

Estudio del Efecto Genotóxico y Potencial Antigenotóxico de Aceites Esenciales de Especies Vegetales de las Familias Asteraceae y Verbenaceae Frente a Radiación Ultravioleta Tipo B

Silvia Juliana Flórez González

Trabajo de Grado Presentado como Requisito  
para Optar al Título en Biología

Director  
Jorge Luis Fuentes Lorenzo  
Microbiólogo, PH.D.

Universidad Industrial de Santander  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Biología  
Bucaramanga  
2018

### **Agradecimientos**

A mi familia por el apoyo, amor y empuje durante todos estos años.

Al profesor Jorge Luis Fuentes por la oportunidad, el apoyo y la confianza durante el desarrollo de mi proyecto de grado.

A mis compañeros de laboratorio Carlos, Jhon, Kevin y especialmente a Diego Contreras y Adriana García por la ayuda y guía.

A Mateo, Angie, Leydy, John, Daniel, Sergio, Bianeth y todos mis amigos por los buenos momentos y enseñanzas durante la carrera.

A los docentes y administrativos de la Escuela de Biología.

A la Universidad Industrial de Santander y Colciencias.

## Tabla de Contenido

	<b>Pág.</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>10</b>
<b>1. Objetivos .....</b>	<b>13</b>
1.1 <i>Objetivo General.....</i>	<i>13</i>
1.2 <i>Objetivos Específicos .....</i>	<i>13</i>
<b>2. Marco Teórico .....</b>	<b>13</b>
2.1 <i>Radiacion UV y sus Efectos .....</i>	<i>15</i>
2.2 <i>Uso de Plantas y Aceites en Fotoprotección .....</i>	<i>17</i>
2.3 <i>Ensayo Sos Chromotest.....</i>	<i>18</i>
<b>3. Materiales y Métodos.....</b>	<b>20</b>
3.1 <i>Material Biológico.....</i>	<i>20</i>
3.2 <i>Cepa Bacteriana y Condiciones De Cultivo .....</i>	<i>21</i>
3.3 <i>Ensayo de Genotoxicidad .....</i>	<i>21</i>
3.4 <i>Ensayo de Antigenotoxicidad.....</i>	<i>22</i>
3.5 <i>Ensayo Enzimático y Cálculos.....</i>	<i>23</i>
3.6 <i>Análisis Estadístico.....</i>	<i>24</i>
<b>4. Resultados.....</b>	<b>25</b>
4.1 <i>Efecto Genotóxico de los AE.....</i>	<i>25</i>
4.2 <i>Efecto Antigenotóxico de los AE.....</i>	<i>27</i>
<b>5. Discusión .....</b>	<b>28</b>
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>33</b>
<b>7. Recomendaciones .....</b>	<b>34</b>
<b>Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>35</b>
<b>Apéndices .....</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

**Lista de Tablas**

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Aceites esenciales utilizados en este estudio. ....	20
<b>Tabla 2.</b> Descripción para el procedimiento del ensayo enzimático. ....	23
<b>Tabla 3.</b> Análisis de genotoxicidad de los 15 aceites esenciales a través del ensayo SOS Chromotest. ....	25

**Lista de Ilustraciones**

	<b>Pág.</b>
<b>Ilustración 1.</b> Espectro de la radiación UV y sus efectos biológicos y físico-químicos. Fuente: Tomado de (Matsumura & Ananthaswamy, 2004).....	15
<b>Ilustración 2.</b> Regulación de la respuesta SOS en <i>E. coli</i> . ....	18
<b>Ilustración 3.</b> Porcentaje de inhibición de la genotoxicidad (%IG) frente a la UVB de los aceites esenciales de la familia Asteraceae en el rango de concentración evaluado. ....	27
<b>Ilustración 4.</b> Porcentaje de inhibición de la genotoxicidad (%IG) frente a la UVB de los aceites esenciales de la familia Asteraceae en el rango de concentración evaluado .....	28

### Resumen en Español

**TÍTULO:** ESTUDIO DEL POTENCIAL ANTIGENOTÓXICO DE ACEITES ESENCIALES DE ESPECIES VEGETALES DE LAS FAMILIAS ASTERACEA Y VERBENACEA FRENTE A RADIACIÓN ULTRAVIOLETA TIPO B\*

**AUTOR:** SILVIA JULIANA FLÓREZ GONZÁLEZ\*\*

**PALABRAS CLAVES:** ANTIGENOTOXICIDAD, GENOTOXICIDAD, SOS CHROMOTEST, RADIACIÓN ULTRAVIOLETA, ACEITES ESENCIALES.

#### DESCRIPCIÓN:

La radiación ultravioleta (UV) que compone la luz solar es esencial para la vida de la vasta mayoría de los seres vivos en la tierra; sin embargo, la sobre exposición a la UV conduce al fotoenvejecimiento y al cáncer de piel. La radiación ultravioleta tipo B (UVB) es el componente más energético de la radiación solar que llega a la superficie terrestre. Sus principales reacciones fotoquímicas implican la absorción directa de sus fotones por las bases nitrogenadas formando daños en el ADN conocido como fotoproductos. Con el fin de encontrar nuevas sustancias que prevengan y/o reparen el daño causado por la radiación UV, ha crecido el interés por el estudio de compuestos de origen natural. En este contexto, los aceites esenciales (AE) son mezclas complejas de compuestos naturales que tienen diversas actividades biológicas, que los convierte en una fuente promisoría de compuestos útiles para la fotoprotección de la piel. En el presente trabajo, se evaluó el potencial antigenotóxico de 10 aceites esenciales obtenidos de plantas de las familias Asteraceae y 5 de la familia Verbenaceae, frente al efecto genotóxico de la UVB. Para evaluar la genotoxicidad y la antigeototoxicidad de los AE, se usó el ensayo bacteriano SOS Chromotest; un ensayo colorimétrico que ha mostrado una alta sensibilidad para la detección del efecto genotóxico producido por la UV. De todos los AE estudiados, solo dos obtenidos de especies de la familia Asteraceae (*Ageratina popayanensis* BIO-ATSaV40E y *Coleostephus* sp. BIO-ATSaV62E) mostraron un efecto genotóxico. Así mismo, los aceites de *Wedelia stuebelii* BIO-ATSaV66E, *Tagetes caracasana* BIO-ATSaV50E y *Lippia organoides* BIO-VEVcV34E y BIO-VEarV01E exhibieron actividad antigenotóxica frente a la UVB con dependencia de su concentración. Los resultados son discutidos considerando las especies de plantas promisoría de compuestos potencialmente fotoprotectores.

---

\*Tesis de Grado

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

### Resumen en Inglés

**TITLE:** STUDY OF THE ANTIGENOTOXIC POTENTIAL OF ESSENTIAL OILS OF VEGETABLE SPECIES OF THE FAMILIES ASTERACEA AND VERBENACEA AGAINST ULTRAVIOLET RADIATION TYPE B\*

**AUTHOR:** SILVIA JULIANA FLÓREZ GONZÁLEZ\*\*

**KEYWORDS:** ANTIGENOTOXICITY, GENOTOXICITY, SOS CHROMOTEST, UV RADIATION, ESSENTIAL OILS.

#### DESCRIPTION:

The ultraviolet (UV) radiation that makes up sunlight is essential to the lives of the vast majority of living things on earth; however, overexposure to UV leads to photo-aging and skin cancer. Ultraviolet type B (UVB) radiation is the most energetic component of solar radiation reaching the earth's surface. Its main photochemical reactions involve the direct absorption of its photons by nitrogenous bases forming damage in the DNA known as photoproducts. In order to find new substances that prevent and/or repair the damage caused by UV radiation, interest has grown in the study of compounds of natural origin. In this context, essential oils (EO) are complex mixtures of natural compounds that have diverse biological activities, making them a promising source of compounds useful for skin photoprotection. In the present work, the antigenotoxic potential of 10 essential oils obtained from plants of the families Asteraceae and 5 of the family Verbenaceae were evaluated, against the genotoxic effect of the UVB. To evaluate the genotoxicity and anti-geotoxicity of the EO, the bacterial SOS Chromotest was used; a colorimetric assay that has shown a high sensitivity for the detection of the genotoxic effect produced by the UV. Of all the EO studied, only two obtained from species of the family Asteraceae (*Ageratina popayanensis* BIO-ATSaV40E and *Coleostephus* sp. BIO-ATSaV62E) showed a genotoxic effect. Likewise, *Wedelia stuebelii* BIO-ATSaV66E, *Tagetes caracasana* BIO-ATSaV50E and *Lippia origanoides* BIO-VEVcV34E and BIO-VEarV01E oils exhibited antigenotoxic activity against UVB depending on their concentration. The results are discussed considering the promising plant species of potentially photoprotective compounds.

---

\*Thesis Project.

\*\*Faculty of Sciences, Program of Biology. Universidad Industrial de Santander. Director: Jorge L. Fuentes Lorenzo. Microbiologist Ph.D.

## Introducción

En la actualidad se acepta que el cáncer de piel es producto de un proceso complejo que involucra daños en el ADN asociado con la sobreexposición cutánea a la radiación ultravioleta (UV) y con los defectos en su reparación; aunque muchos factores genéticos, geográficos, sociales, económicos y culturales también influyen en la determinación de esta enfermedad (Sánchez et al., 2011).

