

**ESTUDIO DEL EFECTO GENOTÓXICO Y POTENCIAL ANTIGENOTÓXICO
DE ACEITES ESENCIALES DE ESPECIES VEGETALES DE LAS FAMILIAS
ASTERACEAE Y MYRTACEAE FRENTE A RADIACIÓN ULTRAVIOLETA
TIPO B**

ROWENS ANDREICK CRISTANCHO GÓMEZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

2014

**ESTUDIO DEL EFECTO GENOTÓXICO Y POTENCIAL ANTIGENÓTOXICO
DE ACEITES ESENCIALES DE ESPECIES VEGETALES DE LAS FAMILIAS
ASTERACEAE Y MYRTACEAE FRENTE A RADIACIÓN ULTRAVIOLETA
TIPO B**

ROWENS ANDREICK CRISTANCHO GÓMEZ

**Trabajo de Grado presentado como requisito para optar el título de
Biólogo**

Tutor

NATHALIA QUINTERO RUIZ

BIÓLOGA

Director de laboratorio

JORGE LUIS FUENTES LORENZO

MICROBIÓLOGO, PH.D

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

2014

AGRADECIMIENTOS

Le doy gracias a Dios por crear la vida que amo y estudio.

Agradezco a mis padres José Cristancho y Gilma Gómez, gracias a su esfuerzo constante hicieron posible este logro y creyeron en mí para lograrlo.

Agradezco al Doctor Jorge Luis Fuentes por brindarme la oportunidad de aprender en este proyecto, a la bióloga Nathalia Quintero Ruiz por su guía, instrucción y paciencia sobrehumana.

Agradezco a mis compañeros del laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental por su colaboración, comprensión y compañía.

Contenido

INTRODUCCIÓN	10
1. COMPETENCIAS DE LA PASANTÍA DE INVESTIGACIÓN	12
2.MATERIALES Y MÉTODOS	13
2.1 Extractos vegetales	13
2.2 Principio del ensayo SOS Chromotest	13
2.3 Cepa de ensayo y condiciones del cultivo de trabajo	13
2.4 Ensayo de genotoxicidad	14
2.5 Ensayos enzimáticos	14
2.5.1 Ensayo enzimático de β -galactosidasa (BG)	14
2.5.2 Ensayo enzimático de fosfatasa alcalina (FA)	15
2.6 Criterio de genotoxicidad	15
2.7 Ensayo de antigenotoxicidad	16
2.8 Criterio de antigenotoxicidad	17
2.9 Análisis estadístico de los datos	18
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
6.CONCLUSIONES	24
7.RECOMENDACIONES	25
BIBLIOGRAFÍA	26

LISTA DE TABLAS

pág.

Tabla 1. Efecto genotóxico de los aceites esenciales medido en el ensayo SOS chromotest **22**

Tabla 2. Efecto antígenotóxico de los aceites esenciales medido en el ensayo SOS chromotest **23**

RESUMEN

TITULO: ESTUDIO DEL EFECTO GENOTÓXICO Y POTENCIAL ANTIGENOTÓXICO DE ACEITES ESENCIALES DE ESPECIES VEGETALES DE LAS FAMILIAS ASTERACEAE Y MYRTACEAE FRENTE A RADIACIÓN ULTRAVIOLETA TIPO B*

Autores: ROWENS ANDREICK CRISTANCHO GÓMEZ**

Palabras clave: Aceites esenciales, Radiación ultravioleta, genotoxicidad, antigenotoxicidad, SOS Chromotest, Fotoprotección, Asteraceae, Myrtaceae.

Descripción

El desarrollo del cáncer de piel tiene una relación directa con la exposición a radiación ultravioleta (R-UV) solar, sin una adecuada protección. Dentro de los tres tipos de R-UV es la radiación ultravioleta tipo B (R-UVB) la que presenta la principal contribución en relación con el daño al ADN, por lo que podría actuar como el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de piel. Existe un gran interés por encontrar nuevos compuestos con potencial fotoprotector, principalmente compuestos de origen natural. En este sentido los aceites esenciales (AE), que son mezclas de compuestos volátiles extraídos de plantas y para los que se ha demostrado diversas actividades biológicas, son fuente promisoria de compuestos que podrían resultar útiles para la fotoprotección de la piel. En el presente trabajo se evaluó el efecto genotóxico y potencial antigenotóxico de aceites esenciales obtenidos a partir de 3 especies vegetales pertenecientes a la familia Asteraceae, BIO-AT-sa-W28E, BIO-AT-sa-W38E, BIO-AT-sa-W36E y 2 especies pertenecientes a la familia Myrtaceae, BIO-MY-sa-W05E, BIO-MY-sa-W07E, frente al daño inducido en el ADN por la R-UVB. La genotoxicidad y antigenotoxicidad de estos extractos fue determinada empleando diseños experimentales de co-tratamiento utilizando el ensayo bacteriano SOS chromotest, el cual permite medir de manera indirecta el daño causado al ADN. Los dos AE de obtenidos de plantas de la familia Myrtaceae mostraron un claro efecto genotóxico, mientras que los de la familia Asteraceae no. Así mismo los aceites BIO-AT-sa-W38E y BIO-AT-sa-W36E exhibieron actividad antigenotóxica de forma dosis dependiente, convirtiéndose en fuente promisoria de compuestos potencialmente fotoprotectores.

