (preparado a 12200 ppm) corrido bajo las mismas condiciones cromatográficas. Los demás compuestos observados en la fase acuosa se enumeraron respetando el orden de elución obtenido en el análisis de GC-MS. El análisis de cromatografía de gases cualitativo demostró que al igual que los aceites esenciales de la especie *L. origanoides* extraídos por hidrodestilación, su fracción acuosa contiene al Timol y Carvacrol como compuestos mayoritarios.

ENSAYO DE ANTIGENOTOXICIDAD DEL TIMOL Y EL CARVACROL

Con el fin de confirmar la hipótesis de que los compuestos mayoritarios (Timol y Carvacrol) de los extractos acuosos de los aceites esenciales de *Lippia origanoides*, son los responsables del efecto antígeno tóxico detectado contra la Bleomicina, se evaluó la antigenotoxicidad del Timol y Carvacrol frente a este mutágeno (Tabla 9).

Tabla 9. Antigenotoxicidad de Timol y Carvacrol contra el daño inducido por la Bleomicina en *Escherichia coli* PQ37.

Tratamientos	SOSIF[†] (%IG)
Agua destilada (control negativo)	1.0 ± 0.2
Bleomicina (control positivo)	7.4 ± 1.0
Timol (137.0 mg/mL) + Bleomicina	0.5 ± 0.2 (100 %) *
Timol (68.5 mg/mL) + Bleomicina	0.8 ± 0.2 (100 %) *
Timol (34.2 mg/mL) + Bleomicina	1.0 ± 0.3 (100 %) *
Timol (17.1 mg/mL) + Bleomicina	1.4 ± 0.4 (94 %) *
Timol (8.6 mg/mL) + Bleomicina	1.8 ± 0.8 (87 %) *
Timol (4.3 mg/mL) + Bleomicina	3.9 ± 1.3 (55 %) *
Timol (2.1 mg/mL) + Bleomicina	7.3 ± 1.6 (2 %) n.s
Timol (1.1 mg/mL) + Bleomicina	7.7 ± 1.1 (0 %) n.s
Carvacrol (122.0 mg/mL) + Bleomicina	1.1 ± 0.5 (98 %) *
Carvacrol (61.0 mg/mL) + Bleomicina	1.2 ± 0.7 (97 %) *
Carvacrol (30.5 mg/mL) + Bleomicina	1.3 ± 0.7 (95 %) *
Carvacrol (15.2 mg/mL) + Bleomicina	1.7 ± 0.7 (89 %) *
Carvacrol (7.6 mg/mL) + Bleomicina	4.2 ± 0.9 (50 %) *
Carvacrol (3.8 mg/mL) + Bleomicina	6.6 ± 2.0 (12 %) n.s
Carvacrol (1.9 mg/mL) + Bleomicina	7.6 ± 1.1 (0 %) n.s
Carvacrol (0.9 mg/mL) + Bleomicina	7.5 ± 1.9 (0 %) n.s

†, Valores medios de SOSIF y sus correspondientes errores estándar. %IG, Porcentaje de inhibición de la Genotoxicidad. *, Se encontró una diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al Control positivo usando el test t-Student's. n.s., No se encontró diferencia significativa respecto al Control positivo.

Tanto el Timol como el Carvacrol disminuyeron el nivel de daño inducido por la Bleomicina en el ensayo SOS Chromotest; mostrando significación para un rango de dosis entre 4.3 y 137.0 g/mL de Timol y entre 7.6 y 122.0 g/mL de Carvacrol. Concentraciones más bajas de estos compuestos no mostraron reducción del SOSIF. En correspondencia con lo observado en los aceites, los porcentajes de inhibición de genotoxicidad (%GI) incrementan con la dosis ensayada del compuesto. El Timol mostró total inhibición para el rango de concentraciones entre 17.1 a 137.0 g/mL, mientras el Carvacrol no mostró total inhibición de la genotoxicidad en ninguna de las dosis

donde el efecto fue significativo. Estos resultados sugieren, que el Timol presenta un mayor efecto antígenotóxico contra el daño inducido por la Bleomicina que su isómero Carvacrol.

Con base a los resultados obtenidos se puede plantear que el efecto antígenotóxico de los aceites esenciales de *L. origanoides* sobre el daño en el ADN inducido por la Bleomicina en *Escherichia coli* usando el ensayo SOS Chromotest, se debe a la presencia del Timol y el Carvacrol en el aceite. Evidencia previa demuestra que estos compuestos también se encuentran relacionados con la actividad antioxidantes del aceite esencial de *L. origanoides* (Stashenko *et al.* 2008). Es posible que el efecto antígenotóxico de los aceites esenciales de *L. origanoides* y/o el Timol y Carvacrol contra la bleomicina se deba a un mecanismo de captura de radicales que evite la formación de daño en el ADN de tipo oxidativo. Sin embargo, esta hipótesis debe ser soportada por futuros estudios con otros ensayos que puedan dar más información sobre los mecanismos de acción de estos aceites.