Los efectos de la UV se asocian con daños directos e indirectos. Los directos se producen a través de la absorción de fotones por el ADN en los rangos espectrales de radiación ultravioleta B (UVB) (280 -315 nm) y radiación ultravioleta A (UVA) (320 - 400 nm) dando lugar a fotoproductos diméricos entre bases adyacentes como: dímeros de pirimidina de ciclobutano (CPD), fotoproductos de pirimidina (6-4) pirimidona e isómeros de valencia de Dewar. Los indirectos se producen a través de la acción de radicales libres del oxígeno, originando mayormente bases oxidadas en el ADN. Todos estos tipos de daños genéticos, pueden conducir a la inducción de mutaciones (Griffiths et al., 1998; Schuch et al., 2012a; Mouret et al., 2006).

La Fotoprotección surge como una estrategia preventiva y terapéutica frente a este estado de inestabilidad genética que conduce al fotoenvejecimiento, inmunosupresión y el cáncer de piel. Esta estrategia involucra medidas como: evitar la exposición solar utilizando prendas adecuadas (sombreros, gafas de sol) y usar bloqueadores solares que protegen del efecto mutagénico, carcinogénico e inmunosupresor de la UV (Gilaberte & González, 2010; Afaq, 2011; Schuch et al., 2012b).

La búsqueda de inhibidores de la mutagénesis (o antimutagenos) constituye la estrategia base para descubrir agentes anticarcinogénicos en las fases iniciales de los procesos tumorales (Simić et al., 1998). Una clasificación práctica de los antimutagenos incluye los desmutágenos y los bioantimutágenos (Kada & Shimoi, 1987). Los primeros causan modificación química y bioquímica del mutágeno antes que este dañe el ADN, mientras que los segundos interfieren con los procesos celulares de fijación de la mutación; por ejemplo sustancias que actúan en el proceso de reparación y replicación del ADN en las células afectadas (Kuroda & Inoue, 1988).

Los compuestos fitoquímicos surgen en la actualidad como una clase de agentes fotoprotectores menos tóxicos que los compuestos sintéticos (Afaq, 2011). Las plantas tienen vías metabólicas que producen naturalmente compuestos para protegerlas contra la sobreexposición solar (Zhang & Björn, 2009); por lo tanto, ellas pueden ser fuentes de compuestos antimutagenos que previenen mutaciones celulares involucradas en el cáncer de piel en humanos cáncer y fotoenvejecimiento de piel mediante la regulación de la mutabilidad inducida por UV (Nichols & Katiyar, 2009; Afaq, 2011; Afaq & Katiyar, 2011; Quintero et al, 2017). Dentro de los extractos vegetales que presentan grandes utilidades en este campo se encuentran los aceites esenciales (AE), productos naturales derivados de plantas aromáticas que tienen una amplia gama de usos en medicina (Chanchal & Swarnlata, 2008). Entre sus bioactividades, los AE presentan propiedades antígenotóxicas (Bakkali et al., 2006). Varios AE obtenidos de plantas colombianas y sus componentes mayoritarios exhiben propiedades antimutagénicas frente a una amplia diversidad de mutágenos (Vicuña et al., 2010; López et al., 2011; Quintero et al, 2012; Quintero et al, 2017).

Para la identificación y estudio de tales sustancias, se requiere de ensayos sensibles y de alta procesatividad. El SOS Chromotest (Quillardet et al., 1982), es un test colorimétrico que usa la

cepa *Escherichia coli* PQ37, la cual es capaz de estimar el daño primario al ADN producido por agentes genotóxicos midiendo la expresión de un gen reportero ( $\beta$ -galactosidasa) que produce color en presencia de un sustrato. En la presente tesis se evaluó el efecto antígenotóxico frente a la UVB de quince (15) AE obtenidos de plantas colombianas provenientes de las familias Asteraceae y Verbenaceae mediante el ensayo SOS Chromotest. Este proyecto hace parte del Programa financiado por COLCIENCIAS: RC-0572-2012. Bioprospección y desarrollo de ingredientes naturales para las industrias cosmética, farmacéutica y de productos de aseo con base en la biodiversidad colombiana; en el marco del cual el Grupo de Investigación en Microbiología y Genética desarrolla los estudios de fotoprotección.

## 1. Objetivos

### 1.1 Objetivo General

Evaluar el potencial antigentóxico de 15 aceites esenciales pertenecientes a las familias Asteraceae y Verbenaceae frente al daño inducido por la UVB usando el SOS chromotest.

### 1.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la genotoxicidad de los 15 aceites esenciales en el ensayo SOS Chromotest
- Estimar el potencial antigenotico de los diferentes aceites frente al daño inducido al ADN por UVB mediante el ensayo SOS Chromotest

## 2. Marco Teórico

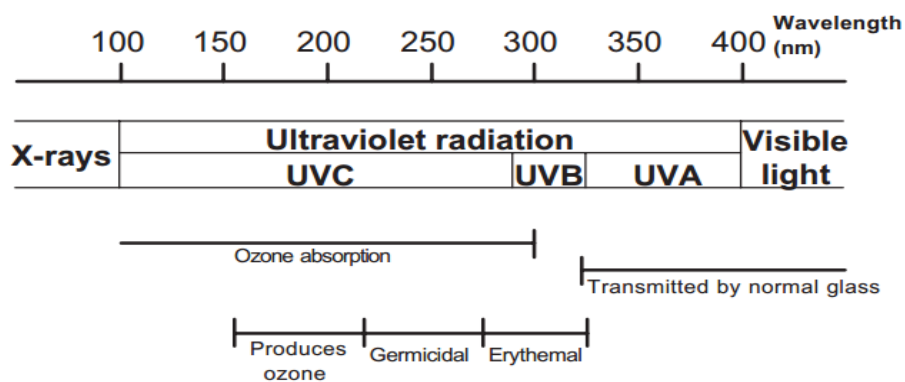
La UV que compone la luz solar es esencial para la vida de la vasta mayoría de los seres vivos en la tierra. En humanos, este agente estimula la producción de vitamina D en la piel; sin embargo, la sobre exposición a este agente conduce al fotoenvejecimiento y al cáncer de piel (Biniek et al., 2012). La UV es considerada uno de los agentes físicos más mutagénico de nuestro planeta (González et al., 2009). En términos epidemiológicos, la radiación solar constituye el mayor factor de riesgo para padecer cáncer de piel (Gandini et al., 2005; Purdue et al., 2008; Linos et al., 2009), pero una sobreexposición a este agente también produce respuestas inflamatorias e inmunosupresión (Vink & Roza, 2001).

El cáncer de piel, es el tipo más común de cáncer en poblaciones humanas alrededor del mundo. El cual se divide en dos tipos principales: melanoma y no melanoma (NMSC, por sus siglas en inglés); estos últimos, incluyen carcinomas de células basales y escamosas (BCC y SCC, respectivamente). El melanoma muestra los mayores índices de mortalidad. Por su parte, los NMSC se muestran más benigno con características localmente agresivas; pero, ellos son el tipo más común de cáncer en los seres humanos (Narayanan et al, 2010).

En el mundo se presentan en promedio 160.000 casos nuevos de melanoma por año, que representan el 90% de muertes por cáncer de piel. Según una estimación de la Sociedad Americana del Cáncer, la incidencia de cáncer de piel recientemente diagnosticado en los Estados Unidos por sí sola se estima en más de 1 millón por año (Afaq, 2011). Por otra parte, la incidencia de cáncer de piel en Colombia paso de 23 casos/100.000 habitantes en 2003 a 41 casos/100.000 en 2007. Se espera, que para el 2020 se presenten unos 102 casos nuevos de cáncer de piel cada 100.000 habitantes (Sánchez et al., 2011). Se ha podido establecer que la irradiación solar más alta se presenta en el trópico en horas del mediodía. Actualmente se cree que por cada 1.000 m de altitud sobre el nivel del mar (snm) se produce un aumento de un 5-7% de la irradiación solar que alcanza la superficie de la Tierra. Debido a esto Colombia, siendo un país ecuatorial y con un alto porcentaje de habitantes en alturas superiores a los 2.400 m sobre el nivel del mar, posee condiciones propicias para que sigan produciéndose incrementos en la incidencia de cáncer de piel. Esto sumado a un aumento de la irradiación solar debido a un deterioro de la capa de ozono de la atmósfera, podría agravar aún más este escenario (Schuch & Menck, 2010). Por ello, el estudio de agentes naturales alcanza cada día mayor importancia como un complemento de las estrategias de prevención para mitigar el impacto genotóxico de la sobreexposición a la radiación solar (Afaq, 2011).

## 2.1 Radiación UV y sus Efectos

La luz solar se compone de un espectro continuo de radiación electromagnética que se divide en tres regiones principales de longitudes de onda: UV, visible e infrarrojo. A su vez la UV se divide en tres tipos (Ilustración No.1): La UVC (100-280 nm) es totalmente filtrada por la capa de ozono en la estratosfera (aunque la exposición accidental podría producirse por lámparas germicidas), la radiación UVB (280-320 nm) que alcanza la superficie terrestre solo en un 5% y la UVA (320-400 nm) que alcanza la superficie terrestre en un 95% (Matsumura & Ananthaswamy, 2004).



**Ilustración 1.** Espectro de la radiación UV y sus efectos biológicos y físico-químicos. Fuente: Tomado de (Matsumura & Ananthaswamy, 2004).

