

**ESTUDIO DEL EFECTO ANTIGENOTÓXICO DE ACEITES ESENCIALES Y
EXTRACTOS SUPERCRÍTICOS DE ESPECIES VEGETALES COLOMBIANAS
FRENTE A RADIACIÓN ULTRAVIOLETA TIPO-C**

DIANA MILENA BASTO LOZANO

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

2013

**ESTUDIO DEL EFECTO ANTIGENOTÓXICO DE ACEITES ESENCIALES Y
EXTRACTOS SUPERCRÍTICOS DE ESPECIES VEGETALES COLOMBIANAS
FRENTE A RADIACIÓN ULTRAVIOLETA TIPO-C**

DIANA MILENA BASTO LOZANO

Trabajo de Grado para optar el título de Bióloga

Director

**JORGE LUIS FUENTES LORENZO
MICROBIÓLOGO, PH.D.**

Co-Tutor

**NATHALIA QUINTERO RUIZ
BIÓLOGA**

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

2013

DEDICATORIA

A mis padres por su amor, por su apoyo incondicional y por depositar toda su confianza en mí;

A mis hermanos porque siempre me incentivaron en la realización de mis objetivos y mis metas,

A toda mi familia por ser el motor que día a día impulsa mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Jorge Luis Fuentes Lorenzo por la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental, por su confianza y orientación en la realización del trabajo de pasantía.

A Nathalia Quintero Ruiz por su apoyo y colaboración incondicional durante el desarrollo de la pasantía.

A los compañeros del laboratorio por su amistad y cooperación.

A mis padres ya mis hermanos por su constante apoyo en la realización de mis proyectos de vida y por darme la oportunidad de continuar mi formación profesional.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	12
COMPETENCIAS DE LA PASANTÍA DE INVESTIGACIÓN	14
1.MATERIALES Y MÉTODOS	15
1.1 Extractos vegetales	15
1.2 Principio del ensayo SOS Chromotest	15
1.3 Cepa de ensayo y condiciones del cultivo de trabajo	16
1.4 Ensayo de antigenotoxicidad	16
1.5 Ensayos enzimáticos	17
1.5.1 Ensayo enzimático de β -galactosidasa (BG).	17
1.5.2 Ensayo enzimático de fosfatasa alcalina (FA).	18
1.6 Criterio de antigenotoxicidad	18
1.7 Análisis estadístico de los datos	19
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4. CONCLUSIONES	24
5. RECOMENDACIONES	25

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Efecto antigenotóxico de los aceites esenciales de <i>Lippia</i> frente a R-UVC, medido en el ensayo SOS Chromotest.	20
Tabla 2. Efecto antigenotóxico de los SFE frente a R-UVC, medido en el ensayo SOS Chromotest.	21

RESUMEN

TÍTULO: ESTUDIO DEL EFECTO ANTIGENOTÓXICO DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS SUPERCRÍTICOS DE ESPECIES VEGETALES COLOMBIANAS FRENTE A RADIACIÓN ULTRAVIOLETA TIPO-C

AUTORES: BASTO LOZANO, Diana Milena**

PALABRAS CLAVES: *Lippia*, *Minthostachys*, *Escallonia*, extractos de plantas, radiación ultravioleta, antigenotoxicidad, SOS Chromotest.

En el presente trabajo se evaluaron las propiedades antigenotóxicas de los aceites esenciales de las especies *Lippia alba* (carvona), *Lippia alba* (citral), *Lippia dulcis* y *Lippia micromera*; así como, extractos obtenidos por extracción con fluido supercrítico de las especies *Minthostachys mollis* y *Escallonia pendula*, frente al daño inducido por radiación ultravioleta tipo C. Para este propósito se empleó el ensayo SOS Chromotest utilizando como modelo de estudio la enterobacteria *Escherichia coli* cepa PQ37 que mide la respuesta celular primaria frente al daño genotóxico. La actividad antigenotóxica se analizó mediante diseños experimentales de co-tratamientos, en estos las bacterias fueron expuestas simultáneamente a los extractos de las plantas y a la radiación ultravioleta. Entre los extractos evaluados, los aceites esenciales de *Lippia alba* (citral) y *Lippia micromera* mostraron actividad antigenotóxica con dependencia de la concentración ensayada, siendo significativa a partir de la dosis 0,42 % v/v y 0,83 % v/v para *Lippia alba* (citral) y *Lippia micromera* respectivamente; con porcentajes de inhibición de la genotoxicidad mayores al 80 % para las concentraciones más altas. Los demás extractos evaluados, no mostraron actividad antigenotóxica frente a la radiación ultravioleta tipo C en el modelo empleado. Con base en los resultados obtenidos, se recomienda ampliar los estudios de antigenotoxicidad de los aceites promisorios y de sus componentes mayoritarios, con el fin de determinar que compuestos son responsables del efecto fotoprotector observado durante el desarrollo de este trabajo.

*Trabajo de grado modalidad Pasantía de investigación

**Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Director: Jorge Luis Fuente Lorenzo, Ph.D. y Co-Tutor: Nathalia Quintero Ruiz, Bióloga.

ABSTRACT

TITLE: ANTIGENOTOXIC STUDY OF ESSENTIAL OILS AND SUPERCRITICAL EXTRACTS OF COLOMBIAN PLANT SPECIES AGAINST ULTRAVIOLET RADIATION TYPE C

AUTHORS: BASTO LOZANO, Diana Milena**

KEY WORDS: *Lippia*, *Minthostachys*, *Escallonia*, *plant extracts*, ultraviolet radiation, antigenotoxicity, SOS Chromotest.