* Trabajo de grado

** Facultad de ciencias básicas. Director Jorge Luis Fuentes Lorenzo

ABSTRACT

TITLE: STUDY OF THE GENOTOXIC EFFECT AND ANTIGENOTOXIC POTENTIAL OF PLANT ESSENTIAL OILS FROM SPECIES OF THE FAMILIES ASTERACEAE AND MYRTACEAE AGAINST ULTRAVIOLET RADIATION TYPE B*

Authors: ROWENS ANDREICK CRISTANCHO GÓMEZ **

Key words: Essential oils, Ultraviolet radiation, genotoxicity, antigenotoxicity, SOS Chromotest, photoprotection, Asteraceae, Myrtaceae.

Description

Skin cancer development is related directly with sunlight ultraviolet radiation exposure without adequate protection. Within the three R-UV types is the ultraviolet radiation B which displays the main contribution regarding to DNA damage, by that reason it would act as the major risk factor in skin cancer development. There is a great interest about finding new compounds with photoprotector potencial, mainly compounds from natural sources. In this respect the essential oils (AE), which are mixtures of volatile compounds extracted from plants for which has been shown various biological activities, are a promising source of compounds which may be useful for skin fotoprotección. In this present work the genotoxic effect and antigenotoxic potential was evaluated for essential oils from 3 plant species belonging to Asteraceae family, BIO-AT-sa-W28E, BIO-AT-sa-W38E, BIO-AT-sa-W36E, and two plant species belonging to Myrtaceae family, BIO-MY-sa-W05E, BIO-MY-sa-W07E, against the DNA damage induced by R-UVB exposure. Genotoxicity and antigenotoxicity of these extracts were determined using a cotreatment experimental design in the SOS Chromotest , a bacterial assay that measure indirectly DNA damage. Both essential oils obtained from plants belonging to Asteraceae family showed a clear genotoxic effect, but plants from Asteraceae family don't. Likewise essential oils BIO-AT-sa-W38E and BIO-AT-sa-W36E showed antigenotoxic activity in a dose-dependent relationship, becoming a potentially promising source of photoprotective compounds.

*Degree work, Research internship

**Science faculty, Department of Biology. Director: Jorge Luis Fuente Lorenzo, Ph.D.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de piel, especialmente el melanoma cutáneo maligno, está aumentando su incidencia, morbilidad y mortalidad alrededor del mundo, convirtiéndose en un problema de salud pública (Espey *et al.*, 2007; Purdue *et al.*, 2008; Zaidi *et al.*, 2008). Diferentes investigadores consideran a la radiación ultravioleta (R-UV) solar como el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de piel, basados en el hecho que la R-UV puede producir cambios estructurales en el ADN, y actuar como un iniciador del proceso cancerígeno (De Flora, 1998; Gallagher y Lee, 2006; Zaidi *et al.*, 2008). Por lo cual, se estima que el aumento de patologías cutáneas se debe en principio a la sobreexposición a R-UV solar sin la debida protección (Madronich *et al.*, 1998; Ichihashi *et al.*, 2003; Matsumura y Ananthaswamy, 2004; Zaidi *et al.*, 2008).

La R-UV es definida como la radiación cuya longitud de onda se encuentra entre 100 y 400 nm; así mismo se han caracterizado tres tipos de R-UV de acuerdo a su longitud de onda específica: A (315–400 nm), B (280–315 nm) y C (100–280 nm). De los cuales, la R-UVB es considerada el componente de la radiación solar de mayor relevancia biológica (Perdiz *et al.* 2000; Gallagher y Lee, 2006; Nayanaran *et al.*, 2010). Aunque la R-UVB es necesaria para la transformación de 7-deoxicolesterol a vitamina D, el exceso de esta es responsable de eritema, cáncer de piel e inmunosupresión (Gallagher y Lee, 2006; Katiyar *et al.*, 2011). Debido a que induce daños en la molécula de ADN, siendo los dímeros de pirimidina *cis-syn* ciclobutano (CPD) y el fotoproducto pirimidina (6-4) pirimidona (6-4PP), los tipos más frecuentes; adicionalmente, la R-UVB puede producir especies reactivas del oxígeno, causando daños oxidativos en las bases nitrogenadas (Sinha y Hader, 2002; Mukherjee *et al.*, 2011).

Con el objetivo de disminuir los efectos adversos de la sobreexposición a radiación solar, la principal herramienta ha sido el desarrollo de estrategias de prevención (Morse y Stoner, 1993), siendo una de ellas la búsqueda de

compuestos naturales con actividad quimiopreventiva o fotoprotectora, es decir, con capacidad de prevenir, contrarrestar o estimular la reparación del daño genético causado por la R-UV (Marrot *et al.*, 2005, Hazane *et al.*, 2006). Entre los agentes naturales con potencial fotoprotector se encuentran los polifenoles. Compuestos para los que se han reportado propiedades quimiopreventivas, que posteriormente fueron probados de forma tópica como fotoprotectores, demostrando que pueden absorber la R-UV evitando que esta penetre en la piel y cause daño (Nichols y Katiyar, 2010).