El rango UV es el espectro más significativo de la luz solar, causante de fotoenvejecimiento y cáncer de piel. La UV que alcanza la superficie terrestre (UVA y UVB), están compuestas de longitud de onda larga y baja energía y longitud de onda corta y alta energía; respectivamente. Los fotones de UVB son mucho más energéticos que los de UVA y estos producen quemaduras solares, bronceado y son iniciadores de la carcinogénesis. Adicionalmente, en los últimos años se reconoce un papel potencial de los fotones UVA en la fotocarcinogénesis (Matsumura & Ananthaswamy, 2004). Por otra parte, se asume que el deterioro de la capa de ozono da como

resultado un aumento de la irradiación solar que alcanza la superficie terrestre y asimismo los efectos de irradiación UV afectan a la piel que es la principal barrera protectora contra agentes externos. (Narayanan et al., 2010; Griffiths et al., 1998; Besaratinia et al., 2011)

La UV causa dos tipos de daños sobre las células: daños directos e indirectos. Los primeros son provocados por la absorción de la energía del espectro de UV incidente por moléculas como proteínas, ADN y ARN, resultando en su degradación y/o transformación y por consiguiente en la pérdida o deterioro de su función biológica. Los segundos se producen cuando la UV es absorbida por compuestos intermedios, que en consecuencia producen especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) (Libkind et al., 2004). El máximo de absorción de luz por las moléculas de ADN es de 260 nm, por lo que UVC es la longitud de onda más efectiva para la inducción de fotoproductos de ADN; sin embargo, estas longitudes de onda no alcanzan la superficie de la Tierra (Schuch & Menck, 2010). La UVB causa reacciones fotoquímicas dentro del ADN que implican principalmente la absorción directa de los fotones por las bases, generando la formación de fotoproductos como: dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD), 6-4 pirimidina pirimidona (6-4 PP) e isómeros de valencia de Dewar, entre otros. Por otro lado, se pensaba que en el daño mediado por UVA predominaban las reacciones de fotosensibilización. Hoy se conoce, que después de la absorción de fotones UVA por cromóforos distintos al ADN, se producen sensibilizadores excitados que generan ROS; los cuales pueden dañar la molécula de ADN (Ravanat et al., 2001; Schuch & Menck, 2010). Sin embargo, estudios han demostrado que los CPDs son inducidos por UVA (340–400nm) en cantidades mayores que las lesiones generadas por oxidación (Tewari et al., 2012).

## 2.2 Uso de Plantas y Aceites en Fotoprotección

La fotoprotección se refiere a las medidas preventivas y terapéuticas adoptadas para proteger la piel contra el cáncer y fotoenvejecimiento (Gilaberte & González, 2010); mientras que la quimiopreención se refiere al uso de agentes que pueden inhibir, revertir o retardar el proceso de estos eventos dañinos en la piel expuesta al UV (Nichols & Katiyar, 2009).

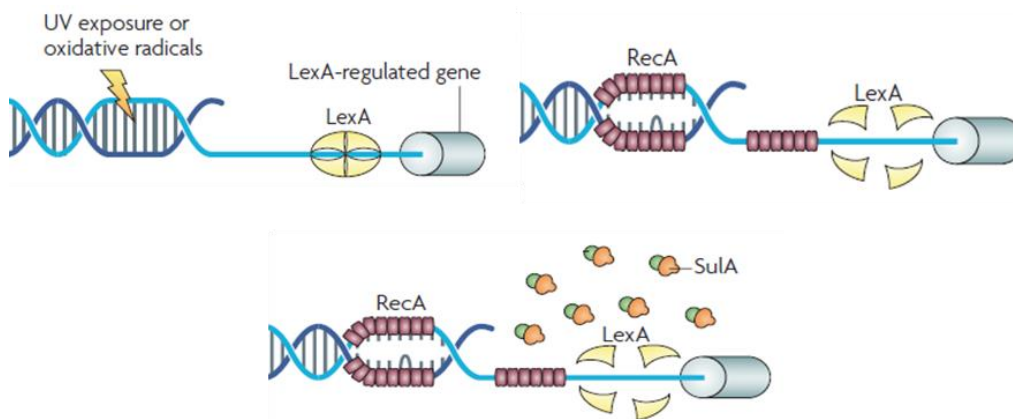
Los extractos botánicos son de naturaleza multifuncional porque poseen diversas propiedades como la fotoprotección, antienvjecimiento, antioxidante, anti-irritante y actividad antimicrobiana, algunas de ellas correlacionadas entre sí (Chanchal & Swarnlata, 2008). Algunos polifenoles (familia de compuestos ampliamente distribuidos en alimentos vegetales), son bien conocidos por tener efectos fotoprotectores. Entre estos se encuentran: las catequinas del té verde, el resveratrol y la delphinidina presente en las uvas, las proantocianidinas presentes en arándanos y la granada; así como, la genisteína presente en las semillas de soja; entre otras. Estas moléculas interfieren diferentes blancos celulares modulando: i) la inflamación, ii) la inmunosupresión, iii) el daño del ADN y su reparación y iv) las vías de señalización celular relacionadas con la foto-carcinogénesis (Afaq & Katiyar, 2011). Estudios realizados en modelos animales con estos polifenoles tienen la capacidad de proteger la piel de los efectos adversos de la radiación UV, incluido el riesgo de padecer cáncer de piel (Nichols & Katiyar, 2009).

Los AE son mezclas naturales muy complejas que pueden contener aproximadamente 20-60 componentes en concentraciones completamente diferentes (Idaomar et al., 2002). Entre sus bio-actividades, los AE presentan propiedades antigenotóxicas frente a una amplia gama de agentes mutagénicos, incluida la UV (ANEXO 1). Varias lociones o bloqueadores solares se basan en aceites naturales obtenidos de plantas como: almendra, aguacate, coco, semilla de algodón, oliva,

maní, ajonjolí sésamo y soja, entre otras (Kaur & Saraf, 2010). Por ejemplo, el aceite de sésamo absorben hasta el 30% de la UV; mientras que el coco, el maní, la aceituna y los aceites de semillas de algodón, bloquean aproximadamente el 20% (Korać & Khambholja, 2011). Generalmente, sus compuestos mayoritarios presentes a alta concentraciones, son responsables de sus propiedades biológicas; aunque se pueden presentar efectos sinérgicos entre los componentes del AE (Korać & Khambholja, 2011; Quintero et al., 2017).

### 2.3 Ensayo Sos Chromotest

Las bacterias son ampliamente usadas como organismos indicadores en sistemas de prueba para toxinas genéticas; ya que estas ofrecen ventajas prácticas y pueden proporcionar ideas sobre los mecanismos básicos de genotoxicidad (Quillardet et al., 1982). La respuesta SOS bacteriana, estudiada extensivamente en *E. coli*, es una respuesta global al daño del ADN que bloquea su replicación; en la cual se inducen diferentes rutas de reparación del daño en el ADN, genes para la mutagénesis y para el control del ciclo celular, entre otros (McKenzie *et al.* 2000; Andersson & Hughes, 2014) Esta respuesta celular es fuertemente inducida por agentes físicos como la UV (Janion, 2008). La regulación de la respuesta SOS en *E. coli* es resumida en la ilustración No. 2.



**Ilustración 2.** Regulación de la respuesta SOS en *E. coli*.

**Nota:** La exposición a UV o a los radicales oxidativos puede causar daños al ADN, llevando a la inducción del sistema de respuesta al daño del ADN (la respuesta SOS). Tras el daño se producen regiones de ADN de cadena simples (ssDNA) a las cuales se une la proteína RecA próxima a la horquilla de replicación formando un nucleofilamento que promueve la autoproteólisis del represor transcripcional SOS LexA y permite la transcripción de más de 30 genes vinculados a la respuesta SOS, lo que facilita reparación del ADN dañado. Fuente: tomado y modificado de (Justice et al., 2008).

El SOS Chomotest es un ensayo colorimétrico desarrollado en el Instituto Pasteur (Francia) para la detección de agentes carcinógenos. El ensayo se basa en la inducción de la respuesta SOS en *E. coli* cepa PQ-37; la cual es monitoreada mediante la expresión de la fusión genética (*sulA::LacZ*). En dicha construcción genética, el gen estructural de la  $\beta$ -galactosidasa (gen *lacZ*) del operon lactosa queda bajo el control del gen *sulA* (*sfia*), cuyo producto génico está implicado en la inhibición de la formación del septo celular de la división celular durante la respuesta SOS (Quillardet et al., 1982; Quillardet & Hofnung, 1985). La expresión de la  $\beta$ -galactosidasa es medida mediante un ensayo colorimétrico que usa un sustrato del enzima y su actividad constituye un indicador indirecto del daño inducido al ADN.

Adicionalmente, la cepa PQ-37 presenta una mutación (*rfa*) que afecta los lipopolisacáridos de la membrana celular (Koplow & Goldfine, 1974), permitiendo mejor difusión de las sustancias químicas evaluadas al interior celular (Quillardet & Hofnung, 1985). La cepa además presenta una mutación en el gen *uvrA* (Sancar et al., 1981) que produce una deficiente reparación por escisión de nucleótidos (NER, por sus siglas en inglés) (Sancar & Rupp, 1983). La NER es un mecanismo de reparación que elimina una amplia gama de lesiones que distorsionan el ADN, incluidos los CPDs y los 6-4PP mediante 4 pasos: I) Reconocimiento del daño, II) incisión dual en la cadena dañada para remover el segmento de hebra sencilla, III) llenado del hueco por la ADN polimerasa y IV) ligación del nuevo fragmento (Sinha & Häder, 2002). Al ser deficiente hace más sensible a la célula a una amplia variedad de daños genéticos que son reparados por

este mecanismo, como es el caso del daño producido por UV. Por último, la cepa contiene una mutación que la hace constitutiva para la actividad fosfatasa alcalina (Torriani & Rothman, 1961); la cual permite corregir los efectos producidos por la inhibición de la síntesis de proteína durante el ensayo. Las ventajas de este ensayo como son: uso de una sola cepa, obtención de los resultados en unas pocas horas y posibilidad de automatización; lo hacen útil en la búsqueda de agentes protectores del daño genético producido por la UV (Quillardet & Hofnung, 1985).