In the present work the antigenotoxic properties of *Lippia alba* (carvone), *Lippia alba* (citral), *Lippia dulcis* and *Lippia micromera* essential oils were evaluated; as well as extracts obtained by supercritical fluid extraction of *Minthostachys mollis* and *Escallonia pendula* against damage was induced by ultraviolet radiation type C. For this purpose the SOS Chromotest assay was applied, using as a model of study the Enterobacteriaceae *Escherichia coli* strain PQ37 which measures the primary response of a cell to genotoxic damage. The antigenotoxic activity was analyzed employed a co-treatment experimental design, where bacteria were simultaneously exposed to extracts from plants and ultraviolet radiation. Among the tested extracts, the essential oils from *Lippia alba* (citral) and *Lippia micromera* showed antigenotoxic activity with dependency on the concentration evaluated, be significant from 0.42 % v/v and 0.83 % v/v dose for *Lippia alba* (citral) and *Lippia micromera* respectively; with percentages of genotoxicity inhibition greater than 80 % for the highest concentrations. The other extracts tested, showing no antigenotoxic activity against DNA damage induced by ultraviolet radiation type C in the bacterial model used. Based on the results, we recommend amplify the antigenotoxic studies of promissory oils and their mayor components, in order to determine which compounds are responsible for the photoprotective effect observed during the development of this work.

*Degree work, Research internship

**Science faculty, Department of Biology. Director: Jorge Luis Fuente Lorenzo, Ph.D. and Co-Tutor: Nathalia Quintero Ruiz, Bióloga.

INTRODUCCIÓN

El incremento paulatino de cáncer de piel, así como de otras patologías cutáneas, se ha asociado principalmente con la sobre exposición a radiación ultravioleta solar (R-UV) sin una protección adecuada (Ichihashi *et al.*, 2003; Matsumura y Ananthaswamy, 2004; Gallagher y Lee, 2006). Esto, debido a que la R-UV puede inducir alteraciones estructurales en el material hereditario, actuando como posible iniciador de los procesos de carcinogénesis (Zaidi *et al.*, 2008; Afaq, 2011). Por otra parte, el deterioro gradual de la capa de ozono, contribuye con el peligroso incremento de los niveles de radiación en el planeta (Madronich *et al.*, 1998).

La preocupación ante esta problemática, ha conllevado a la búsqueda y desarrollo de estrategias de prevención como una medida de acción frente a los efectos adversos causados por la sobre exposición a radiación solar. Una de las estrategias para mitigar la fototoxicidad de la R-UV, se enfoca en la búsqueda de compuestos naturales con capacidad fotoprotectora o quimiopreventiva (Baliga y Katiyar, 2006; Gilaberte y González, 2010; Katiyar, 2011; Martorana *et al.*, 2013). En este contexto, las plantas son una importante alternativa ya que algunos de sus productos poseen actividad antioxidante, anti-inflamatoria, antígenotóxica, antimutagénica y anticancerígena (Oliveira *et al.*, 2006; Paduch *et al.*, 2007; Vicuña *et al.*, 2010; Kilani-Jaziri *et al.*, 2011; Nikolić *et al.*, 2011; Siracusa *et al.*, 2011).

Entre los extractos de plantas más estudiados se encuentran los aceites esenciales (AE) que presentan un rango amplio de efectos biológicos y han sido empleados tanto en la medicina tradicional como en la industria farmacológica (Pascual *et al.*, 2001; Edris, 2007; Bakkali *et al.*, 2008; Hennebelle *et al.*, 2008). El

uso potencial de AE como agentes fotoprotectores radica en su potencial capacidad de mantener la integridad del material hereditario ante el daño genético producido por mutágenos químicos y agentes físicos. Así, se ha evidenciado una disminución de las lesiones en el ADN causadas por la R-UVC en *Saccharomyces cerevisiae*, estudiando AE de las especies *Origanum compactum*, *Artemisia herba alba* y *Cinnamomum camphora* (Bakkali *et al.*, 2006). Adicionalmente, se ha encontrado actividad antimutagénica frente a R-UVC en los AE de *Salvia officinalis* y de *Ocimum basilicum* en ensayos bacterianos *in vitro* (Knežević-Vukčević *et al.*, 2005; Vuković-Gačić *et al.*, 2006; Stanojevic *et al.*, 2008; Nikolić *et al.*, 2011). Cabe resaltar, que otros tipos de extractos también han mostrado potencial fotoprotector frente a R-UVB en ensayos bacterianos *in vitro*, como es el caso del extracto metanólico de *Buddlejas cordioides* (Avila-Acevedo *et al.*, 2005). De esta manera se evidencia la importancia del estudio de extractos con posibles propiedades antigenotóxicas frente a la R-UV.

Con base en lo expuesto, la presente pasantía de investigación tuvo como objetivo evaluar el potencial antigenotóxico de AE de las especies *Lippia alba* (carvona), *Lippia alba* (citrinal), *Lippia dulcisy Lippia micromera*; así como, de los extractos supercríticos (SFE) de las especies *Minthostachys mollis* y *Escallonia pendula* frente a R-UVC empleando el ensayo SOS Chromotest. La pasantía estuvo enmarcada en el proyecto de investigación titulado “Estudio del potencial antigenotóxico frente a la radiación ultravioleta de extractos SFE y aceites esenciales de especies vegetales de la biodiversidad colombiana”, que se está llevando a cabo en el laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental, adscrito a la escuela de Biología de la Universidad Industrial de Santander.