Los aceites esenciales (AE); son mezclas de compuestos volátiles extraídos de plantas y usados tanto en la medicina tradicional como en la industria farmacológica (Bakkali *et al.*, 2008). Muchos de ellos son ampliamente conocidos por sus propiedades antioxidantes y antígenotóxicas (Light *et al.*, 2005; Yesilada, 2005; Saikia *et al.*, 2006; Bakkali *et al.*, 2008; Gilaberte y González, 2010; Nichols y Katiyar, 2010; Vicuña *et al.*, 2010; Afaq y Katiyar, 2011; López *et al.*, 2011) las cuales pueden resultar relevantes para la fotoprotección de la piel. Como es el caso del AE extraído de *Cnidium officinale* y *Ligusticum chuanxiong*, para los cuales se relaciona su capacidad de disminuir el daño inducido en el ADN por la R-UVB en fibroblastos de ratón, con la actividad antioxidante que presentan estos aceites (Jeong *et al.*, 2009).

Como se evidenció, existe la necesidad de encontrar compuestos naturales con potencial fotoprotector que contribuyan a disminuir la incidencia de procesos carcinogénicos en piel. Por ello, la presente pasantía de investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto genotóxico y potencial antígenotóxico frente a la radiación ultravioleta tipo B (R-UVB), de cinco aceites esenciales obtenidos a partir de 3 especies vegetales de la familia Asteraceae identificadas con los códigos BIO-AT-sa-W28E, BIO-AT-sa-W38E, BIO-AT-sa-W36E, y 2 especies vegetales de la familia Myrtaceae identificadas con los códigos BIO-MY-sa-W05E, BIO-MY-sa-W07E, empleando diseños experimentales de co-tratamiento en el ensayo SOS chromotest (Quillardet *et al.* 1982, Fuentes *et al.* 2006)

1. COMPETENCIAS DE LA PASANTÍA DE INVESTIGACIÓN.

1. Desarrolla habilidades y destrezas en la ejecución de ensayos de genotoxicidad y 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 necesarios para el desempeño de cada práctica.
3. Asume responsablemente el trabajo del laboratorio durante el cumplimiento de los objetivos de la pasantía.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Extractos vegetales

Los aceites esenciales AE obtenidos mediante hidrodestilación asistida por radiación microondas, fueron suministrados por el Centro de Investigación en Biomoléculas (CIBIMOL) y se realizaron en el marco del proyecto Bio-Red-CO-CENIVAM No. RC-0572-2012.

Los AE evaluados en este trabajo corresponden a tres especies de la familia Asteraceae identificadas con los códigos BIO-AT-sa-W28E, BIO-AT-sa-W38E y BIO-AT-sa-W36E. Así como a dos especies vegetales de la familia Myrtaceae identificadas con los códigos BIO-MY-sa-W05E y BIO-MY-sa-W07E.

3.2 Principio del ensayo SOS Chromotest

El ensayo SOS Chromotest utiliza como sistema de estudio la enterobacteria *Escherichia coli* cepa PQ-37, esta cepa contiene una fusión transcripcional (*sulA::LacZ*) donde el gen estructural de la enzima β -galactosidasa se expresa bajo el control del promotor del gen *sulA* regulado bajo la respuesta SOS. De esta forma la actividad específica β -galactosidasa es un indicador del nivel de inducción de la respuesta SOS; y por tanto, un indicador indirecto del daño inducido en el ADN. La cepa también cuenta con una mutación en el gen *uvrA* que la hace deficiente en la reparación por escisión de nucleótidos (Sancar & Rupp, 1983), elevando su sensibilidad frente a una amplia variedad de mutágenos y una mutación *rfa* que la hace deficiente en lipopolisacáridos de membrana lo que eleva la permeabilidad de la membrana celular (Quillardet & Hofnung, 1985).

3.3 Cepa de ensayo y condiciones de cultivo

Una alícuota de la cepa *Escherichia coli* PQ37, genotipo (*F- thr leu his-4 pyrD thi galE galK or galT lac Δ U169 srl300::Tn10 rpoB rpsL uvrA rfa trp::Muc+ sfiA::Mud(Ap, lac)cts*) se dejó creciendo en medio Luria-Bertani (LB) (10 g

triptona, 10 g cloruro de sodio, 5 g extracto de levadura, pH 7.4) suplementado con ampicilina (50 µg/ml) y tetraciclina (17 µg/ml) a una temperatura de 37 °C con agitación permanente (170 rpm) durante 15-16 horas. Al día siguiente se realizó una resiembra en medio fresco adicionando 2 ml del medio crecido en 20 ml de medio LB, el cual se dejó crecer bajo las condiciones experimentales descritas anteriormente un tiempo aproximado de una hora, hasta que alcanzó una densidad óptica DO_{600nm} de 0.4.

3.4 Ensayo de genotoxicidad

El cultivo de la cepa en fase exponencial (densidad óptica de 0.4 a 600 nm) fue diluido 10 veces en medio fresco y dispensado en tubos tipo Eppendorf que contenían diferentes concentraciones del extracto a evaluar. Posteriormente, los tratamientos fueron incubados durante 30 minutos a 8°C para la incorporación del compuesto a la célula y luego durante 2 horas a 37 °C con agitación permanente (300 rpm) en el Thermomixer Comfort (Eppendorf, Alemania), para la recuperación celular e inducción del gen reportero. Para cada tratamiento, se desarrollaron mínimo 3 experimentos independientes, incluyendo en cada experimento un control positivo (4-nitiroquinolina-1-oxido) y un control negativo (agua destilada estéril). Los ensayos enzimáticos se realizaron con cuatro replicas cada uno y en paralelo para la β -galactosidasa y la fosfatasa alcalina.

3.5 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.

3.5.1 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) la 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 a temperatura ambiente 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.