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1 Material Biológico

Diez (10) AE obtenidos de especies de la familia Asteraceae y cinco (5) de especies de Verbenaceae (Tabla No 1); los cuales fueron obtenidos mediante hidrodestilación asistida por radiación de microondas (Stashenko et. al., 2013), fueron suministrados por el Centro Nacional de Investigación para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM) y almacenados según las indicaciones en el Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental (LMMA).

**Tabla 1.**

*Aceites esenciales utilizados en este estudio.*

Aceite	Familia	Especie	Localidad
BIO-ATSaV66E	Asteraceae	<i>Wedelia stuebelii</i>	
BIO-ATSaV50E		<i>Tagetes caracasana</i>	
BIO-ATSaV60E		<i>Elaphandra quinquenervis</i>	
BIO-ATSaV62E		<i>Coleostephus sp</i>	
BIO-ATVcV31E		<i>Wedelia calycina</i>	Dagua, Valle del Cauca
BIO-ATSaV40E		<i>Ageratina popayanensis</i>	Zapatoca, Santander

Aceite	Familia	Especie	Localidad
BIO-ATSaV56E		<i>Austroeupatorium inulifolium</i>	
BIO-ATSaV58E		<i>Senecio sp</i>	
BIO-ATSaV52E		<i>Baccharis trinervis</i>	
BIO-ATVcV19E		<i>Baccharis decusata</i>	La Cumbre, Valle del C.
BIO-VEVcV07E	Verbenaceae	<i>Lantana colombiana</i>	La Cumbre, Valle del C.
BIO-VESaV42E		<i>Lantana canescens</i>	
BIO-VEarV01E		<i>Lippia organoides</i>	Tame, Arauca
BIO-VEVcV34E		<i>Lippia organoides</i>	Girón, Santander
BIO-VEVcV11E		<i>Chromolaena odorata</i>	Yumbo, Valle del Cauca

### 3.2 Cepa Bacteriana y Condiciones De Cultivo

Para los análisis de genotoxicidad y antigenotoxicidad se utilizó el ensayo SOS Chromotest (Quillardet et al., 1982) siguiendo el procedimiento descrito por Fuentes *et al.* (2006). El análisis inició con un cultivo de la cepa *E. coli* PQ37 (F- thr leu his-4 pyrD thi galE galK or galT lac  $\Delta$ U169 srl300::Tn10 rpoB rpsL rfa trp::Muc+ sfiA::Mud(Ap, lac) cts.) en medio líquido Luria-Bertani (LB) suplementado con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y tetraciclina (34  $\mu$ g/mL) y se incubó a 37°C con agitación (170 rpm) durante toda la noche. Al otro día, se inoculó 2 mL del cultivo en 20 mL de medio LB fresco suplementado con los antibióticos y se dejó crecer durante 1 ½ horas aproximadamente bajo las condiciones experimentales descritas anteriormente hasta alcanzar un cultivo bacteriano en fase exponencial ( $DO_{600nm}$  de 0.4).

### 3.3 Ensayo de Genotoxicidad

En tubos Eppendorf se realizaron diluciones seriadas de los AE en agua destilada, estos se disolvieron mediante ultrasonido durante 1 minuto usando un baño ultrasónico del tipo E30H Elmasonic (Elma-Hans Schmidbauer GmbH & Co., Singen, Germany) y, finalmente, se

dispensaron en tubos Eppendorf a razón de 150 $\mu$ L por tubo. Las diluciones se mezclaron volumen/volumen (v/v) con el cultivo en fase exponencial; siendo un 3.33 % del AE la concentración más alta evaluada en cada experimento. Para cada experimento fueron siempre incluidos un control negativo (agua destilada) y un control positivo (2.34  $\mu$ M del m $\acute{u}$ gatenol 4-nitroquinolina 1- $\acute{o}$ xido, (4-NQO)). Las c $\acute{e}$ lulas fueron expuestas durante 30 minutos a 5 $^{\circ}$ C para facilitar la incorporaci $\acute{o}$ n del AE en la c $\acute{e}$ lula, luego se incubaron con agitaci $\acute{o}$ n (300 rpm) durante 2 horas a 37  $^{\circ}$ C para inducci $\acute{o}$ n del gen reportero,  $\beta$ -galactosidasa; y finalmente, se desarroll $\acute{o}$  el ensayo enzim $\acute{a}$ tico para la cuantificaci $\acute{o}$ n la actividad  $\beta$ -galactosidasa y la fosfatasa alcalina (ver ac $\acute{a}$ pite 3.5). Se desarrollaron al menos tres experimentos independientes con cuatro replicas cada uno.

### **3.4 Ensayo de Antigenotoxicidad**

Los aceites que resultaron no genot $\acute{o}$ xicos fueron evaluados para conocer su potencial antigenot $\acute{o}$ xico frente a la UVB. El procedimiento usado, fue similar al protocolo de genotoxicidad. Las diluciones de los AE mezcladas volumen/volumen (v/v) con el cultivo en fase exponencial, fueron irradiadas a una dosis de UVB (0.001 J/cm $^2$ ) seg $\acute{u}$ n lo indicado por Medina *et al.* (2016). Las c $\acute{e}$ lulas irradiadas se incubaron con agitaci $\acute{o}$ n (300 rpm) durante 2 horas a 37  $^{\circ}$ C para inducci $\acute{o}$ n del gen reportero,  $\beta$ -galactosidasa; y finalmente, se desarroll $\acute{o}$  el ensayo enzim $\acute{a}$ tico para la cuantificaci $\acute{o}$ n de la actividad  $\beta$ -galactosidasa y la fosfatasa alcalina (ver ac $\acute{a}$ pite 3.5). Se desarrollaron al menos tres experimentos independientes con cuatro replicas cada uno.

### 3.5 Ensayo Enzimático y Cálculos

El ensayo enzimático para la  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ G) y fosfatasa alcalina (FA) se efectuó en placas de . de manera simultánea, como se describe a continuación (**Tabla 2**).

**Tabla 2.**

*Descripción para el procedimiento del ensayo enzimático.*

<b><math>\beta</math>-galactosidasa</b>	<b>Fosfatasa alcalina</b>
<b>A. Lisis celular</b>	
135 $\mu$ L de Buffer Z y 15 $\mu$ L de células para cada tratamiento.	135 $\mu$ L de Bufer T y 15 $\mu$ L de células para cada tratamiento.
Inoculación durante 20min a temperatura ambiente.	
<b>B. Actividad enzimática</b>	
30 $\mu$ L de sustrato orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) 4mg/ml a los tratamientos. Blanco 30 $\mu$ L de agua estéril.	30 $\mu$ L de sustrato p-nitrofenilfosfato (PNPP) 4 mg/ml a los tratamientos. Blanco 30 $\mu$ L agua estéril.
Inoculación durante 40min a temperatura ambiente para desarrollo del color.	
<b>C. Finalización de la actividad enzimática</b>	
100 $\mu$ L de la solución de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1M.	50 $\mu$ L de HCl 2,5 M y posterior a 5 minutos 50 $\mu$ L de la solución TRIS 2 M.
<b>D. Lectura espectrofotométrica de los datos a D.O. 420nm</b>	

El criterio de genotoxicidad utilizado fue el factor de inducción SOS (I), el cual representa la inducción del gen *sfiA* en cada tratamiento y controles y se considera una medida indirecta del daño primario causado sobre el ADN celular. Se calculó según lo indicado por (Quintero et. al., 2012):

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

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

La antigenotoxicidad se midió como la reducción significativa del  $I$  en los tratamientos combinados (extracto + UVB) y fue expresado como un porcentaje de inhibición de la genotoxicidad (%IG) y si existe una clara relación dosis-efecto:

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

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

### 3.6 Análisis Estadístico

Se calcularon los valores promedios de  $\beta G$ , FA,  $I$  y %IG, y sus correspondientes errores estándar (EE). Se realizó el test de Kolmogorov-Smirnov para comprobar la normalidad de los datos y una prueba de Levene para comprobar la homogeneidad de varianza. Las diferencias entre los tratamientos fueron sustentadas mediante una prueba de Dunnet. Para todos los análisis estadísticos, se consideró una  $p < 0,05$ . Todos los análisis se llevaron a cabo con el programa R (R Core Team, 2013).

## 4. Resultados

### 4.1 Efecto Genotóxico de los AE

Los resultados correspondientes a los ensayos de genotoxicidad de los AE de especies vegetales de las familias Asteraceae y Verbenaceae usando SOS Chromotest, se presentan en las Tablas No 3A y 3B. Como puede observarse, dos aceites pertenecientes a la familia Asteraceae, uno del género *Coleostephus* (BIO-ATSaV62E) y el otro de la especie *Ageratina popayanensis* (BIO-ATSaV40E) resultaron genotóxicos. La muestra BIO-ATSaV62E exhibió un valor de  $I = 4.0$  a la concentración 3.33 %. Por su parte, la muestra BIO-ATSaW40E mostró valores de 3.5 y 6.4 a las concentraciones 0.42 % y 0.21 %, respectivamente; siendo notorio el efecto genotóxico de estos AE en el modelo biológico usado. La genotoxicidad podría estar asociada con un efecto tóxico de los compuestos que componen estos aceites; como se ha indicado previamente para otros AE obtenidos de plantas colombianas (Cristancho, 2014). Los AE restantes exhibieron valores promedio de  $I < 2$ , indicando que estos no presentan un efecto genotóxico en el modelo biológico usado. Por el contrario, el AE correspondiente a la muestra *Lippia origanoides* (BIO-VEarV01E) mostró una reducción significativa de la expresión basal BG respecto al control negativo, sugiriendo un potencial efecto inhibitor de la respuesta SOS en *E. coli* a las concentraciones evaluadas.