COMPETENCIAS DE LA PASANTÍA DE INVESTIGACIÓN

1. Desarrolla habilidades y destrezas en la ejecución de ensayos de antigenotoxicidad utilizando el ensayo SOS Chromotest.
2. Adquiere habilidades en el desempeño de la práctica experimental, manejo de equipos, preparación de los medios de cultivos y soluciones.
3. Asume responsablemente el trabajo del laboratorio durante el cumplimiento de los objetivos de la pasantía.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Extractos vegetales

Los AE y SFE estudiados fueron suministrados por el Centro de Investigación en Biomoléculas (CIBIMOL) y extraídos en el marco del proyecto Bio-Red-CO-CENIVAM No. RC-0572-2012. La genotoxicidad de los AE de *Lippia alba* (carvona), *Lippia alba* (citral), *Lippia dulcis* y *Lippia micromera* (Verbenaceae) y de los SFE *Minthostachys mollis* (Lamiaceae) y *Escallonia pendula* (Escalloniaceae) fue evaluada previamente por el laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental (LMMA), donde se comprobó que estos no fueron genotóxicos en el modelo experimental empleado (datos no publicados).

1.2 Principio del ensayo SOS Chromotest

En el ensayo SOS Chromotest, la respuesta SOS es monitoreada en la cepa *Escherichia coli* PQ37 mediante una fusión genética del gen *sulA* que codifica un péptido involucrado en la formación del septo celular y el gen estructural de la β -galactosidasa del operón Lactosa (*sulA::LacZ*). Dado que existe una delección del operón Lactosa en el cromosoma de la cepa *Escherichia coli* PQ37; toda la actividad β -galactosidasa detectada es un indicador del nivel de inducción de la respuesta SOS; y por tanto, un indicador indirecto del daño inducido al ADN. La cepa también cuenta con una mutación en el gen *uvrA* que la hace deficiente en la reparación por escisión de nucleótidos (Sancar y Rupp, 1983), lo que la hace sensible a una amplia variedad de mutágenos que inducen daños en el ADN reparados por este mecanismo. Adicionalmente contiene una mutación *rfa* que eleva la permeabilidad de la membrada celular (Quillardet y Hofnung, 1985).

1.3 Cepa de ensayo y condiciones del cultivo de trabajo

Una alícuota de la cepa *Escherichia coli* PQ37 se dejó creciendo en medio Luria-Bertani (LB) (10 g triptona, 10 g cloruro de sodio, 5 g extracto de levadura disueltos en agua destilada) suplementado con ampicilina (50 µg/ml) y tetraciclina (17 µg/ml) a una temperatura de 37 °C con agitación permanente (100 rpm) durante toda la noche. Al día siguiente se realizó una resiembra en medio fresco adicionando 2 ml del medio crecido en 20 ml de medio LB, y se dejó crecer en un tiempo aproximado de dos horas, manteniendo las condiciones experimentales descritas anteriormente hasta que alcanzo una densidad óptica DO_{600nm} de 0,4.

1.4 Ensayo de antigenotoxicidad

El efecto antigenotóxico de los AE y SFE frente a R-UVC se evaluó en el ensayo SOS Chromotest descrito por Quillardet y colaboradores (1982), empleando diseños experimentales de co-tratamiento, en estos las células fueron expuestas simultáneamente a diferentes concentraciones del extracto supercrítico o de la fracción acuosa del aceite a evaluar y a la dosis de R-UVC previamente determinada en el LMMA, siguiendo el protocolo propuesto por Fuentes y colaboradores (2006).

El cultivo fresco crecido hasta una densidad óptica DO_{600nm} de 0,4 fue diluido cinco veces en medio LB 2X, esta dilución se distribuyó a razón de 600 µl en tubos de microcentrífuga que contenían igual volumen de las diluciones del extracto en estudio. Posteriormente 1 ml de la mezcla fue depositado en cajas petri pequeñas para realizar la irradiación a una dosis de 20,28 J/m² en la cabina de seguridad biológica FLC85. Posterior a la irradiación se tomó una alícuota de cada co-tratamiento en tubos de microcentrífuga y se incubaron por 30 minutos a una temperatura entre 4-8 °C y posteriormente durante dos horas a 37 °C con agitación permanente (300 rpm) en el Eppendorf Thermomixer Comfort. En todos

los casos se realizaron al menos tres experimentos independientes con cuatro replicas cada uno. En cada experimento se incluyó un control negativo (C- células sin irradiar mezcladas con agua destilada estéril) y un control positivo (C+ células irradiadas mezcladas con agua destilada estéril).

1.5 Ensayos enzimáticos

Posterior a la incubación se realizaron los ensayos enzimáticos en microplacas Brand de 96 pozos de la siguiente manera: el ensayo de β -galactosidasa (BG) se realizó en la parte superior de la placa utilizando las filas A-D y el de fosfatasa alcalina (FA) en la parte inferior que corresponde a las filas E-H. Las columnas corresponden al blanco, C-, C+ y diferentes concentraciones del compuesto a evaluar.