3.5.2 Ensayo enzimático de fosfatasa alcalina (FA).

En cada pozo se dispensaron 135 μ l de buffer T (TRIS 24,22 g y SDS 0,2 g, pH 8,8) y se añadieron 15 μ l 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 μ l 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 incubó durante 40 minutos para el desarrollo del color. La reacción se detuvo añadiendo 50 μ l de la solución HCl (2,5 M) y cinco minutos después se le agregaron 50 μ l de la solución TRIS (2 M). Finalmente se realizó la lectura de la microplaca como se describió en el ensayo de BG.

3.6 Criterio de genotoxicidad.

El criterio de genotoxicidad empleado es el Factor de Inducción (FI). El cálculo del FI se realizó de acuerdo con Quillardet y Hofnung, (1985). Para ello se calcularon las unidades enzimáticas de la actividad BG y FA de la siguiente manera.

Ecuación

1

A_{420} : medida de la densidad óptica de la mezcla de la incubación medida a 420nm. t: tiempo de incubación en presencia del sustrato en minutos
--

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

La relación (R) de las unidades enzimáticas de la BG y la FA refleja la inducción del gen *suIA*, incluso cuando se produce inhibición de la síntesis de proteínas.

Ecuación 2

$$R = \frac{\text{Unidades de } \beta - \text{galactosidasa}}{\text{Unidades de Fostasa alcalina}}$$

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

Ecuación 3

$$I = \frac{R_t}{R_{nt}}$$

R_t : Células tratadas R_{nt} : Células no tratadas
--

La discriminación de valores 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.

3.7 Ensayo de antigenotoxicidad

Una vez realizados los análisis de genotoxicidad, para aquellos compuestos que no presentaron efecto genotóxico se realizó el ensayo de antigenotoxicidad. El efecto antigenotóxico de los AE frente a R-UVB se evaluó en el ensayo SOS Chromotest (Quillardet *et al.*, 1982), empleando diseños experimentales de co-tratamiento. En estos las células fueron expuestas

simultáneamente a diferentes concentraciones de la fracción acuosa del compuesto a evaluar y a la dosis de R-UVB previamente determinada en el LMMA, siguiendo el protocolo propuesto por Fuentes y colaboradores (2006).

El cultivo fresco crecido hasta una densidad óptica DO600nm 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 para realizar la irradiación a una dosis de 0.001 J/m². Las células en las cajas Petri se irradiaron en una cabina de irradiación BS-02 (Opystel Dr Gröbel, Alemania) equipada con cuatro lámparas de R-UVB y con un controlador de irradiación tipo UV-MAT (Opystel Dr Gröbel, Alemania). 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 Thermomixer Comfort (Eppendorf, Alemania). 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).

3.8 Criterio de antigenotoxicidad

Como criterio de antigenotoxicidad se usó 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 y se calcula para cada tratamiento según la siguiente ecuación:

Ecuación 4

$$\%IG = \frac{I_{co} - I_{basal}}{I_{uv} - I_{basal}}$$

<p>I_{co}: factor de inducción SOS de los cotratamientos (células + extracto vegetal + RUVC). I_{basal}: factor de inducción SOS del control negativo. I_{uv}: factor de inducción SOS del control positivo.</p>

3.9 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 Levene. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas con una prueba a posteriori de Dunnett. Para todos los análisis estadísticos, se consideró un $p < 0,05$. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa R.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se presentan los resultados del estudio de genotoxicidad de los AE obtenidos a partir de especies vegetales de las familias Asteraceae y Myrtaceae, identificadas con los códigos BIO-AT-sa-W28E, BIO-AT-sa-W38E, BIO-AT-sa-W36E y BIO-MY-sa-W05E, BIO-MY-sa-W07E, respectivamente. Los valores del FI para las tres especies de la familia Asteracea evaluadas, no presentaron valores significativamente diferentes al control negativo en ninguna de las concentraciones probadas. Lo cual indica que para este modelo biológico y para el rango de concentraciones evaluadas, los AE de las especies vegetales analizadas no son genotóxicos en el modelo de estudio.

Los AE de las especies vegetales de la familia Myrtaceae exhibieron valores de FI para BIO-MY-sa-W05E de 8.1, 5.8, y 2.2 en las concentraciones 0.83 % v/v, 0.42 % v/v y 0.21 % v/v respectivamente; mientras para el aceite BIO-MY-sa-W07E se encontraron valores del FI de 8.6 y 3.2 en las concentraciones 0.83 % v/v y 0.42 % v/v respectivamente. Por lo tanto es notorio el efecto genotóxico que estos AE muestran para este modelo biológico en algunas de las concentraciones evaluadas. El hecho de que no se presente actividad de la respuesta SOS en las concentraciones más altas sugiere que la genotoxicidad está asociada con un efecto tóxico del compuesto. Estos aceites representan el primer reporte de AE con actividad genotóxica, dentro del grupo de muestras evaluadas en el macroproyecto en el que se enmarca la presente pasantía,

Es importante destacar que el modelo biológico usado en el ensayo SOS chromotest es una bacteria, y que algunos AE extraídos de plantas de diversas especies cuentan con propiedades anti-microbianas (Dorman y Deans, 2000; Burt, 2004; Bakkali *et al.*, 2008). La familia Myrtaceae comprende 121 géneros, distribuidos principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Stefanello *et al.*, 2011), representando una importante fuente de aceites esenciales con actividades biológicas como bactericida, fungicida y

antiinflamatoria (Sartorelli *et al.*, 2007). Un buen ejemplo, es el extracto de hojas de *Psidium guajava* el cual tiene un efecto inhibitor del crecimiento sobre *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Salmonella spp.*, y *Staphylococcus aureus* actuando como bactericida y fungicida (Ofodile *et al.*, 2013). El género *Eucalyptus* también exhibe un amplio rango de acción contra diferentes patógenos como *Escherichia coli*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus* (Sacchetti *et al.*, 2005; Sartorelli *et al.*, 2007). Llegando incluso a inhibir el crecimiento de *Pseudomona aureginosa*, una bacteria de difícil tratamiento clínico (Cimanga *et al.*, 2002).