**Tabla 3.**

Análisis de genotoxicidad de los 15 aceites esenciales a través del ensayo SOS Chromotest.

A.		Aceites esenciales de la familia Asteraceae				
		<i>BIO-AT SaV66E</i>	<i>BIO-AT SaV50E</i>	<i>BIO-AT SaV60E</i>	<i>BIO-AT SaV62E</i>	<i>BIO-AT VcV31E</i>
C-	H <sub>2</sub> O	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2
C+	4-NQO	4.2 ± 0.7	3.0 ± 0.5	3.1 ± 1.1	4.9 ± 2.2	6.1 ± 2.7

3.33	% v/v	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.3	1.3 ± 0.4	4.0 ± 0.9 ***	1.0 ± 0.3
1.67	% v/v	1.2 ± 0.4 **	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.7 ± 0.7 ***	1.4 ± 0.7 **
0.83	% v/v	0.9 ± 0.3	1.2 ± 0.5	0.8 ± 0.3	1.8 ± 0.6 ***	0.9 ± 0.3
0.42	% v/v	0.8 ± 0.2 .	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.3	1.4 ± 0.3	0.8 ± 0.2
0.21	% v/v	0.9 ± 0.2	0.8 ± 0.3	0.9 ± 0.5	1.0 ± 0.4	0.8 ± 0.1
0.10	% v/v	0.7 ± 0.2 ***	1.1 ± 0.5	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.4	0.8 ± 0.1
0.052	% v/v	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.3	0.9 ± 0.3	0.6 ± 0.3	0.8 ± 0.1
0.026	% v/v	0.7 ± 0.1 ***	1.0 ± 0.5	0.9 ± 0.4	0.6 ± 0.2	0.8 ± 0.2
0.013	% v/v	0.8 ± 0.2 .	1.0 ± 0.4	0.9 ± 0.4	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.2
Tratamientos		<i>BIO-AT SaV40E</i>	<i>BIO-AT SaV56E</i>	<i>BIO-AT SaV58E</i>	<i>BIO-AT SaV52E</i>	<i>BIO-AT SaV19E</i>
C-	H2O	1.0 ± 1.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.8	1.0 ± 0.8	1.0 ± 0.1
C+	4-NQO	3.7 ± 4.5	5.8 ± 2.6	6.6 ± 3.4	5.2 ± 3.5	7.3 ± 0.4
3.33	% v/v	0.7 ± 1.9	1.6 ± 0.5 ***	1.3 ± 0.6	1.8 ± 0.8 **	1.6 ± 0.7 ***
1.67	% v/v	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.4	1.5 ± 1.2	1.5 ± 0.5 ***
0.83	% v/v	0.4 ± 1.5	1.0 ± 0.4	0.8 ± 0.3	1.1 ± 0.6	1.0 ± 0.1
0.42	% v/v	3.5 ± 5.2	1.1 ± 0.4	1.0 ± 0.4	0.8 ± 0.4	1.1 ± 0.1
0.21	% v/v	6.4 ± 6.9 ***	0.9 ± 0.3	1.0 ± 0.4	0.6 ± 0.3	1.0 ± 0.1
0.10	% v/v	1.6 ± 2.2	1.0 ± 0.5	1.1 ± 0.7	0.6 ± 0.3	1.0 ± 0.1
0.052	% v/v	0.6 ± 0.6	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.4	0.9 ± 0.3	1.0 ± 0.1
0.026	% v/v	0.6 ± 0.4	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.6	0.7 ± 0.4	1.0 ± 0.1
0.013	% v/v	0.6 ± 0.5	1.0 ± 0.3	0.8 ± 0.3	0.6 ± 0.3	1.0 ± 0.2

**Nota:** Se presentan los valores promedio del factor de inducción (I) y su correspondiente error estandar.\* Se encontró diferencia significativa (p<0.05) con respecto al C-.

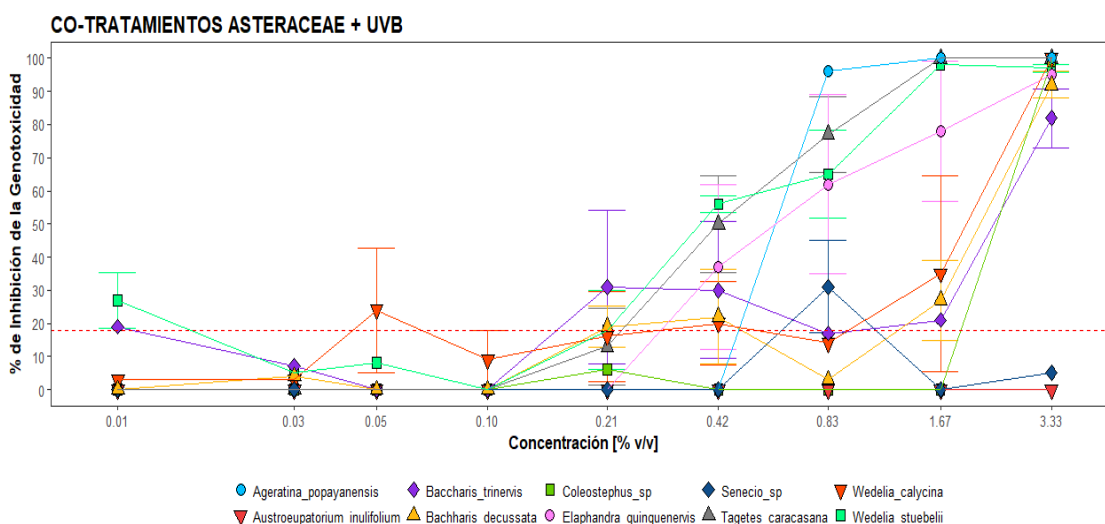
## B.

		Aceites esenciales de la familia Verbenaceae				
Tratamiento		<i>BIO-VE VcV07E</i>	<i>BIO-VE SV42E</i>	<i>BIO-VE VcV34E</i>	<i>BIO-VE arV01E</i>	<i>BIO-VE VcV11E</i>
C-	H2O	1 ± 0.1	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1
C+	4-NQO	7.1 ± 1.3	6.9 ± 0.7	6.1 ± 1.3	7.1 ± 1.2	7.2 ± 1.2
3.33	% v/v	1.5 ± 0.3 ***	1.7 ± 0.2 ***	0.8 ± 0.1	0.6 ± 0.1 ***	1.5 ± 0.3
1.67	% v/v	1.0 ± 0.3	0.9 ± 0.3	1.0 ± 0.3	0.6 ± 0.1 ***	1.2 ± 0.5
0.83	% v/v	1.1 ± 0.3	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.1	0.6 ± 0.1 ***	1.0 ± 0.1
0.42	% v/v	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.2	0.6 ± 0.1 ***	1.1 ± 0.1
0.21	% v/v	1.0 ± 0.1	1.0 ± .01	1.0 ± 0.1	0.7 ± 0.1 ***	1.0 ± 0.1
0.10	% v/v	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.7 ± 0.1 ***	1.1 ± 0.2
0.052	% v/v	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.2 ***	1.1 ± 0.1
0.026	% v/v	0.9 ± 0.3	0.8 ± 0.2 *	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1 *	1.1 ± 0.2
0.013	% v/v	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.2 *	1.1 ± 0.1

## 4.2 Efecto Antigenotóxico de los AE

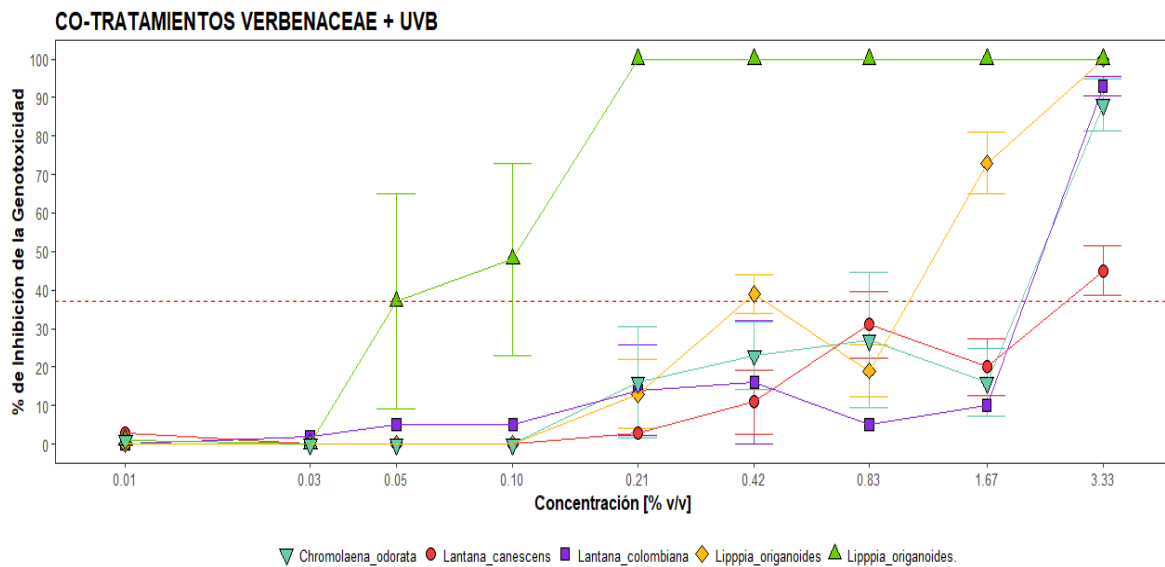
Posteriormente a los estudios de genotoxicidad, se procedió a evaluar el potencial antigenotóxico de los AE frente a la UVB. En la Ilustración 3 se presentan los resultados de antigenotoxicidad (%IG) de los AE pertenecientes a la familia Asteraceae. Para esta familia, dos aceites, *Wedelia stuebelii* (BIO-ATSaV66E) y *Tagetes caracasana* (BIO-ATSaV50E), mostraron los mejores resultados con valores de %IG significativos ( $p < 0.05$ , en el test de Dunnet) a partir de la concentración de 0.42 %.