1.5.1 Ensayo enzimático de β -galactosidasa(BG). En cada pozo se dispensaron 135 μ l de buffer Z (Na_2HPO_4 3,22 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 1,1 g, KCl 0,15 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,05 g, SDS 0,2 g, β -mercaptoetanol 0,54 ml, pH 7,0) y se añadieron 15 μ l de células de cada tratamiento. Esto se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente para que se diera la lisis celular. Posteriormente, se adicionaron 30 μ l de la solución Stock del sustrato β -galactosidasa (orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido ONPG) el cual se preparó a 4 mg/ml en buffer fosfato de sodio (1,42 g de Na_2HPO_4 0,1 M, 1,38 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 0,1 M, pH 8,8) y se incubó durante 40 minutos para el desarrollo del color. La reacción se detuvo añadiendo 100 μ l de la solución Na_2CO_3 (1 M) y se realizó la lectura de la microplaca a una densidad óptica $\text{DO}_{420\text{nm}}$ en el espectrofotómetro de UV/visible Thermo Scientific Multiskan GO.

1.5.2 Ensayo enzimático de fosfatasa alcalina (FA). En cada pozo de dispensaron 135 µl de buffer T (TRIS 24,22 g y SDS 0,2 g, pH 8,8) y se añadieron 15 µl de células de cada tratamiento, se dejó incubando durante 20 minutos a temperatura ambiente para que se diera la lisis celular. Posteriormente, se adicionaron 30 µl de la solución Stock del sustrato de la fosfatasa alcalina (4-nitrofenil fosfato PNPP) el cual se preparó a 4 mg/ml en buffer T y se incubo durante 40 minutos para el desarrollo del color. La reacción se detuvo añadiendo 50 µl de la solución HCl (2,5 M) y cinco minutos después se le agregaron 50 µl de la solución TRIS (2 M). Se realizó la lectura de la microplaca como se describió en el ensayo de BG.

1.6 Criterio de antigenotoxicidad

El criterio de antigenotoxicidad usado fue el porcentaje de inhibición de la genotoxicidad (%IG). Este se mide como una reducción significativa del factor de inducción (FI) y representa la capacidad de la sustancia ensayada de proteger el material genético cuando se irradió con luz UVC.

Ecuación 1.

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

I co: Factor de inducción SOS de los co-tratamientos (células + extracto vegetal + RUV-C).
I basal: Factor de inducción SOS del control negativo.
I uvc: Factor de inducción SOS del control positivo.

El cálculo del factor de inducción (FI) se realizó de acuerdo con Quillardet y Hofnung, (1985). Para ello se calcularon las unidades enzimáticas de la actividad BG y FA.

Ecuación 2.

$$Unidades\ Enzimáticas = \frac{1000 * A_{420}}{t}$$

A₄₂₀: Medida de la densidad óptica de la mezcla de incubación leída a 420_{nm}
t: tiempo de incubación en presencia del sustrato en minutos.

La Relación (R) de las unidades de la β G y FA refleja la inducción del gen *sulA* incluso cuando se produce inhibición de la síntesis de proteínas.

$$R = \frac{\text{unidades } \beta\text{-galactosidasa}}{\text{unidades fosfatasa alcalina}} \quad \text{Ecuación 3.}$$

El factor de inducción SOS (FI) representa los datos de inducción del gen *sulA* normalizados en cada tratamiento y se considera como una medida indirecta del daño primario (genotoxicidad) inducido en el ADN por estos tratamientos.

$$I = \frac{R_t}{R_{nt}} \quad \text{Ecuación 4.}$$

R_t :Células tratadas
R_{nt} :Células no tratadas (C-)

La interpretación de los resultados se realizó considerando lo siguiente: i) “no genotóxico”, valores de FI menores de 1,5 ii) “inconclusos”, valores de FI entre 1,5–2,0 y iii) “genotóxico”, valores mayores de 2,0 y una clara relación dosis-efecto.

1.7 Análisis estadístico de los datos

Se calcularon los valores medios de las unidades enzimáticas de la BG y la FA, así como del FI con sus correspondientes errores estándar para cada muestra ensayada. Se comprobó la normalidad de los datos mediante la prueba Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza por medio de la prueba de F máxima. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas con una prueba de Dunnett. Para todos los análisis estadísticos, se consideró un $p < 0,05$. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa R.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1, se presentan los resultados del estudio de antigenotoxicidad frente a R-UVC de los AE de especies del género *Lippia*. Los AE de *Lippia alba* (citrinal) y *Lippia micromera* disminuyeron el daño inducido por la R-UVC en el ensayo SOS Chromotest de forma dosis dependiente. Esta actividad antigenotóxica fue significativa a partir de las dosis de los AE de 0,42 y 0,83 % v/v para *Lippia alba* (citrinal) y *Lippia micromera*; respectivamente. Por el contrario, los AE de *Lippia alba* (carvona) y *Lippia dulcis* no mostraron una actividad antigenotóxica importante frente a la R-UVC; siendo solo significativa para *Lippia alba* (carvona) en la dosis más alta (3,33 % v/v).

Tabla 1. Efecto antigenotóxico de los aceites esenciales de *Lippia* frente R-UVC, medido en el ensayo SOS Chromotest.