De acuerdo con los datos encontrados en el literatura (dos Santos *et al.* 2004, Celis *et al.* 2007, Oliveira *et al.* 2007, Stashenko *et al.* 2008, Meneses *et al.* 2009), la especie *Lippia origanoides* claramente ha demostrado un amplio potencial terapéutico. Este trabajo comprobó las propiedades antígenotóxicas de los aceites de esta especie contra la Bleomicina, ampliando así su uso potencial como fuente de compuestos para la quimioprevención del cáncer y la industria cosmética. Otras especies aromática que presentan en su aceite esencial altos contenidos de Timol y Carvacrol son *Lippia graveolens*, *Origanum compactum*, *Origanum onites* y *Thymus spicata*, a las cuales también se les ha demostrado propiedades antígenotóxicas contra mutágenos

conocidos (Ipek *et al.* 2003, Aydin *et al.* 2005, Ipek *et al.* 2005, Mezzoug *et al.* 2007); soportando el potencial de estos compuestos como agentes quimiopreventivos.

4. CONCLUSIONES

El análisis de la composición química de los aceites esenciales de dos especímenes (COL519799 y COL516290) de *Lippia organoides* permitió establecer que los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales son el Timol, el Carvacrol, el p -cinemo y γ -terpineno. Los especímenes analizados pertenecen al mismo quimiotipo (Quimiotipo B) caracterizado por su alto contenido de Timol.

Los aceites esenciales de la especie *Lippia organoides* no son genotóxicos en el ensayo SOS Chromotest bajo las condiciones ensayadas. Ninguna de las dosis evaluadas (1.8 – 475.0 mg/mL) incremento significativamente el daño en el ADN. Adicionalmente, se encontró que el aceite esencial de los dos especímenes de *L. organoides* poseen un marcado efecto antígeno tóxico (cercano al 100% de inhibición de genotoxicidad) frente al daño inducido por la Bleomicina. El efecto protector desde las dosis más bajas del espécimen B (COL516290) se le atribuye a la acción sinérgica de más de un compuesto en el aceite posiblemente Timol y Carvacrol.

Los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales Timol y Carvacrol presentan propiedades antígeno tóxicas contra la Bleomicina en el ensayo SOS Chromotest. Por consiguiente, la actividad antígeno tóxica de los aceites esenciales de *Lippia organoides* se puede atribuir a la presencia de estos dentro de su aceite esencial. Con base en esto, *Lippia organoides* es una especie promisoría que puede ser de utilidad en futuras aplicaciones en quimioprevención y terapia contra el cáncer.

5. RECOMENDACIONES

Se recomienda el desarrollo de estudios de micro-propagación *in vitro* con diferentes especímenes de *Lippia origanoides* con el fin de determinar factores que influyen en la variación química de los aceites.

Se recomienda evaluar la genotoxicidad de los aceites y de sus compuestos mayoritarios en otros ensayos *in vitro* e *in vivo* que evalúen diferentes niveles de expresión de daño en el DNA.

Se recomienda realizar estudios confirmatorios de la actividad antígenotóxica de los aceites esenciales de *Lippia origanoides*; y en especial del Timol y el Carvacrol, usando ensayos con células de mamíferos *in vitro* e *in vivo*. Es de interés conocer el espectro antimutagénico y mecanismos actuación antígenotóxica de estos compuestos; por lo tanto se requerirán estudios futuros que evalúen su antígenotoxicidad frente a otros tipos de mutágenos y que permitan conocer los mecanismos de acción antígenotóxica.

6. BIBLIOGRAFIA

Abad M. J., Bermejo P., Villar A., Sánchez S., Carrasco L., 1997. Antiviral Activity of Medicinal Plant Extracts. *Phytotherapy Research*, 11:198–202.

Abena A. A., Diatwa M., Gakosso G., Gbeassor M., Hondi-Assah Th., Ouamba J.M., 2003. Analgesic, Antipyretic and Anti- Inflammatory Effects of Essential Oil of *Lippia multiflora*. *Fitoterapia*, 74: 231–236.

Abraham A. T., Lin J.-J., Newton D. L., Rybak S., Hecht S., 2003. RNA Cleavage And Inhibition of Protein Synthesis by Bleomycin. *Chemistry & Biology*, 10:45-52.

Adam K., Sivropoulou A., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M., 1998. Antifungal Activities of *Origanum vulgare* Subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential Oils Against Human Pathogenic Fungi. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46:1739-1745.

Adams R.P., 2004. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Quadrupole Mass Spectroscopy. Ed. Allured Publishing Corporation, Illinois, 469p.

Adams R., 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry. 4th Ed. Allured Publishing, Carol Stream, Illinois, USA, 804p.

Albesiano S, Rangel J.O, Cadena A., 2003. Vegetation of the Chicamocha River canyon (Santander, Colombia). *Caldasia*, 25:73-99.