Es necesario analizar los AE que resultaron genotóxicos con métodos como el ensayo cometa o el ensayo de micronúcleos en células de mamífero, para confirmar los resultados (Taylor *et al.*, 2003). Así mismo, realizar la identificación taxonómica de las especies a las que corresponden estos aceites y la caracterización química de los mismos. Ya que según la literatura, los AE obtenidos de plantas de la familia Myrtaceae presentan principalmente monoterpenos y sesquiterpenos como componentes mayoritarios (Dorman y Deans, 2000; Cimanga *et al.*, 2002; Sacchetti *et al.*, 2005; Sartorelli *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2014). Aunque en algunas especies como *Psidium guajava* y *Monimiastrum globosum* se reportan saponinas, taninos, y flavonoides. Por esta razón es importante conocer la composición de los aceites que resultaron genotóxicos y evaluar el efecto de estos componentes por separado, para así determinar cuál o cuáles son responsables de la actividad genotóxica encontrada en los aceites evaluados.

En la tabla 2 se presentan los resultados del estudio de antigenotoxicidad correspondientes a los AE que en el ensayo de genotoxicidad resultaron negativos. El AE de la especie BIO-AT-sa-W28E no presentó un efecto antigenotóxico marcado frente a R-UVB, ya que la inhibición de la genotoxicidad únicamente fue significativa para la dosis más alta evaluada (3.33 % v/v). Por el contrario, los AE de las especies vegetales BIO-AT-sa-W36E y BIO-AT-sa-W38E mostraron un claro efecto antígenotóxico, ya que

ambos disminuyen el daño inducido en el ADN por la R-UVB de forma dosis dependiente. Esta disminución de la genotoxicidad fue significativa a partir de la dosis 0.21 % v/v para BIO-AT-sa-W36E y 0.10 % v/v para BIO-AT-sa-W38E, logrando para esas concentraciones una inhibición de la genotoxicidad del 65 y 87% respectivamente. Con estos resultados, los AE obtenidos de estas dos especies, en especial el AE de la especie BIO-AT-sa-W38E, se perfilan como los candidatos más promisorios para ser usados como fotoprotectores. Esto ya que cuentan con la mayor protección a la menor concentración reportada hasta el momento para los extractos evaluados en el macroproyecto del cual hace parte la presenta pasantía de investigación.

Los resultados obtenidos en este trabajo, concuerdan con la información registrada en estudios previos sobre esta familia. Diferentes especies de la familia Asteracea son usadas en la medicina tradicional por sus propiedades antisépticas, diuréticas, protectoras de la piel, antiinflamatorias, antibacterianas y analgésicas (Elgorashi *et al.*, 2003; Singh y Agarwal, 2005; Hodges y Bennett, 2006; Hernandez *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011; Acquaviva *et al.*, 2012). Para nuestro objeto de interés es notorio el caso de *Calendula officinalis*, especie que ha demostrado tener la capacidad de prevenir los daños causados al ADN por exposición a R-UVB en ratones albinos (Mishra *et al.*, 2011; Mukherjee *et al.*, 2011; Mishra *et al.*, 2012), además de prevenir los daños producidos al material genético por un agente quelante como el metilmeta-sulfonato (Dimer *et al.*, 2012).

Los AE de plantas de esta familia contienen principalmente fenoles, polifenoles y flavonoides, compuestos para los que se ha demostrado alta capacidad antioxidante (Soobratteea *et al.*, 2005), la cual está relacionado con su capacidad para prevenir el daño causado al ADN por la R-UVB (Singh y Agarwal, 2005; Acquaviva *et al.*, 2012; Jarzycka *et al.*, 2013). Los polifenoles, flavonoides y sinergias de estos con otros antioxidantes pueden prevenir los efectos adversos de la R-UVB al evitar la formación de especies reactivas del

oxígeno, inhibiendo así el daño oxidativo (Fonseca *et al.*, 2010; Mishra *et al.*, 2012).

TABLA 1: Efecto genotóxico de los aceites esenciales medido en el ensayo SOS chromotest