Tratamientos		<i>Lippia alba</i> (citrinal)		<i>Lippia micromera</i>		<i>Lippia alba</i> (carvona)		<i>Lippia dulcis</i>	
		FI	%IG	FI	%IG	FI	%IG	FI	%IG
C-	H ₂ O	1.0 ± 0.07		1.0 ± 0.04		1.0 ± 0.05		1.0 ± 0.03	
C+	R-UVC	5.1 ± 0.49		7.3 ± 0.99		9.6 ± 0.69		8.5 ± 0.17	
3.33	% v/v	0.5 ± 0.03 *	100	0.4 ± 0.01 *	100	1.4 ± 0.13 *	95	10.3 ± 1.48 n.s.	4
1.67	% v/v	0.5 ± 0.05 *	100	0.4 ± 0.02 *	100	10.2 ± 0.72 n.s.	8	12.8 ± 0.43 n.s.	0
0.83	% v/v	1.1 ± 0.20 *	93	1.2 ± 0.13 *	87	12.0 ± 0.64 n.s.	1	12.5 ± 0.69 n.s.	0
0.42	% v/v	3.3 ± 0.53 *	51	10.6 ± 0.92 n.s.	0	12.7 ± 1.07 n.s.	3	11.4 ± 0.68 n.s.	0
0.21	% v/v	4.2 ± 0.23 n.s.	25	10.5 ± 0.74 n.s.	7	10.9 ± 0.63 n.s.	5	10.3 ± 0.42 n.s.	0
0.10	% v/v	4.8 ± 0.39 n.s.	17	10.2 ± 0.80 n.s.	1	10.0 ± 0.46 n.s.	6	9.7 ± 0.81 n.s.	0
0.052	% v/v	5.0 ± 0.29 n.s.	9	9.2 ± 0.50 n.s.	1	10.3 ± 0.61 n.s.	6	10.5 ± 0.68 n.s.	0
0.026	% v/v	6.3 ± 0.50 n.s.	0	8.2 ± 0.49 n.s.	5	12.2 ± 0.74 n.s.	2	9.8 ± 0.77 n.s.	0
0.013	% v/v	5.0 ± 0.57 n.s.	18	9.2 ± 0.94 n.s.	6	10.9 ± 0.62 n.s.	5	9.0 ± 0.62 n.s.	0

Valores promedio del factor de inducción SOS (FI) de un mínimo de tres experimentos independientes con cuatro réplicas cada uno. %GI, Porcentaje de inhibición de la genotoxicidad. *Reducción significativa (p<0.05) con respecto al control positivo encontrada con la prueba de Dunnett. n.s. no se encontró diferencia significativa.

Por su parte, la Tabla 2 presenta los datos del estudio de antigenotoxicidad frente a R-UVC de SFE de las especies *Minthostachys mollis* y *Escallonia pendula*. Similar a como ocurrió con *Lippia alba* (carvona), las especies *Minthostachys mollis* y *Escallonia pendula* mostraron actividad antigenotóxica significativa para la dosis más altas de las estudiadas: 1,13 y 1,04 mg/ml, respectivamente.

Tabla 2. Efecto antigenotóxico de los SFE frente R-UVC, medido en el ensayo SOS Chromotest.

		<i>Minthostachys mollis</i>				<i>Escallonia pendula</i>					
Tratamientos		FI		%IG		Tratamientos		FI		%IG	
C-	H ₂ O	1.0	± 0.026			C-		1.0	± 0.04		
C+	R-UVC	11.0	± 0.630			C+		10.7	± 0.70		
1.13	mg/ml	1.6	± 0.181	*	93	1.04	mg/ml	2.6	± 0.34	*	84
0.57	mg/ml	7.6	± 0.478	n.s.	32	0.52	mg/ml	7.5	± 0.64	n.s.	11
0.28	mg/ml	9.7	± 0.391	n.s.	9	0.26	mg/ml	12.1	± 0.91	n.s.	0
0.14	mg/ml	12.2	± 0.430	n.s.	0	0.13	mg/ml	14.1	± 0.78	n.s.	0
0.07	mg/ml	11.5	± 0.301	n.s.	0	0.06	mg/ml	12.4	± 0.39	n.s.	0
0.04	mg/ml	11.5	± 0.344	n.s.	0	0.03	mg/ml	10.7	± 0.33	n.s.	0
0.018	mg/ml	11.2	± 0.604	n.s.	4	0.016	mg/ml	11.4	± 0.48	n.s.	0
0.009	mg/ml	12.4	± 0.537	n.s.	2	0.008	mg/ml	11.6	± 0.69	n.s.	2
0.004	mg/ml	9.9	± 0.651	n.s.	13	0.004	mg/ml	10.1	± 0.52	n.s.	9

Valores promedio del factor de inducción SOS (**FI**) de un mínimo de tres experimentos independientes con cuatro réplicas cada uno. **%GI**, Porcentaje de inhibición de la genotoxicidad. *Reducción significativa ($p < 0.05$) con respecto al control positivo encontrada con la prueba de Dunnett. **n.s.** no se encontró diferencia significativa.

Estudios previos han demostrado, que el amplio espectro de actividades biológicas de los AE se relaciona principalmente con el alto contenido de alguno o algunos compuestos químicos presentes en estos extractos (Edris, 2007; Bakkali *et al.*, 2008). Por ello, se propone que el potencial fotoprotector encontrado en el AE de *Lippia alba* (citral) y *Lippia micromera* podría atribuirse a los componentes

mayoritarios de estos aceites, citral y timol, respectivamente (Stashenko *et al.*, 2013).