Andrighetti-Fröhner C. R., Sincero T. C. M., Da Silva A. C., Savi L. A., Gaido C. M., Bettega J. M. R., Mancini M., Almeida M. T. R., Barbosa R. A., Farias M. R., Barardi C. R. M., Simoes C. M. O., 2005. Antiviral Evaluation of Plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. *Fitoterapia*, 76:374–378.

Ames B. N., 2001. DNA Damage from Micronutrients Deficiencies is Likely to be a Major Cause of Cancer. *Mutation Research*, 475:7-20

Aydin S, Basaran A.A, Basaran N., 2005. The Effect of Thyme Volátiles on the Induction of DNA Damage by the Heterocyclic Amine Iq And Mitomycin C. *Mutation Research*, 581:43-53.

Bagamboula C,F, Uyttendaele M., Debevere J., 2004. Inhibitory Effect of Thyme and Basil Essential Oils, Carvacrol, Thymol, Estragol, Linalool and p-Cymene Towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 21:33-42.

Bandoni A., 2000. Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina, 410p.

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomor M., 2008. Biological Effects of Essential Oils. A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46:446-475.

Barros-Monteiro M.V, Rocha de Melo Leite A.K, Medeiros-Bertini L., Maia de Morais S., Nunes-Pinheiro D.C.S., 2007. Topical Anti-Inflammatory, Gastroprotective and Antioxidant Effects of the Essential Oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. Journal of Ethnopharmacology, 111:378-382.

Barrett J.C., 2000. Molecular and Environmental Causes of Cancer. Drug Metabolism Review 32: 139-142.

Bassole I. H. N., Ouattara A. S., Nebie R., Ouattara C. A. T., Kabore Z. I., Traore S. A., 2003. Chemical Composition and Antibacterial Activities of the Essential Oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. Phytochemistry, 62:209–212.

Bendahou M., Muselli A., Grignon-Dubois M., Benyoucef M., Desjober J.M., Bernardini A.F., Costa J., 2008. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of *Origanum glandulosum* Desf Essential Oil and Extract Obtained by Microwave Extraction: Comparison with hydrodistillation. Food Chemistry 106:132-139.

Benkhald L., Xuncla M., Caballín M. R., Barrios L., Barquinero J.F., 2008. Induction of Complete and Incomplete Chromosome Aberrations by Bleomycin in Human Lymphocytes. Mutation Research, 637:134–141.

Biocomercio Sostenible., 2003. Estudio del Mercado Colombiano de Aceites Esenciales. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, Bogota, Colombia. 109p.

Boldi, 2004. Libraries from Natural Product-Like Scaffolds. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8:281-286.

Burt S.A., 2004. Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods - A Review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223– 253.

Burt S.A, Fledderman M.J, Haagsman H.P, van Knapen F., Veldhuizen E.J.A., 2007. Inhibition of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis on Agar and Raw Chicken by Carvacrol Vapour. *International Journal of Food Microbiology*, 119:346-350.

Buyukleyla M, Rencuzogullari E., 2009. The Effects of Thymol on Sister Chromatid Exchange, Chromosome Aberration and Micronucleus in Human Lymphocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72:943-947.

Calixto J.B., 2005. Twenty-five Years of Research on Medicinal Plants in Latin America: A Personal View. *Journal of Ethnopharmacology*, 100:131–134.

Camurca-Vasconcelos A.L.F, Bevilaqua C.M.L, Morais S.M, Maciel M.V, Costa C.T.C, Macedo I.T.F, Oliveira L.M.B, Braga R.R, Silva R.A, Vieira L.S., 2007. Anthelmintic Activity of *Croton Zehntneri* and *Lippia Sidoides* Essential Oils. *Veterinary Parasitology*, 148:288-294.

Castañeda M.L, Muñoz A, Martínez J.R, Stashenko E., 2007. Estudio Comparativo de la Composición y Actividad Biológica de los Aceites

Esenciales de Diez Plantas Aromáticas Colombianas. *Scientia Et Technica* XIII, 33:165-166.

Celis C.N, Escobar-Rivero P., Isaza J.H., Stashenko E., Martínez J.R., 2007. Estudio Comparativo de la Composición y Actividad Biológica de Los Aceites Esenciales Extraídos de *Lippia alba*, *Lippia origanoides*, y *Phyla dulcis*, Especies de la Familia Verbenaceae. *Scientia Et Technica* XIII, 33:103-105.

Cerpa, M.G., 2007. Hidrodestilación de Aceites Esenciales: Modelado y Caracterización. Tesis doctoral. Dpto. de Ing. Química y TMA, Universidad de Valladolid.

Claussen C. A., Long E. C., 1999. Nucleic Acid Recognition by Metal Complexes of Bleomycin. *Chemical. Reviews* 99:2797-2816.

Coskun S., Girisgin O., Kürkcüoğlu M., Malyer H., Girisgin A.O., Kirimer N., Baser K.H., 2008. Acaricidal Efficacy of *Origanum Onites* L. Essential Oil Against *Rhipicephalus Turanicus* (Ixodidae). *Parasitology Research* 103:259-261.