Familia	Asteraceae						Myrtaceae			
	BIO-AT-sa-W28E		BIO-AT-sa-W38E		BIO-AT-sa-W36E		BIO-MY-sa-W05E		BIO-MY-sa-W07E	
Código de identificación										
Tratamiento	FI		FI		FI		FI		FI	
C- H2O	1.0 ± 0.03		1.0 ± 0.05		1.0 ± 0.05		1.0 ± 0.05		1.0 ± 0.05	
C+ 2,34 µM	7.9 ± 0.66		8.7 ± 1.02		8.2 ± 0.57		11.1 ± 1.03		9.7 ± 0.67	
3.33 % v/v	1.4 ± 0.11	n.s.	1.3 ± 0.12	n.s.	1.6 ± 0.09	n.s.	0.8 ± 0.03	n.s.	1.3 ± 0.06	n.s.
1.67 % v/v	1.1 ± 0.10	n.s.	1.4 ± 0.15	n.s.	1.6 ± 0.37	n.s.	1.0 ± 0.08	n.s.	1.7 ± 0.14	n.s.
0.83 % v/v	1.0 ± 0.06	n.s.	0.7 ± 0.03	n.s.	1.4 ± 0.29	n.s.	8.1 ± 0.36 *		8.6 ± 0.47 *	
0.42 % v/v	1.1 ± 0.09	n.s.	0.7 ± 0.06	n.s.	0.9 ± 0.12	n.s.	5.8 ± 0.44 *		3.2 ± 0.47 *	
0.21 % v/v	1.2 ± 0.07	n.s.	0.9 ± 0.04	n.s.	0.9 ± 0.07	n.s.	2.2 ± 0.20 *		1.7 ± 0.15	n.s.
0.10 % v/v	1.1 ± 0.07	n.s.	1.1 ± 0.06	n.s.	0.8 ± 0.03	n.s.	1.3 ± 0.10	n.s.	1.2 ± 0.12	n.s.
0.05 % v/v	1.3 ± 0.09	n.s.	0.9 ± 0.04	n.s.	0.9 ± 0.17	n.s.	1.2 ± 0.09	n.s.	1.2 ± 0.16	n.s.
0.03 % v/v	1.3 ± 0.09	n.s.	1.0 ± 0.06	n.s.	0.9 ± 0.04	n.s.	1.0 ± 0.04	n.s.	1.4 ± 0.15	n.s.
0.01 % v/v	1.4 ± 0.17	n.s.	1.8 ± 0.35	n.s.	1.2 ± 0.13	n.s.	1.1 ± 0.07	n.s.	1.2 ± 0.15	n.s.

Valores promedio del factor de inducción SOS (FI) de un mínimo de tres experimentos independientes con cuatro réplicas cada uno. *Aumento significativo ($p < 0,05$) con respecto al control negativo. n.s no se encontró diferencia significativa.

TABLA 2: Efecto antigenotóxico de los aceites esenciales medido en el ensayo SOS chromotest

Código de identificación	BIO-AT-sa-W28E				BIO-AT-sa-W38E				BIO-AT-sa-W36E			
	FI		%IG		FI		%IG		FI		%IG	
C- H2O	1.0	± 0.04			1.0	± 0.03			1.0	± 0.08		
C+ 2,34 µM	6.5	± 0.17			9.2	± 0.71			5.5	± 0.46		
3.33 % v/v	0.8	± 0.07	*	100	1.4	± 0.14	*	95	1.1	± 0.15	*	97
1.67 % v/v	2.3	± 0.36	n.s	77	1.5	± 0.19	*	94	1.2	± 0.16	*	95
0.83 % v/v	4.4	± 0.47	n.s	38	1.4	± 0.21	*	95	1.4	± 0.86	*	90
0.42 % v/v	7.7	± 0.23	n.s	0	1.4	± 0.19	*	95	1.5	± 0.47	*	88
0.21 % v/v	6.7	± 0.32	n.s	0	1.5	± 0.17	*	94	2.6	± 0.38	*	65
0.10 % v/v	5.9	± 0.2	n.s	9	2.1	± 0.31	*	87	4.2	± 0.44	n.s	29
0.05 % v/v	9.1	± 0.41	n.s	0	8.0	± 1.04	n.s	15	4.8	± 0.57	n.s	16
0.03 % v/v	8.2	± 0.29	n.s	0	7.5	± 0.41	n.s	20	6.0	± 0.41	n.s	0
0.01 % v/v	7.3	± 0.55	n.s	0	9.8	± 1.23	n.s	0	5.5	± 0.64	n.s	0

Valores promedio del factor de inducción SOS (FI) de un mínimo de tres experimentos independientes con cuatro réplicas cada uno. %IG, 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.

5. CONCLUSIONES

Los aceites esenciales de la familia Myrtaceae, BIO-MY-sa-W05E y BIO-MY-sa-W07E, presentaron efecto genotóxico en este modelo biológico. Mientras dos aceites de la familia Asteraceae, BIO-AT-sa-W36E y BIO-AT-sa-W38E mostraron un alto potencial antigenotóxico frente a R-UVB, en especial el AE BIO-AT-sa-W38E, perfilándose como extractos promisorios en el campo de la fotoprotección. En ambos casos, es necesario hacer estudios posteriores para identificar cual es el componente activo responsable de cada actividad.

6. RECOMENDACIONES

Se recomienda identificar taxonómicamente las especies a las cuales pertenece cada aceite esencial. Así como realizar estudios de los aceites que resultaron genotóxicos y antígenotóxicos en otros modelos biológicos, donde se usen células de mamífero, para confirmar su toxicidad y antígenotoxicidad. Finalmente es necesario conocer de manera exacta la composición de los aceites esenciales aquí analizados para luego realizar pruebas de manera independiente con los componentes aislados, de esta manera se podría determinar cuál o cuáles son los responsables de la actividad genotóxica y antígenotóxica respectivamente.

7. BIBLIOGRAFIA

Acquaviva, R., Di Giacomo, C., Malaguarnera, M...lauk, L. 2012. Biological activities of extract of *Anthemis aetnensis* Schouw: In vitro evaluation. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(10), 1919-1925. doi 10.5897/JMPR011.1567.