Trabajos recientes en los que se evalúan las propiedades del AE de *Lippia alba*, han demostrado que la actividad antifúngica de éste se debe a la presencia en el aceite de citral, citronela y geraniol (Mesa-Arango *et al.*, 2009). Por su parte, la actividad antígeno tóxica frente a bleomicina se atribuye a la presencia de citral y carvona en el aceite (López *et al.*, 2011). Estudios realizados con citral, evidenciaron actividad antimutagénica frente a ciclofosfamida, mitomicina-C y cloruro de níquel usando el test de micronúcleos (Rabbani *et al.*, 2005, Rabbani y Devi, 2006), actividad atribuida en parte a la capacidad antioxidante del compuesto (Rabbani y Devi, 2006). Esta evidencia demuestra, que el citral es un compuesto químico capaz de proteger el material genético frente al daño inducido por diferentes mutágenos, lo que soporta la hipótesis de que éste es el responsable del potencial fotoprotector encontrado en el AE de *Lippia alba* (citral).

Para el AE de *Lippia micromera* se ha reportado una fuerte actividad antioxidante debido a su capacidad de atrapamiento radicalario, actividad que se ha relacionado con el contenido de timol y carvacrol en el aceite (Muñoz-Acevedo *et al.*, 2007; 2009). El timol con un porcentaje de 29,1% es el componente mayoritario del AE de esta especie (Stashenko *et al.*, 2013). Diferentes trabajos han comprobado que el timol es responsable de la bioactividad de una variedad de extractos en los que está presente. Ejemplo de ello, es el estudio realizado por Vicuña y colaboradores (2010), en el que se comprobó que el efecto antígeno tóxico del AE de *Lippia origanoides* frente a bleomicina se debe al alto contenido de timol y/o carvacrol en el aceite. En este mismo sentido, la actividad anti-inflamatoria y gastroprotectora del AE de *Lippia sidoides* ha sido relacionada con el componente mayoritario de este aceite, el timol (Barros-Monteiro *et al.*,

2007). Adicionalmente, los autores del trabajo proponen que éste efecto se relacionan con la actividad antioxidante del AE y de su componente mayoritario. A pesar de que el AE de *Lippia alba* (carvona) y *Lippia dulcis* no mostraron actividad fotoprotectora relevante frente a R-UVC en el modelo bacteriano empleado, estos han mostrado propiedades quimiopreventivas. Para el AE de *Lippia alba* (carvona) se ha reportado actividad antígenotóxica frente al mutágeno bleomicina (Lopez *et al.*, 2011). Por su parte, el extracto etanólico de *Lippia dulcis* ha mostrado actividad anti-inflamatoria (Pérez *et al.*, 2005, Görnemann *et al.*, 2008).

Los extractos supercríticos de *Minthostachys mollisy Escallonia pendula* no evidenciaron un marcado efecto fotoprotector; no obstante, se conoce que la especie *Minthostachys mollis* ha sido ampliamente usada en la medicina tradicional, principalmente en el tratamiento de afecciones del sistema nervioso, digestivo y respiratorio, adicionalmente se ha evaluado exitosamente como insecticida, fungicida y antihistamínico (Schmidt-Lebuhn, 2008; Monigatti *et al.*, 2013). Mientras el extracto etanólico de *Escallonia pendula* presenta acción antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* (Bussmann *et al.*, 2008).

Ha sido previamente demostrado las propiedades terapéuticas de los AE de especies vegetales del género *Lippia* (Oliveira *et al.*, 2007; Saddiq y Khayyat, 2010; Modak y Mukhopadhaya, 2011; Ganjewala *et al.*, 2012). El presente trabajo amplía el potencial terapéutico de los AE de las especies de este género, con la demostración de sus propiedades antígenotóxicas.

CONCLUSIONES

A partir de los datos obtenidos durante el desarrollo del trabajo experimental, se puede concluir que los aceites esenciales de *Lippia alba* (citról) y *Lippia micromera* presentaron actividad antígenotóxica frente a radiación ultravioleta tipo C, siendo las especies más prometedoras como fuente de agentes fotoprotectores. Los demás aceites evaluados no exhibieron una actividad antígenotóxica relevante.

Los extractos supercríticos obtenidos a partir de las especies *Minthostachys mollis* y *Escallonia pendulano* exhibieron actividad antígenotóxica marcada frente a radiación ultravioleta tipo C en el rango de dosis ensayadas para el modelo biológico.

5. RECOMENDACIONES

Se recomienda seguir profundizando en el estudio del modo de acción de los AE que resultaron positivos en el modelo de prueba frente a R-UVC. Esto podría lograrse evaluando los AE en procedimientos experimentales de pre y post incubación en el ensayo SOS Chromotest, evaluando sus componentes mayoritarios para determinar cuál o cuáles de ellos son los responsables de dicho efecto. También sería interesante probar el potencial fotoprotector utilizando R-UVA y R-UVB así como emplear otros ensayos diferentes al utilizado en la presente pasantía de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

AFAQ, F. Natural agents: cellular and molecular mechanisms of photoprotection. Archives of Biochemistry and Biophysics. April, 2011, vol. 508, no. 2, p. 144-151.

AVILA-ACEVEDO, JG., CASTAÑEDA, CMC., BENITEZ, FJ. C., DURÁN, DA., BARROSO, VR., MARTÍNEZ, CG., MUÑOZ, LJL., MARTÍNEZ, CA., y ROMO de VIVAR, A. Photoprotective activity of *Buddlejas cordioides*. Fitoterapia. June, 2005, vol. 76, no. 3-4, p. 301-309.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., ZHIRI, A., BAUDOUX, D y IDAOMAR, M. Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) after treatments with UVC radiation, 8-MOP plus UVA and MMS. Mutation Research. July, 2006, vol. 606, no.1-2, p. 27-38.