En la Ilustración 4, se muestran los resultados de antigenotoxicidad frente a UVB de los AE de la familia Verbenaceae. Como puede observarse, para esta familia la *Lippia origanoides* (BIO-VEVcV34E) exhibe los resultados más relevantes con valores de %IG significativos a partir de la concentración 0.052 %; mientras que, la *Lippia origanoides* (BIO-VEarV01E) mostró valores significativos a partir de la concentración 1.67 %.



**Ilustración 3.** Porcentaje de inhibición de la genotoxicidad (%IG) frente a la UVB de los aceites esenciales de la familia Asteraceae en el rango de concentración evaluado.

**Nota:** Los valores de %IG sobre la línea punteada fueron significativamente diferentes ( $p < 0.05$  en el test de Dunnet) respecto al control positivo irradiado (%IG = 0)



**Ilustración 4.** Porcentaje de inhibición de la genotoxicidad (%IG) frente a la UVB de los aceites esenciales de la familia Asteraceae en el rango de concentración evaluado

**Nota:** Los valores de %IG sobre la línea punteada fueron significativamente diferente ( $p < 0.05$  en el test de Dunnet) respecto al control positivo irradiado (%IG = 0).

## 5. Discusión

La presente tesis estuvo enfocada en la identificación de plantas colombianas promisorias con propiedades antigenotóxicas frente al daño genético causado por la UVB de los aceites esenciales de las familias Asteraceae y Verbenaceae. Al menos dos especies de plantas (*Wedelia stuebelii* y *Tagetes caracasana*) de la familia Asteraceae y dos especímenes de la especie *Lippia organoides* perteneciente a la familia Verbenaceae, resultaron con propiedades antigenotóxica frente a la UVB. Adicionalmente, dos especies de la familia Asteraceae (*Ageratina popayanensis* y *Coleostephus* sp. mostraron un efecto genotóxico con el SOS Chromotest.

Los AE de las especies vegetales *Coleostephus* sp. y *Ageratina popayanensis* exhibieron un efecto genotóxico en el SOS Chromotest a partir de las concentraciones 3.33 % y 0.21 %, respectivamente.

respectivamente. Existe la creencia, de que los extractos vegetales por su origen son inocuos. Estos hallazgos, unidos a los previamente obtenidos en el marco del macroproyecto para especies de la familia Myrtaceae (Cristancho 2014), claramente evidencian la necesidad de la evaluación genotóxicas de extractos vegetales.

Los AE en la naturaleza juegan un papel importante en la protección de las plantas como antibacteriales, antivirales, antifúngicos, insecticidas y también como defensa contra herbívoros (Bakkali et al., 2008). La familia Asteraceae es una de las familias de plantas con flores que contiene alrededor de 1600 géneros con más de 23000 especies, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en Colombia, Venezuela, Ecuador, Guatemala, México, Panamá y Perú (Kenny et al., 2014; Torres-Barajas et al., 2013). Las especies de esta familia han sido usadas por años en la medicina tradicional para el tratamiento de micosis superficial, infecciones de la piel y heridas, así como por su actividad analgésica; además de previas investigaciones de diferentes especies que han revelado actividad antiviral, antibacterial y larvicida. (Torres-Barajas et al., 2013). Por ejemplo, para el género *Ageratina*, dos compuestos extraídos de las partes aéreas de *Ageratina adenophora* exhiben una evidente actividad inhibitoria contra la germinación de las esporas del hongo patogénico del arroz *M. grisea*; mientras que los extractos de etanol de *A. adenophora* mostraron una actividad antifúngica frente a *C. albicans*. (Fernando y Cruz, 2017; Xu et al., 2014). Otros estudios mostraron que el AE de *A. adenophora* tiene actividad antibacterial frente a *Arthrobacter protophormiae*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Rhodococcus rhodochrous* y *Staphylococcus aureus*; el mecanismo antibacteriano puede involucrar la afectación de la membrana celular, la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Qing-ping et al., 2015). El género *Colesotephus* también ha mostrado un efecto antimicrobiano frente a diferentes organismos como, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*,

*Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae* y *Serratia marcescens* entre otros, debido tal vez a que contienen taninos, flavonoides y alcaloides que se sabe que tienen una actividad antimicrobiana (Sassi et al., 2008). Así mismo, se demostró que el aceite esencial de *C. myconis* posee un efecto insecticida frente a *Tribolium confusum* (Haouas et al., 2014).

Los resultados observados en el presente estudio sobre la genotoxicidad de los AE de *Coleostephus sp.* y *Ageratina popayanensis*, deben ser confirmados en ensayos con células de mamíferos, como se ha indicado en estudios previos que evalúan la genotoxicidad de AE (Idaomar et al., 2002; Taylor et al., 2003). Como se mencionó anteriormente, los AE son una mezcla compleja de 20 a 60 diferentes componentes por lo que realizar la caracterización química de los mismos, conocer su composición y evaluar el efecto de estos componentes por separado es de vital importancia, para así determinar cuál o cuáles son los responsables de la actividad genotóxica encontrada en los aceites evaluados.

Los resultados obtenidos en los estudios de antigenotoxicidad de los AE de las especies *Wedelia stuebelii* y *Tagetes caracasana*, mostraron valores de %IG significativos a partir de la concentración 0.42% en ambos casos. Los AE mostraron curvas dependientes de la dosis en el rango de concentraciones de 0.10% a 3.33% sugiriendo que el efecto es consecuencia de uno de los componentes del AE. La familia Asteraceae como se citó anteriormente, posee un gran número de especies que se han usado a lo largo de los años en la medicina tradicional. Del género *Wedelia*, la especie *W. calendulaceae* mostró actividad anticancerígena en ratones con carcinoma de ascitis de Ehrlich-Lette y *W. chinensis* posee un componente activo conocido como apigenina el cual exhibe propiedades anticancerígenas, antioxidantes y antiinflamatorias (Papachristou et al., 2013; Gupta et al., 2010). Del género *Tagetes* se conoce que *T. erecta* contiene luteína, la cual mostró un efecto antimutagénico frente a 2-aminofluoreno y

ciclofosfamida usando el ensayo de Ames (Wang et al., 2006). De acuerdo con nuestro conocimiento, el presente estudio constituye el primer reporte de actividad antígenotóxica para las especies *Wedelia stuebelii* y *Tagetes caracasana*.

Por otra parte, aquí se evidenció que dos especímenes de la especie *L. origanoides* exhibieron los mejores valores de reducción del efecto genotóxico de la UVB en correspondencia con un estudio previo de nuestro grupo (Quintero et al., 2017). Una de las muestras (BIO-VEVcV34E), exhibió los resultados más relevantes con valores de %IG significativos a partir de la concentración 0.052 %; mientras que la otra muestra (BIO-VEarV01E), mostró valores significativos a partir de la concentración 1.67 %. *Lippia origanoides* es un arbusto aromático activo de América central y el norte de América del sur, el cual se usa como condimento y en medicina tradicional; en Colombia es comúnmente conocido como "Orégano de monte" y habita en zonas semiáridas de Guajira, Magdalena, Cauca, Cundinamarca, Santander y el norte de los estados de Santander (Vicuña et al., 2010; Oliveira et al., 2007).

Diversos estudios han demostrado las propiedades antígenotóxicas de *L. origanoides* frente a fármacos como la bleomicina y frente al daño causado por la UV en el SOS Chromotest (Vicuña et al., 2010; Quintero et al., 2017). La diferencia en los porcentajes de IG encontrados en las dos muestras de *L. origanoides* pueden ser debido a diferencias en la composición química de ambas muestras. Los AE pueden variar en calidad, cantidad y composición según el clima, la composición del suelo, el órgano de la planta, la edad y la etapa del ciclo vegetativo, pero también se presentan diferentes quimiotipos (Bakkali et al., 2008; Vicuña et al., 2010). En base a los constituyentes principales encontrados en AE de *L. origanoides*, se han notificado diferentes quimiotipos en Brasil, Venezuela y Colombia (Oliveira et al., 2007). En Colombia, se han identificado al menos tres quimiotipos para esta especie; quimiotipo A rico en  $\alpha$  y felandreno, p-

cimeno, y limoneno y quimiotipos B y C ricos en carvacrol y timol respectivamente (Stashenko et al., 2010).

Los resultados correspondientes a los AE de la especie *L. origanoides* no son los primeros reportados para este tipo de estudio. Por ejemplo, Quintero et al. (2017) y Fuentes et al. (2017), reportaron efectos antigenotóxicos frente a la UV para extractos y AE de esta especie usando el SOS Chromotest. Estos estudios, relacionaron de forma directa el efecto encontrado con los compuestos mayoritarios de cada muestra, siendo así, carvacrol, pinocembrina, citral, p-cimeno, geraniol y timol compuestos antigenotóxicos potenciales contra UV. Por esta razón, se reitera la importancia de realizar la caracterización química de las dos muestras de *L. origanoides* evaluadas para de esta forma conocer sus componentes principales y de esta forma poder relacionar la actividad antigenotóxica observada según su quimiotipo.