Afaq, F., Katiyar, S. 2011. Polyphenols: skin Photoprotection and Inhibition of Photocarcinogenesis. *Mini Rev Med Chem*, 11(14), 1200-1215.

Aicha, N., Ines, S., Mohamed, B...Leila, C. 2008. Chemical Composition, Mutagenic and Antimutagenic Activities of Essential Oils from (Tunisian) *Artemisia campestris* and *Artemisia herba-alba*. *Journal of Essential Oil Research*, 20, 471- 477.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475. doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106.

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223 – 253.

Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L...Vlietinck, A. 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 213– 220.

De Flora, S. (1998). Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research*, 402(1-2), 151–158.

Dimer, D., da Rosa, R., Pazini, B., Martins, A...Moraes, V. 2012. Genotoxic and Antigenotoxic Properties of *Calendula officinalis* Extracts in Mice Treated with Methyl Methanesulfonate. *Advances in Life Sciences*, 2(2), 21-28. doi: 10.5923/j.als.20120202.05.

Dorman, H., Deans, S. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308–316.

Elgorashi, E., Taylor, J. Maes, A., Staden, J., De Kimpe, N.,Verschaeve, L. 2003. Screening of medicinal plants used in South African traditional medicine for genotoxic effects. *Toxicology Letters*, 143, 195-207. doi:10.1016/S0378-4274(03)00176-0.

Espey, D. K., Wu, C., Swan, J., Wiggins, C., Jim, M., Ward, E...Edwards, B. K. 2007. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2004, featuring cancer in American Indians and Alaska Natives. *Cancer*, 110(10), 2119–2152. doi:10.1002/cncr.23044

Fonseca, Y., Dias, C., Vicentini, F., Nomizo, A., Gerlach, R., Vieira, M. 2010. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase

secretion. *Journal of Ethnopharmacology*, 127, 596–601. doi:10.1016/j.jep.2009.12.019

Fuentes, J., Alonso, A., Cuétara, E., Vernhe, M., Alvarez, N., Sánchez-Lamar, A., Llagostera, M. 2006. Usefulness of the SOS Chromotest in the study of medicinal plants as radioprotectors. *International Journal of Radiation Biology*, 82(5), 323–329. doi:10.1080/09553000600733168

Gallagher, P., Lee, K. 2006. Adverse effects of ultraviolet radiation: a brief review. *Progress in Biophysics and Molecular Biology B: Biology*, 92(1), 119-131.

Gilaberte, Y., Gonzalez, S. 2010. Update on Photoprotection. *ACTAS Dermo-Sifiliográficas*, 101(8), 659-672.

Hazane, F., Sauvaigo, S., Douki, T., Favier, A., Beani, J. 2006. Age-dependent DNA repair and cell cycle distribution of human skin fibroblasts in response to UVA irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 82, 214–223.

Hernández-Ceruelos, A., Madrigal-Santillán, E., Morales-González, J., Chamorro-Cevallos, G., Cassani-Galindo, M., Madrigal-Bujaidar, E. 2010. Antigenotoxic Effect of Chamomilla recutita(L.) Rauschert Essential Oil in Mouse Spermatogonial Cells, and Determination of Its Antioxidant Capacity in Vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 3793-3802. doi:10.3390/ijms11103793.

Hodges, S., Bennett, B. 2006. The Ethnobotany of *Pluchea carolinensis*(Jacq.) G. Don (Asteraceae) in the Botánicas of Miami, Florida. *Economic Botany*, 60(1),75-84. dx.doi.org/10.1663/0013-0001.

Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyo, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M...Horikawa, T. 2003. UV-induced skin damage. *Toxicology*, 189(1-2), 21–39. doi:10.1016/S0300-483X(03)00150-1.

Jarzycka, A., Lewinska, A., Gancarz, R., Wilk, K. 2013. Assessment of extracts of *Helichrysum arenarium*, *Crataegus monogyna*, *Sambucus nigra* in photoprotective UVA and UVB; photostability in cosmetic emulsions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 128, 50–57. doi: /10.1016/j.jphotobiol.2013.07.029.

Jeong, B., Ju, Y., Park, H., Lee, R., Yun, W., Kwon, T., Jeong, J. 2009. Antioxidant activity in essential oils of *Cnidium officinale* Makino and *Ligusticum sinense* hort and their inhibitory effects on DNA damage and apoptosis induced by ultraviolet B in mammalian cell. *Cancer epidemiology*, 33(1), 41-46.

Katiyar, S., Mantena, S., Meeran, S. 2011. Silymarin Protects Epidermal Keratinocytes from Ultraviolet Radiation-Induced Apoptosis and DNA Damage by Nucleotide Excision Repair Mechanism. *Plos One* 6 (6). doi:10.1371/journal.pone.0021410.