BAKKALI, F; AVERBECK, S; AVERBECK, D y IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. Food and Chemical Toxicology. February, 2008, vol. 46, no. 2, p. 446-475.

BALIGA, MS., y KATIYAR, S. Chemoprevention of photocarcinogenesis by selected dietary botanicals. Photochemical & Photobiological Sciences. February, 2006, vol. 5, no. 2, p. 243-253.

BARROS-MONTEIRO, MV., ROCHA de MELO LEITE, AK., MEDEIROS BERTINI, L., MAIA de MORAIS, S., y NUNES-PINHEIRO, DCS. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. Journal of Ethnopharmacology. May, 2007, vol. 111, no. 2, p. 378-382.

BUSSMANN, R. W., SHARON, D., PEREZ, F., DÍAZ, D., FORD, T., RASHEED, T., BAROCIO, Y., y SILVA, R. Actividad antibacteriana de plantas medicinales del norte del Perú. Arnaldoa. June, 2008, vol. 15, no. 1, p. 127-148.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. Phytotherapy Research. April, 2007, vol. 21, no. 4, p. 308-323.

FUENTES, JL., VERNHE, M., CUETARA, EB., SÁNCHEZ-LAMAR, A., SANTANA, JL y LLAGOSTERA, M. Tannins from Barks of *Pinus caribae* Morelet Protect *Escherichia coli* Cells Against ADN Damage Induced by γ -rays. Fitoterapia. February, 2006, vol. 77, no. 2, p.116-120.

GALLAGHER, RP., y LEE, TK. Adverse effects of ultraviolet radiation: a brief review. Progress in Biophysics and Molecular Biology. September, 2006, vol. 92, no. 1, p. 119-131.

GANJEWALA, D., GUPTA, AK., y MUHURY, R. An Update on Bioactive Potential of a Monoterpene Aldehyde Citral. *Journal of Biologically Active Products from Nature*. January, 2012, vol. 2, no. 4, p. 186-199.

GILABERTE, Y., y GONZÁLEZ, S. Update on photoprotection. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. April, 2010, vol. 101, no. 8, p. 659-672.

GÖRNEMANN, T., NAYAL, R., PERTZ, HH y MELZIG, M F. Antispasmodic activity of essential oil from *Lippia dulcis* Trev. *Journal of Ethnopharmacology*. Abril, 2008, vol. 117, no. 1, p. 166-169.

HENNEBELLE, T., SAHPAZ, S., JOSEPH, H., y BAILLEUL, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *Journal of Ethnopharmacology*. March, 2008, vol. 116, no. 2, p. 211-222.

ICHIHASHI, M., UEDA, M., BUDIYANTO, A., BITO, T., OKA, M., FUKUNAGA, M; TSURU, K., y HORIKAWA, T. UV-induced skin damage. *Toxicology*. July, 2003, vol. 189, no.1-2, p. 21-39.

KATIYAR, S. K. Green tea prevents non-melanoma skin cancer by enhancing DNA repair. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. April, 2011, vol. 508, no. 2, p. 152-158.

KILANI-JAZIRI, S., BHOURI, W., SKANDRANI, I., LIMEM, I., CHEKIR-GHEDIRA, L., y GHEDIRA, K. Phytochemical, antimicrobial, antioxidant and antigenotoxic potentials of *Cyperus rotundus* extracts. South African Journal of Botany. August, 2011, vol. 77, no. 3, p. 767-776.

KNEŽEVIĆ-VUKČEVIĆ, J., VUKOVIĆ-GAČIĆ, B., STEVIĆ, T., STANOJEVIĆ, J., NIKOLIĆ, B., y SIMIĆ, D. Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia officinalis* L.) and its fractions against UV-induced mutations in bacterial and yeast cells. Archives of Biological Sciences Belgrade. September, 2005, vol. 57, no. 3, p. 163-172.

LÓPEZ, MA., STASHENKO, EE., y FUENTES, JL. Chemical composition and antigenotoxic properties of *Lippia alba* essential oils. Genetics and Molecular Biology. July, 2011, vol. 34, no. 3, p. 479-488.

MADRONICH, S., MCKENZIE, RL., BJÖRN, LO., y CALDWELL, MM. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. October, 1998, vol. 46, no. 1-3, p. 5-19.

MARTORANA, M., ARCORACI, T., RIZZA, L., CRISTANI, M., BONINA, FP., SAIJA, A., TROMBETTA, D., y Tomaino, A. In vitro antioxidant and in vivo photoprotective effect of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seed and skin extracts. Fitoterapia. March, 2013, vol. 85, p. 41-48.

MATSUMURA, Y., y ANANTHASWAMY, HA. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and Applied Pharmacology*. March, 2004, vol. 195, no. 3, p. 298-308.

MESA-ARANGO, AC., MONTIEL-RAMOS, J., ZAPATA, B., DURÁN, C., BETANCUR-GALVIS, L., y STASHENKO, E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) NE Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. September, 2009, vol. 104, no. 6, p. 878-884.

MODAK, T., y MUKHOPADHAYA, A. Effects of citral, a naturally occurring antiadipogenic molecule, on an energy-intense diet model of obesity. *Indian Journal of Pharmacology*. May, 2011, vol. 43, no. 3, p. 300-305.

MONIGATTI, M., BUSSMANN, RW., y WECKERLE, CS. Medicinal plant use in two Andean communities located at different altitudes in the Bolívar Province, Perú. *Journal of Ethnopharmacology*. January, 2013, vol. 145, no. 2, p. 450–464.