Las principales innovaciones para protectores solares en los últimos años se han enfocado en prevenir o contraatacar los efectos de la radiación solar en las células de la piel mediante agentes los cuales favorezcan la reparación del ADN dañado (Gilaberte & González, 2010). Los extractos botánicos son considerados de naturaleza multifuncional, debido a que poseen diversas propiedades como fotoprotección, anti envejecimiento, hidratante, antioxidante, astringente, antiirritante y antimicrobiana, que se correlacionan entre sí (Chanchal & Swarnlata, 2008). La UVB causa reacciones fotoquímicas dentro del ADN que implican principalmente la absorción directa de los fotones por las bases, generando la formación de fotoproductos como: dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD), 6-4 pirimidina pirimidona (6-4 PPS), entre otros (Ravanat et al., 2001). En *E. coli* la formación de estos fotoproductos provocan alteraciones en el ADN que son un obstáculo para la replicación cromosómica (Brash, 1988). La detección de efectos antigenotóxicos con este ensayo podría vincularse a la inhibición de la formación de CDP o 6-

4PP, la reparación de fotoproductos de ADN y restauración de los eventos de división celular; sin embargo, como la cepa PQ37 (*uvrA*) es defectuosa para la reparación por escisión de nucleótidos y el gen *sulA* en esta cepa se mantiene hasta 240 minutos después del tratamiento con UV, los efectos antígenotóxicos observados en las muestras evaluadas pueden estar relacionados con la inhibición de la formación de CPD o 6-4PP debido a su capacidad de absorción de fotones provenientes de la UV (Fuentes et al., 2017; Medina et al., 2016). Los aceites con estas propiedades podrían ser un complemento útil en la formulación de protectores solares, ya que pueden prevenir mutaciones que conducen al cáncer de piel. Por tanto, estos pueden ser útiles en el área de quimioprevención dependiendo del mecanismo de acción de cada aceite.

## 6. Conclusiones

1. De los 15 AE evaluados, dos provenientes de las especies *Ageratina popayanensis* y *Coleostephus* sp. mostraron un efecto genotóxico con el SOS Chromotest. Se requerirá estudios adicionales para confirmar este efecto en modelos de mamíferos e identificar cuál es el componente activo responsable de esta actividad.
2. Los resultados del presente trabajo ratifican el potencial quimiopreventivo/fotoprotector de los AE de la especie *Lippia origanoides* (Verbenaceae). Adicionalmente, se hace el primer reporte sobre el efecto antígenotóxico frente a la UVB de las especies *Wedelia stuebelii* y *Tagetes caracasana*; ambas de la familia Asteraceae.

3. Este presente trabajo reafirma la utilidad del ensayo SOS Chromotest en la evaluación del potencial fotoprotector de aceites esenciales de plantas; e impulsa la bioprospección de la flora colombiana con fines farmacéuticos y cosméticos.

## **7. Recomendaciones**

Se recomienda realizar estudios de los AE que resultaron genotóxicos y antígenotóxicos en otros modelos biológicos, donde se usen células de mamífero, para confirmar su toxicidad y antígenotoxicidad. De igual forma, se recomienda realizar una caracterización química de los aceites esenciales para posteriormente analizar de manera independiente los componentes aislados y de esta forma poder determinar cuál o cuáles son los responsables de las actividades observadas.

### Referencias Bibliográficas

- Afaq, F. (2011). Natural agents: Cellular and molecular mechanisms of photoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 508(2), 144-151. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.007>
- Afaq, F., & Katiyar, S. K. (2011). Polyphenols: skin photoprotection and inhibition of photocarcinogenesis. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 11(14), 1200-1215.
- Andersson, D. I., & Hughes, D. (2014). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews. Microbiology*, 12(7), 465-478. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3270>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils--a review. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 46(2), 446-475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Zhiri, A., Baudoux, D., & Idaomar, M. (2006). Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) after treatments with UVC radiation, 8-MOP plus UVA and MMS. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 606(1-2), 27-38. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.02.005>
- Berić, T., Nikolić, B., Stanojević, J., Vuković-Gačić, B., & Knežević-Vukčević, J. (2008). Protective effect of basil (*Ocimum basilicum* L.) against oxidative DNA damage and mutagenesis. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 724-732.
- Besaratinia, A., Yoon, J.-I., Schroeder, C., Bradforth, S. E., Cockburn, M., & Pfeifer, G. P. (2011). Wavelength dependence of ultraviolet radiation-induced DNA damage as determined by laser irradiation suggests that cyclobutane pyrimidine dimers are the principal DNA lesions produced by terrestrial sunlight. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(9), 3079-3091. <https://doi.org/10.1096/fj.11-187336>
- Biniek, K., Levi, K., & Dauskardt, R. H. (2012). Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(42), 17111-17116. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206851109>

- Brash, D. E. (1988). UV mutagenic photoproducts in *Escherichia coli* and human cells: a molecular genetics perspective on human skin cancer\*. *Photochemistry and Photobiology*, 48(1), 59-66. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1988.tb02786.x>
- Chanchal, D., & Swarnlata, S. (2008). Novel approaches in herbal cosmetics. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 7(2), 89-95. <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2008.00369.x>
- Cristancho, R. (2014). *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* (tesis de pregrado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
- Fernando, S. I. D., & Cruz, K. G. J. (2017). Philippine Ethnobotanicals Show Antifungal Activity against *Candida albicans*, the Causative Agent of Candidiasis. *International Journal of Agricultural Technology*, 13(7.3), 2523-2528
- Fuentes, J. L., Alonso, A., Cuetara, E., Vernhe, M., Alvarez, N., Sanchez-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. <https://doi.org/10.1080/09553000600733168>
- Fuentes, J. L., García Forero, A., Quintero Ruiz, N., Prada Medina, C. A., Rey Castellanos, N., Franco Niño, D. A., ... Stashenko, E. E. (2017). The SOS Chromotest applied for screening plant antigenotoxic agents against ultraviolet radiation. *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 16(9), 1424-1434. <https://doi.org/10.1039/c7pp00024c>
- Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M. S., Pasquini, P., Picconi, O., Boyle, P., & Melchi, C. F. (2005). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *European Journal of Cancer* (Oxford, England: 1990), 41(1), 45-60. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2004.10.016>
- Gilaberte, Y., & González, S. (2010). Update on Photoprotection. *Actas Dermo-Sifiliográficas* (English Edition), 101(8), 659-672. [https://doi.org/10.1016/S1578-2190\(10\)70696-X](https://doi.org/10.1016/S1578-2190(10)70696-X)
- González-Púmariega, M., Tamayo, M. V., & Sánchez-Lamar, Á. (2009). La radiación ultravioleta. Su efecto dañino y consecuencias para la salud humana. *Theoria*, 18(2), 69-80.

- Griffiths, H. R., Mistry, P., Herbert, K. E., & Lunec, J. (1998). Molecular and cellular effects of ultraviolet light-induced genotoxicity. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 35(3), 189-237. <https://doi.org/10.1080/10408369891234192>
- Gupta, M., Kanti Mazumder, U., Haldar, P., Kandar, C. H., Manikandan, L., & Senthil, G. (2010). Anticancer activity of *Indigofera aspalathoides* and *Wedelia calendulaceae* in Swiss albino mice. *Iranian journal of pharmaceutical research*, 141-145.
- Haouas, D., Luigi, C. P., Halima-Kamel, M. B., Guido, F., & Habib, B. H. M. (2014). Chemical Constituents and Toxicity of Essential Oils from Three Asteraceae Plants against *Tribolium confusum* [Text]. Recuperado 17 de septiembre de 2018, de <https://www.ingentaconnect.com/content/doi/17375436/2014/00000009/00000001/art00007#Refs>
- Hayder, N., Abdelwahed, A., Kilani, S., Ammar, R. B., Mahmoud, A., Ghedira, K., & Chekir-Ghedira, L. (2004). Anti-genotoxic and free-radical scavenging activities of extracts from (Tunisian) *Myrtus communis*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 564(1), 89-95.
- Idaomar, M., El Hamss, R., Bakkali, F., Mezzoug, N., Zhiri, A., Baudoux, D., ... Alonso-Moraga, A. (2002). Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 513(1-2), 61-68. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(01\)00287-X](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00287-X)
- Janion, C. (2008). Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. *International Journal of Biological Sciences*, 4(6), 338-344.
- Justice, S. S., Hunstad, D. A., Cegelski, L., & Hultgren, S. J. (2008). Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. *Nature Reviews Microbiology*, 6(2), 162. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1820>
- Kada, T., & Shimoi, K. (1987). Desmutagens and bio-antimutagens--their modes of action. *BioEssays. News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 7(3), 113-116. <https://doi.org/10.1002/bies.950070305>
- Kaur, C. D., & Saraf, S. (2010). In vitro sun protection factor determination of herbal oils used in cosmetics. *Pharmacognosy Research*, 2(1), 22. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.60586>
- Kenny, O., Smyth, T. J., Walsh, D., Kelleher, C. T., Hewage, C. M., & Brunton, N. P. (2014). Investigating the potential of under-utilised plants from the Asteraceae family as a source