- 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(1-2), 127–130. doi:10.1016/j.jep.2005.05.028.
- López, A., Stashenko, E., Fuentes, J. 2011. Chemical composition and antigenotoxic properties of *Lippia alba* essential oils. *Genetics and Molecular Biology*, 34, 479-488.
- Madronich, S., McKenzie, R. L., Björn, L. O., Caldwell, M. M. 1998. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 46(1-3), 5–19.
- Marrot, L., Belaïdi, J., Meunier, J. 2005. Importance of UVA photoprotection as shown by genotoxic related end points: DNA damage and p53 status. *Mutation Research*, 571(1-2), 175–84. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.07.020.
- Matsumura, Y., Ananthaswamy, H. N. 2004. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 195(3), 298–308. doi:10.1016/j.taap.2003.08.019.
- Mishra, A.K., Mishra, A., Chattopadhyay, P. 2011. Assessment of In Vitro Sun Protection Factor of *Calendula Officinalis* L. (Asteraceae) Essential Oil Formulation. *Journal of Young Pharmacists*, 4(1)17–21. doi: 10.4103/0975-1483.93575.
- Mishra, A.K., Mishra, A., Verma, A., Chattopadhyay, P. 2012. Effects of *Calendula* Essential Oil-Based Cream on Biochemical Parameters of Skin of Albino Rats against Ultraviolet B Radiation. *Scientia Farmaceutica*, 80, 669–683. doi 10.3797/scipharm.1112-18.
- Morse, M., Stoner, G. D. 1993. Cancer chemoprevention: principles and prospects. *Carcinogenesis*, 14(9), 1737–46.
- Mukherjee, P., Maitya, N., Nema, N., Sarkar, B. 2011. Bioactive compounds from natural resources against skin aging. *Phytomedicine*, 19, 64–73.
- Narayanan, D., Saladi, R., Fox, J. 2010. Ultraviolet radiation and skin cancer. *International Journal of Dermatology*, 49, 978–986.
- Nichols, J., Katiyar, S. K. 2010. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of Dermatological Research*, 302(2), 71–83. doi:10.1007/s00403-009-1001-3.
- Ofodile, N., Chikere-Nwakanma, N., Mordi, M., Ademolu, O., Ezimoke, I., Owoso, J. 2013. Genotoxic and antimicrobial studies of the leaves of *Psidium guajava*. *EurAsian Journal of BioSciences*, 7, 60-68.
- Oliveira, P., Monteiro, M., Leandro, L., Bastos, J., daSilva, A., Tavares, D. 2011. In Vivo Antigenotoxicity of Baccharin, an Important Constituent of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 109, 35–41. doi: 10.1111/j.1742-7843.2011.00680.x.

Perdiz, D., Grof, P., Mezzina, M., Nikaido, O., Moustacchi, E., Sage, E. 2000. Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis. *The Journal of biological chemistry*, 275:26732–26742.

Pereira, T., Rocha de Sant'Anna, J., Silva, E., Pinheiro, A., Alves de Castro-Prado, M. 2014. In vitro genotoxicity of Melaleuca alternifolia essential oil in human lymphocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, 151, 852–857. doi: 10.1016/j.jep.2013.11.045

Purdue, M. P., Freeman, B., Anderson, W. F., Tucker, M. 2008. Recent trends in incidence of cutaneous melanoma among US Caucasian young adults. *The Journal of Investigative Dermatology*, 128(12), 2905–2908. doi:10.1038/jid.2008.159.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79, 5971-5975.

Quillardet, P., Hofnung, M. 1985. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutation Research*, 147, 65-78.

Quintero, N., Stashenko, E. E., Fuentes, J. L. 2012. The influence of organic solvents on estimates of genotoxicity and antigenotoxicity in the SOS chromotest. *Genetics and Molecular Biology* 35, 503-514. doi: 10.1590/S1415-47572012000300018.

Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91, 621–632.

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(2), 149–157. doi:10.1016/j.jep.2005.11.033.

Sancar, A., Rupp, D. 1983. A novel repair enzyme: UVRABC excision nuclease of *Escherichia coli* cuts a DNA strand on both sides of the damaged region. *Cell*, 33(1), 249-260.

Sartorelli, P., Marquioreto, A., Amaral-Baroli, A., Lima, M., Moreno, P. 2007. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from Two Species of *Eucalyptus*. *Phytoterapy Research*, 21, 231-233.

Singh, R., Agarwal, R. 2005. Mechanisms and preclinical efficacy of silibinin in preventing skin cancer. *European Journal of Cancer*, 41, 1969–1979. doi:10.1016/j.ejca.2005.03.033.

Sinha, R., Häder, P. 2002. UV-induced DNA damage and repair: a review.

Photochemical & Photobiological Sciences, 1, 225–236.

Soobratteea, M., Neergheen, V., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O., Bahorun, T. 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*, 579, 200–213. doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.03.023.

Stefanello, M., Pascoalb, A., Salvador, M. 2011. Essential Oils from Neotropical Myrtaceae: Chemical Diversity and Biological Properties. *Chemistry & Biodiversity*, 8, 73-94.

Taylor, J., Elgorashi, E., Maes, A., Van Gorp, U., De Kimpe, N., Staden, J., Verschaeve, L. 2003. Investigating the Safety of Plants Used in South African Traditional Medicine: Testing for Genotoxicity in the Micronucleus and Alkaline Comet Assays. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 42, 144 –154.

Vicuña, G., Stashenko, E., Fuentes, J. 2010. Chemical composition of the Lippia organoides essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. *Fitoterapia* ,81, 343–349.

Yesilada, E. 2005. Past and future contributions to traditional medicine in the health care system of the Middle-East. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 135–137. doi:10.1016/j.jep.2005.06.003

Zaidi, M., Day, C., Merlino, G. 2008. From UVs to Metastases: Modeling Melanoma Initiation and Progression in the Mouse. *Journal of Investigative Dermatology*, 128, 2381–2391. doi:10.1038/jid.2008.177.

Nombre y firma de los Responsables:

Rowens Andreick Cristancho Gómez
Estudiante

Jorge Luis Fuentes Lorenzo
Director del Grupo.

Nathalia Quintero Ruiz
Tutor