Cordell G.A, Colvard M.D., 2005. Some Thoughts on the Future of Ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 100:5-14.

Dos Santos F.J.B., Lopes J.A.D, Cito A.M., de Oliveira E.H, de Lima S.G., Reis F.A.M., 2004. Composition and Biological Activity of Essential Oils from *Lippia origanoides* HBK. *Journal of Essential Oils Research*, 16:504-506.

Fuentes J.L, Vernhe M., Cuetara E.B., Sánchez-Lamar A., Santana J.L., Llagostera M., 2006a. Tannins from Barks of *Pinus caribaea* Morelet Protect *Escherichia coli* Cells Against DNA Damage Induced by γ -Rays. *Fitoterapia*, 77:116-120.

Fundación ExportAr, 2003. Análisis de la Tendencia del Mercado Internacional de Aceites Esenciales. Informe mensual 13.

García-Barriga H.G., 1992. Flora Medicinal de Colombia, Botánica Médica. Tomo II, Segunda Edición, Bogotá-Tercer Mundo (Ed), 508pp.

Gilani A.H., Atta-ur-Rahman, 2005. Trends in Ethnopharmacology *Journal of Ethnopharmacology*, 100:43-49.

Glauce S. B. V., Tiago G. V., Rao V. S. N., Matos F. J. A., 1998. Analgesic And Antiinflammatory Effects of Two Chemotypes of *Lippia alba*: a Comparative Study. *Pharmaceutical Biology*, 36: 347–351.

Gupta M. P., 1995. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Editorial Presencia Ltda, Santa Fé de Bogotá.

Hoffmann E., Stroobant V., 2005. Mass Spectrometry, Principles and Applications. Manchester: John Willey & Sons, pp 1-8, 183-186.

Hofnung M., Quillardet P., 1988. The SOS Chromotest, a Colorimetric Assay Based on the Primary Cellular Responses to Genotoxic Agents. *Unite de Programmation Moleculaire et Toxicologie Genetique*.

Ipek E., Ayaz-Tüylü B., Zeytonoğlu H., 2003. Effects of Carvacrol on Sister Chromatid Exchanges in Human Lymphocyte Cultures. *Cytotechnology*, 43:145-148.

Ipek E., Zeytinoglu H., Okay S., Tuylu B.A., Kurkcuoglu M., Baser K.H.C., 2005. Genotoxicity and Antigenotoxicity of Origanum Oil and Carvacrol Evaluated by Ames Salmonella/microsomal Test. *Food Chemistry*, 93:551-556.

Judo W. S., Campbell C. S., Kellogg E. A., Stevens P. F., Donoghue M.J., 1999. *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, USA.

Karpouhtsis I., Pardali E., Feggou E., Kokkini S., Scouras Z.G., Marragani-Tsipidou P., 1998. Insecticidal and Genotoxic Activities of Oregano Essential Oils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46:1111-1115.

Kawanashi S., Hiraku Y., Oikawa S., 2001. Mechanism of Guanine-Specific DNA Damage by Oxidative Stress and its Role in Carcinogenesis and Aging. *Mutation Research*, 488: 65-76.

Khalil H., Ismail H., Taye A., Kamel M., 2007. Gastroprotective Effect of *Lippia nodiflora* L. Extracts in Ethanol Induced Gastric Lesions. *Pharmacognosy Magazine*, 3:1293-1296.

Koehn F.E, Carter T.C., 2005. The Evolving Role of Natural Products in Drug Discovery. *Nature Review Drug Discovery*, 4:206-220.

Koparal A. T., Zeytinoglu M., 2003. Effects of Carvacrol on A Human Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Cell Line, A549. *Cytotechnology*, 43:149–154.

Kovats E., 1965. Gas Chromatographic Characterization of Organic Substances in the Retention Index System. *Advance in Chromatography*, 1:229-247.

Kozubek S., Ogievetskaya M.M., Krasavin E.A, Drasil V., Soska J., 1990. Investigation of the SOS Response of *Escherichia coli* After γ -Irradiation by Means of the SOS chromotest. *Mutation Research*, 230:1-7.

Kunle O., Okogun J., Egamana E., Emojevwe E., Shok M., 2003. Antimicrobial Activity of Various Extracts and Carvacrol from *Lippia multiflora* Leaf Extract. *Phytomedicine*, 10:59-61.

Kumara B., Vijayakumar M., Govindarajan R., Pushpangadan P., 2007. Ethnopharmacological approaches to wound ealing—Exploring medicinal plants of India. *Journal of Ethnopharmacology*, 114:103–113.

Laval J., Jurado J., Sapparbaev M., Sidorkina O., 1998. Antimutagenic Role of Base Excision Repair Enzymes Upon Free Radical-Induced DNA Damage. *Mutation Research*, 402: 93-102.

Light M.E., Sparg S.G., Stafford G.I., Staden J., 2005. Riding the Wave: South Africa's Contribution to Ethnopharmacological Research Over the Last 25 Years. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 127–130.

Maisch J. M., 1885. On Some Useful Plants of the Natural Order of Verbenaceae. American Journal of Pharmacy, 57: 330–335.