MUÑOZ-ACEVEDO, A., CASTAÑEDA, ML., BLANCO, KM., CÁRDENAS, CY., REYES, JA., KOUZNETSOV, V., y STASHENKO, E. Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de Timol y Carvacrol. *Scientia et Technica*. Mayo, 2007, vol. 8, no. 33, p. vol. 104, no. 6, p. 878-884.

MUÑOZ-ACEVEDO, A., KOUZNETSOV, VV., y STASHENKO, EE. Composición y capacidad antioxidante in-vitro de aceites esenciales ricos en Timol, Carvacrol, trans-Anetol o Estragol. Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud. Diciembre, 2009, vol. 41, no. 3, p. 287-294.

NIKOLIĆ, B., MITIĆ-ĆULAFIĆ, D., VUKOVIĆ-GAČIĆ, B., y KNEŽEVIĆ-VUKČEVIĆ, J. The antimutagenic effect of monoterpenes against UV-irradiation-, 4NQO- and t-BOOH-induced mutagenesis in coli. Archives of Biological Sciences Belgrade. March, 2011, vol. 63, no. 1, p. 117-128.

OLIVEIRA, DR., LEITÃO, GG., SANTOS, SS., BIZZO, HR., LOPES, D., ALVIANO, CS., ALVIANO, DS., Y LEITÃO, SG. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. Journal of Ethnopharmacolog. November, 2006, vol. 108, no. 1, p. 103-108.

OLIVEIRA, DR., LEITÃO, GG., BIZZO, HR., LOPES, D., ALVIANO, DS., ALVIANO, CS., y LEITÃO, SG. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* HBK. Food Chemistry. January, 2007, vol. 101, no. 1, p. 236-240.

PADUCH, R., KANDEFER-SZERSZEŃ, M., TRYTEK, M., y FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis. October, 2007, vol. 55, no. 5, p. 315-327.

PASCUAL, ME., SLOWING, K., CARRETERO, E., SÁNCHEZ MATA, D., y VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. Journal of Ethnopharmacology. August, 2001, vol. 76, no. 3, p. 201-214.

PÉREZ, S., MECKES, M., PÉREZ, C., SUSUNAGA, A., y ZAVALA, MA. Anti-inflammatory activity of *Lippia dulcis*. Journal of Ethnopharmacology. October, 2005, vol. 102, no. 1, p.1-4.

QUILLARDET, P., HUISMAN, O., D'ARI, R., y HOFNUNG, M. SOS Chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. Proceedings of the National Academy of Sciences. October, 1982, vol. 79, no.19, p. 5971-5975.

QUILLARDET, P., y HOFNUNG, M. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. Mutation Research. June, 1985, vol. 147, no. 3, p. 65-78.

R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

RABBANI, SI., DEVI, K., y ZAHRA, N. Anti-clastogenic effects of citral. Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics. July, 2005, vol. 4, no. 1, p. 28-31.

RABBANI, SI., y DEVI, K. Anti-mutagenic effect of citral against Mitomycin-C. *Journal of Natural Remedies*. January, 2006, vol. 6, no. 1, p. 77-82.

SADDIQ, AA., y KHAYYAT, SA. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. September, 2010, vol. 98, no. 1, p. 89-93.

SANCAR, A., y RUPP, WD. A Novel Repair Enzyme: UVRABC Excision Nuclease of *Escherichia coli* Cuts a DNA Strand on Both Sides of the Damaged Region. *Cell*. May, 1983, vol. 33, no. 1, p. 249-260.

SIRACUSA, L., SAIJA, A., CRISTANI, M., CIMINO, F., D'ARRIGO, M., TROMBETTA, D., RAO, F., y RUBERTO, G. Phytocomplexes from liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) leaves—Chemical characterization and evaluation of their antioxidant, anti-genotoxic and anti-inflammatory activity. *Fitoterapia*. June, 2011, vol. 85, no. 4, p. 546-556.

SCHMIDT-LEBUHN, AN. Ethnobotany, biochemistry and pharmacology of *Minthostachys* (Lamiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. August, 2008, vol. 118, no 3, p. 343-353.

STANOJEVIĆ, J., BERIĆ, T., OPAČIĆ, B., VUKOVIĆ-GAČIĆ, B., SIMIĆ, D., y KNEŽEVIĆ-VUKČEVIĆ, J. The effect of essential oil of basil (*Ocimum basilicum* L.) on UV-induced mutagenesis in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biological Sciences Belgrade*. March, 2008, vol. 60, no. 1, p. 93-102.

STASHENKO, E., MARTÍNEZ, J., CALA, M., DURAN, D., Caballero y Deyanira. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. *Journal of Separation Science*. January, 2013, vol. 36, no.1, p. 192-202.

VICUÑA, GC., STASHENKO, EE., y FUENTES, JL. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin induced DNA damage. *Fitoterapia*. July, 2010, vol. 81, no. 5, p. 343-349.

VUKOVIĆ-GAČIĆ, B., NIKČEVIĆ, S., BERIĆ-BJEDOV, T., KNEŽEVIĆ-VUKČEVIĆ, J., y SIMIĆ, D. Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia officinalis* L.) and its monoterpenes against UV-induced mutations in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food and Chemical Toxicology*. October, 2006, vol. 44, no. 10, p.1730-1738.

ZAIDI, MR., DAY, CP., y MERLINO, G. From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. *Journal of Investigative Dermatology*. September, 2008, vol. 128, p. 2381-2391.