McNair H., Miller J.M., 1988. Basic Gas Chromatography. New York: John Willey & Sons, pp 1-9.

Meneses R., Ocaziones R.E., Martínez J.R., Stashenko EE., 2009. Inhibitory Effect of Essential Oils Obtained from Plants Grown in Colombia on Yellow Fever Virus Replication *in vitro*. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 8:1-6.

Mersch-Sundermann V., Schneider U., Klopman G., Rosenkranz H. S., 1994. SOS Induction in *Eschenchia coli* and Salmonella Mutagenicity: a Comparison Using 330 Compounds. Muntagens, 9:205-224.

Mevy J.P., Bessiere J.M., Dherbomez M., Millogo J., Viano J., 2007. Chemical Composition and Some Biological Activities of the Volatile Oils of acChemotype of *Lippia chevalieri* Moldenke. Food Chemistry, 101: 682–685.

Mezzoug N., Elhadri A., Dallouh A., Amkiss S., Skali N.S., Abrini J., Zhiri A., Baudoux D., Diallo B., E.I., Jazari M., Idaomar M., 2007. Investigation of the Mutagenic an Antimutagenic Effects of *Origanum compactum* Essential Oil and Some its Constituents. Mutation Research, 629:100-110.

Michiels J., Missotten J., Fremaut D., De Smet S., Dierick N., 2007. In Vitro Dose-Response of Carvacrol, Thymol, Eugenol and *Trans-*

Cinnamaldehyde and Interaction of Combinations for the Antimicrobial Activity Against the Pig Gut Flora. *Livestock Science*, 109:157-160.

Miertus S., Svorc J., Sturdjk E., Vojtekovii H., 1987. Use of Specific Bacteria for the Determination of Mutagenic and Carcinogenic Compounds. *Analytical Chemistry*, 59:504-508.

Mir L. M., Tounekti O., Orlowski S., 1996. Bleomycin: Revival of an Old Drug. *Gen. Pharmac*, 5:745-748.

Muller W., Yamazakhi Z., Breter J., Zahn K., 1972. Action of Bleomycin on DNA and RNA. *Eur. J. Biochem*, 31:518-525.

Muñoz F., 1987. *Plantas Medicinales y Aromáticas, Estudio, Cultivo y Procesado*. Madrid: Ed. Mundi Prensa, 365p.

Newman D.J, Cragg G.M, Snader K.M., 2003. Natural Products as Sources of New Drugs Over the Period 1981-2002. *Journal of Natural Products* 66:1022-1037.

Oliveira D.R, Leitão G.G, Bizzo H.R, Lopes D., Alvino D.S, Alvino C.S, Leitão S.G., 2007. Chemical and Antimicrobial Analyses of Essential Oil of *Lippia origanoides* HBK. *Food Chemistry* 101:236-240.

Ohta T., Nakamura N., Moriya M., Shirasu Y., Kada T., 1984. The SOS-function-Inducing Activity of Chemical Mutagens in *Escherichia coli*. *Mutation Research*, 131:101-109.

Pascual M.E., Slowing K., Carretero E., Sánchez-Mata D., Villar A., 2001. *Lippia*: Traditional Uses, Chemistry and Pharmacology: a Review. *Journal of Ethnopharmacology*, 76:201-214.

Pascual M. E., Slowing K., Carretero M. E., Villar A., 2001b. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). *Il Farmaco* 56: 501–504.

Peltomäki P. 2001. DNA Mismatch Repair and Cancer. *Mutation Research*, 488:77-85.

Pérez S., Meckes M., Pérez C., Susunaga A., Zavala M. A., 2005. Anti-Inflammatory Activity of *Lippia dulcis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 102:1–4.

Pessoa O. D. L., Carvalho C. B. M., Silvestre J. O. V. L., Lima M. C. L., Neto R. M., Matos F. J. A., Lemos T. L., 2005. Antibacterial Activity of the Essential Oil from *Lippia aff. gracillis*. *Fitoterapia*, 76:712–714.

Quillardet P, Huisman O, D'Ari R, Hofnung M. 1982. SOS Chromotest, a Direct Assay of Induction of an SOS Function in *Escherichia coli* K-12 to Measure Genotoxicity. *Proceeding of the National Academic of Science*, 79:5971-5975.

Quillardet P., Bellecombe C., Hofnung M., 1985. The SOS Chromotest, a Colorimetric Bacterial Assay for Genotoxins: Validation Study with 83 Compounds. *Mutation Research*, 147:79-95.

Rocha-Guzmán N. E., Gallegos-Infante J. A., González-Laredo R. F., Ramos-Gómez M., Rodríguez-Muñoz M. E., Reynoso-Camacho R.,

Rocha-Urbe A., Roque-Rosales M. R., 2007. Antioxidant Effect of Oregano (*Lippia berlandieri* v. Shauer) Essential Oil and Mother Liquors. Food Chemistry 102:330–335.

Rojas J., Morales A., Pasquale S., Márquez A., Rondón M., Veres K., Máthe I., 2006. Comparative Study of the Chemical Composition of the Essential Oil of *Lippia oreganoides* Collected in Two Different Seasons in Venezuela. Natural Product Communications, 1:205-207.

Ruiz C., Tunarosa F., Martínez J.R., Stashenko E., 2007. Estudio Comparativo por GC-MS de Metabolitos Secundarios Volátiles de Dos Quimiotipos de *Lippia Origanoides* HBK Obtenidos por Diferentes Técnicas de Extracción. Scientia Et Technica XIII, 33:325-328.

Saikia A. P., Ryakala V. K., Sharma P., Goswami P., Bora U., 2006. Ethnobotany of Medicinal Plants Used by Assamese People for Various Skin Ailments and Cosmetics. Journal of Ethnopharmacology, 106: 149–157.

Sakaranarayanan K., 1999. Ionizing Radiation and Genetic Risks X. The Potential Disease Phenotypes of Radiation-Induced Genetic Damage in Humans: Perspectives from Human Molecular Biology and Radiation Genetics. Mutation Research, 429: 45-83.

Sangwan N.S., Farooqi A.H.A., Shabih F., Sangwan R.S., 2001. Regulation of Essential Oil Production in Plants. Plant Growth Regulation, 34:3–21.

Schwab C.E, Huber W.W, Parzefall W., Hietsch G., Kassie F., Schulte-Hermann R., Knasmüller S., 2000. Search for Compounds that Inhibit the Genotoxic and Carcinogenic Effects of Heterocyclic Aromatic Amines. *Critical Reviews in Toxicology*, 30:1-69.

Schulz I., Mahler H.C., Boiteux S., Epe B., 2000. Oxidative DNA Base Damage Induced by Single Oxygen and Photosensitization: Recognition by Repair Endonucleases and Mutagenesis. *Mutation Research*, 461:145-156.

Stammati A., Bonsi P., Zucco F., Moezelaar R., Alakomi H.L., von Wright A., 1999. Toxicity of Selected Plant Volatiles in Microbial and Mammalian Short-Term Assays. *Food and Chemical Toxicology*, 37:813-823.

Stashenko E. E., Combariza Y., Puertas M. A., 1998. Aceites Esenciales: Técnicas de Extracción y Análisis. Laboratorio de Fitoquímica, Bucaramanga, Colombia, 30p.

Stashenko E.E, Jaramillo B.A, Martínez J.R., 2003. Comparación de la Composición Química y de la Actividad Antioxidante *In Vitro* de los Metabolitos Secundarios Volátiles de Plantas de la Familia Verbenaceae. *Revista Academia Colombiana de Ciencia,s* 27: 579-597.

Stashenko E.E, Jaramillo B.E, Martínez J.R., 2004. Comparison of Different Extraction Methods for the Analysis of Volatile Secondary Metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, Grown in Colombia and Evaluation of its *In Vitro* Antioxidant Activity. *Journal Chromatography A*, 1025:93-103.

Stashenko E.E, Ruiz C., Muñoz A., Castañeda M., Martínez J., 2008. Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils of *Lippia origanoides* HBK Grown in Colombia. *Natural Product Communications*, 3:563-566.

STATSOFT Inc (2003) STATISTICA. Data Analysis Software System, Version 6, (www.statsoft.com).

Sugimura T., 1998. Cancer Prevention: Past, Present, Future. *Mutation Research*, 402: 7-14.

Sugimura T., Ushijima T., 2000. Genetic and Epigenetic Alterations in Carcinogenesis. *Mutation Research*, 462:235-246.

Teixeira M. C., Figueira G. M., Sartoratto A., García V. L., Delarmelina C., 2005. Anti-*Candida* Activity of Brazilian Medicinal Plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 97:305–311.

Tomatis L., 2000. The Identification of Human Carcinogens and Primary Prevention of Cancer. *Mutation Research*, 462:407-421.

Varel V.H., 2002. Carvacrol and Thymol Reduce Swine Waste Odor and Pathogens: Stability of Oils. *Current Microbiology*, 44:38-43.

Vincenzi M., Stamatii A., De Vincenzi A., Silano M., 2004. Constituents of Aromatic Plants: Carvacrol. *Fitoterapia*, 75:801– 804.

Von der Hude W., Behm C., Girtler R., Basler A., 1988. Evaluation of the SOS Chromotest. *Mutation Research*, 203:81-94.

Walsh C., Clardy J. 2004. Lessons from natural molecules. *Nature* 432:829-837. Williams GM. 2001. Mechanisms of Chemical Carcinogenesis and Application to Human Cancer Risk Assessment. *Toxicology*, 166:3-10.

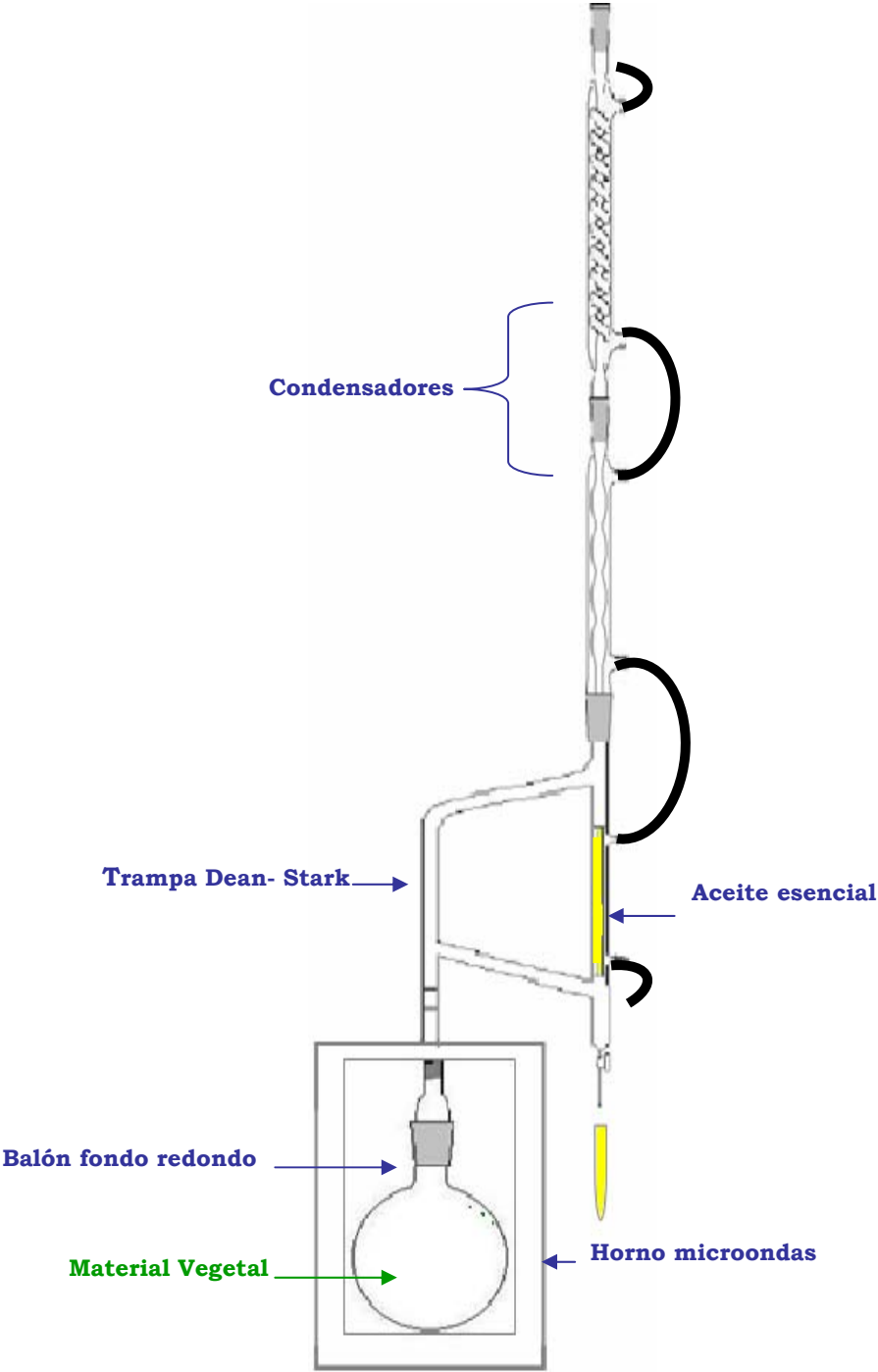
White P.A., Rasmussen J.B., 1996. SOS Chromotest Results in a Broader Context: Empirical Relationships Between Genotoxic Potency, Mutagenic Potency, and Carcinogenic Potency. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 27:270-305.

Zeytinoglu H., Incesu Z., Baser K.H.C., 2003. Inhibition of DNA Synthesis by Carvacrol in Mouse Myoblast Cells Bearing a Human *N-RAS* Oncogene. *Phytomedicine*, 10:292–299.

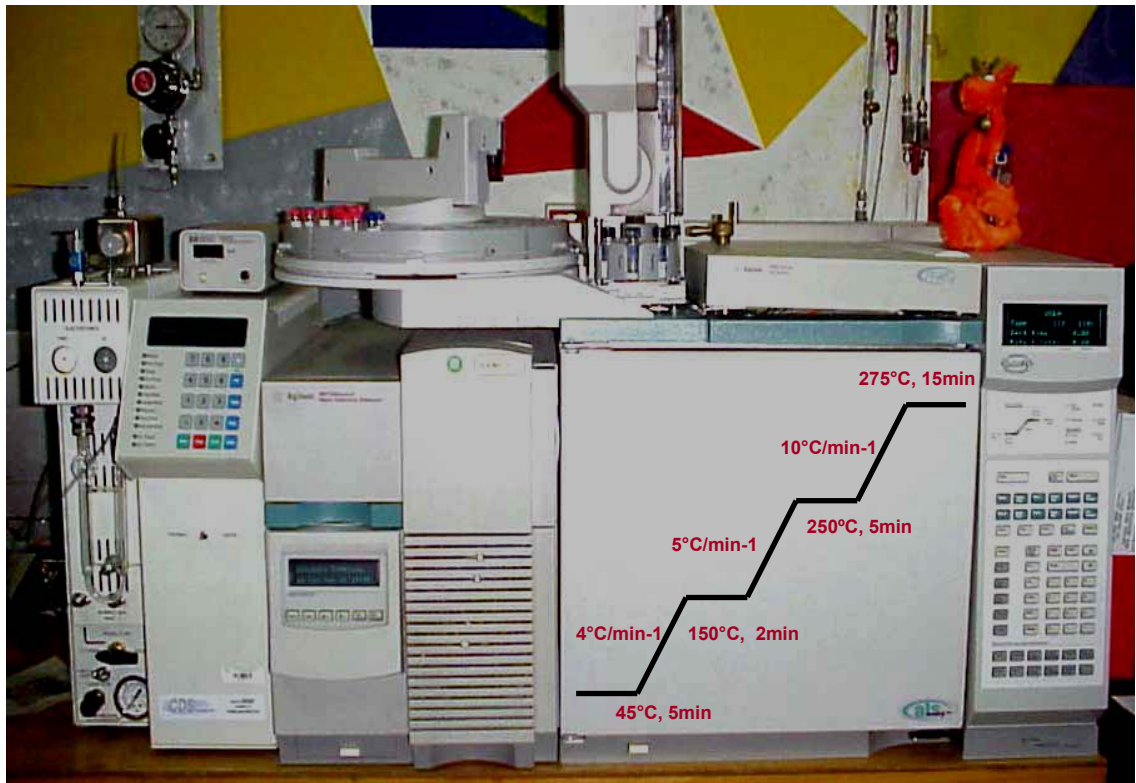
Zoghbi M.G.B., Andrade E.H.A., Santos A.S., Silva M.H.L., Maia J.G. S., 1998. Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br growing wild in the Brazilian Amazon. *Flavour and Fragrance Journal* 13:47-48.

7. ANEXOS

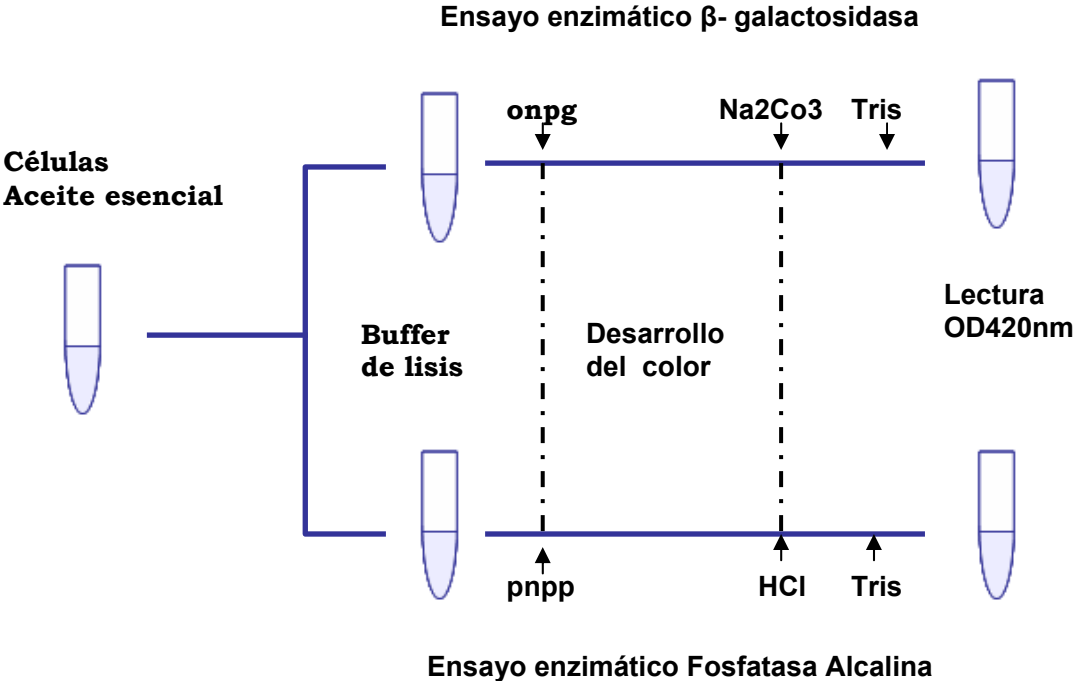
Anexo 1. Equipo de Hidrodestilación Asistida por Radiación Microondas (MWHD).



Anexo 2. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 plus Series GC System* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5973 Network*.



Anexo 3. Esquema del ensayo SOS Chromotest.



Anexo 4. Espectrofotómetro *HACH DR/2000*