- of natural antimicrobial and antioxidant extracts. *Food Chemistry*, 161, 79-86. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.126>
- Kilani, S., Abdelwahed, A., Ammar, R. B., Hayder, N., Ghedira, K., Chraief, I., ... & Chekir-Ghedira, L. (2005). Chemical composition, antibacterial and antimutagenic activities of essential oil from (Tunisian) *Cyperus rotundus*. *Journal of Essential Oil Research*, 17(6), 695-700.
- Knežević-Vukčević, J. B., Vuković-Gačić, B. S., Stević, T., Stanojević, J., Nikolić, B., & Simić, D. (2005). 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*, 57(3), 163-172.
- Koplow, J., & Goldfine, H. (1974). Alterations in the outer membrane of the cell envelope of heptose-deficient mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 117(2), 527-543.
- Korać, R. R., & Khambholja, K. M. (2011). Potential of herbs in skin protection from ultraviolet radiation. *Pharmacognosy Reviews*, 5(10), 164. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.91114>
- Kuroda, Y., & Inoue, T. (1988). Antimutagenesis by factors affecting DNA repair in bacteria. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 202(2), 387-391. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(88\)90200-X](https://doi.org/10.1016/0027-5107(88)90200-X)
- Libkind, D., Moliné, M., & VANBROOCK, M. (2004). Posibles mecanismos de fotoprotección en levaduras. *Revista electrónica de Radiobiología*, 4, 84-88.
- Linos, E., Swetter, S. M., Cockburn, M. G., Colditz, G. A., & Clarke, C. A. (2009). Increasing burden of melanoma in the United States. *The Journal of Investigative Dermatology*, 129(7), 1666-1674. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.423>
- López, M. A., Stashenko, E. E., & Fuentes, J. L. (2011). Chemical composition and antigenotoxic properties of *Lippia alba* essential oils. *Genetics and Molecular Biology*, 34(3), 479-488. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572011005000030>
- Matsumura, Y., & Ananthaswamy, H. N. (2004). Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 195(3), 298-308. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.08.019>
- McKenzie, G. J., Harris, R. S., Lee, P. L., & Rosenberg, S. M. (2000). The SOS response regulates adaptive mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6646-6651. <https://doi.org/10.1073/pnas.120161797>

- Medina, C. A. P., Tessmer, E. T. A., Ruiz, N. Q., Serment-Guerrero, J., & Fuentes, J. L. (2016). Survival and SOS response induction in ultraviolet B irradiated *Escherichia coli* cells with defective repair mechanisms. *International Journal of Radiation Biology*, 92(6), 321-328. <https://doi.org/10.3109/09553002.2016.1152412>
- Mouret, S., Baudouin, C., Charveron, M., Favier, A., Cadet, J., & Douki, T. (2006). Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(37), 13765-13770. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604213103>
- Narayanan, D. L., Saladi, R. N., & Fox, J. L. (2010). Review: Ultraviolet radiation and skin cancer. *International Journal of Dermatology*, 49(9), 978-986. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2010.04474.x>
- Neffati, A., Bouhlel, I., Ben Sghaier, M., Boubaker, J., Limem, I., Kilani, S., Ghedira, K. (2009). Antigenotoxic and antioxidant activities of *Pituranthos chloranthus* essential oils. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 27(2), 187-194. <http://doi.org/10.1016/j.etap.2008.10.010>
- Nichols, J. A., & Katiyar, S. K. (2009). Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of Dermatological Research*, 302(2), 71-83. <https://doi.org/10.1007/s00403-009-1001-3>
- Oliveira, D. R., Leitão, G. G., Bizzo, H. R., Lopes, D., Alviano, D. S., Alviano, C. S., & Leitão, S. G. (2007). Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. *Food Chemistry*, 101(1), 236-240. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.022>
- Papachristou, F., Chatzaki, E., Petrou, A., Kougioumtzi, I., Katsikogiannis, N., Papalambros, A., ... & Tsaroucha, A. K. (2013). Time course changes of anti-and pro-apoptotic proteins in apigenin-induced genotoxicity. *Chinese medicine*, 8(1), 9.
- Purdue, M. P., Freeman, L. E. B., Anderson, W. F., & Tucker, M. A. (2008). Recent trends in incidence of cutaneous melanoma among US Caucasian young adults. *The Journal of Investigative Dermatology*, 128(12), 2905-2908. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.159>
- Qing-Ping, M., Chun-Ru . C., Xue-Feng, L., Xin-Yong, L., & Jie, D. (2015). Chemistry, Pharmacological Activities and Analysis of *Ageratina adenophora*: A Review. *Asian Journal of Chemistry*, 27(12), 4311-4316.
- Quillardet, P., & Hofnung, M. (1985). The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutation Research*, 147(3), 65-78.

- 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 of the United States of America*, 79(19), 5971-5975.
- Quintero Ruiz, N., Córdoba Campo, Y., Stashenko, E. E., & Fuentes, J. L. (2017). Antigenotoxic Effect Against Ultraviolet Radiation-induced DNA Damage of the Essential Oils from *Lippia* Species. *Photochemistry and Photobiology*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/php.12735>
- Quintero, N., Stashenko, E. E., & Luis Fuentes, J. (2012). The influence of organic solvents on estimates of genotoxicity and antigenotoxicity in the SOS chromotest. *Genetics and Molecular Biology*, 35(2), 503-514.
- R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Ravanat, J.-L., Douki, T., & Cadet, J. (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63(1-3), 88-102. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(01\)00206-8](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00206-8)
- Sancar, A., & Rupp, W. 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. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90354-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90354-9)
- Sancar, A., Wharton, R. P., Seltzer, S., Kacinski, B. M., Clarke, N. D., & Rupp, W. D. (1981). Identification of the *uvrA* gene product. *Journal of Molecular Biology*, 148(1), 45-62. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90234-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90234-5)
- Sánchez, G., Nova, J., de la Hoz, F., & Castañeda, C. (2011). Incidencia de cáncer de piel en Colombia, años 2003-2007. *Piel*, 26(4), 171-177. <https://doi.org/10.1016/j.piel.2010.10.028>
- Sassi, A. B., Harzallah-Skhiri, F., Bourgougnon, N., & Aouni, M. (2008). Antimicrobial activities of four *Tunisian Chrysanthemum* species. *Indian Journal of Medical Research*, 127(2).
- Schuch, A. P., & Menck, C. F. M. (2010). The genotoxic effects of DNA lesions induced by artificial UV-radiation and sunlight. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 99(3), 111-116. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.03.004>

- Schuch, A. P., Lago, J. C., Yagura, T., & Menck, C. F. M. (2012b). DNA Dosimetry Assessment for Sunscreen Genotoxic Photoprotection. *Plos One*, 7(6), e40344. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040344>
- Schuch, A. P., Yagura, T., Makita, K., Yamamoto, H., Schuch, N. J., Agnez-Lima, L. F., ... Menck, C. F. M. (2012a). DNA damage profiles induced by sunlight at different latitudes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 53(3), 198-206. <https://doi.org/10.1002/em.21678>
- Simić, D., Vuković-Gačić, B., & Knežević-Vukčević, J. (1998). Detection of natural bioantimutagens and their mechanisms of action with bacterial assay-system. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 402(1-2), 51-57. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00281-9](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00281-9)
- Sinha, R. P., & Häder, D.-P. (2002). UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1(4), 225-236. <https://doi.org/10.1039/B201230H>
- Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Cala, M. P., Durán, D. C., & Caballero, D. (2013). Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. *Journal of Separation Science*, 36(1), 192-202. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200877>
- Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Ruíz, C. A., Arias, G., Durán, C., Salgar, W., & Cala, M. (2010). *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *Journal of Separation Science*, 33(1), 93-103. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900452>
- Taylor, J. L. S., Elgorashi, E. E., Maes, A., Gorp, U. V., Kimpe, N. D., Staden, J. van, & 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(3), 144-154. <https://doi.org/10.1002/em.10184>
- Tewari, A., Sarkany, R. P., & Young, A. R. (2012). UVA1 induces cyclobutane pyrimidine dimers but not 6-4 photoproducts in human skin in vivo. *The Journal of Investigative Dermatology*, 132(2), 394-400. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.283>
- Torres-Barajas, L., Rojas-Vera, J., Morales-Méndez, A., Rojas-Fermín, L., Lucena, M., & Buitrago, A. (2013). Chemical composition and evaluation of antibacterial activity of essential oils of *Ageratina jahnii* and *Ageratina pichinchensis* collected in Mérida, Venezuela. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 12(1). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=85625709010>

- Torriani, A., & Rothman, F. (1961). Mutants of *Escherichia coli* constitutive for alkaline phosphatase1. *Journal of Bacteriology*, 81(5), 835-836.
- Vicuña, G. C., Stashenko, E. E., & Luis Fuentes, J. (2010). Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. *Fitoterapia*, 81(5), 343-349. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.10.008>
- Vink, A. A., & Roza, L. (2001). Biological consequences of cyclobutane pyrimidine dimers. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 65(2-3), 101-104.
- Vuković-Gaćić, B., Nikčević, S., Berić-Bjedov, T., Knežević-Vukčević, J., & Simić, D. (2006). 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*, 44(10), 1730- 1738.
- Wang, M., Tsao, R., Zhang, S., Dong, Z., Yang, R., Gong, J., & Pei, Y. (2006). Antioxidant activity, mutagenicity/anti-mutagenicity, and clastogenicity/anti-clastogenicity of lutein from marigold flowers. *Food and Chemical Toxicology*, 44(9), 1522-1529.
- Xu, Q.-L., Zhang, M., Zhou, Z.-Y., Liu, W.-X., Wan, F.-H., Wang, H.-F., & Tan, J.-W. (2014). Two new carene-type monoterpenes from aerial parts of *Ageratina adenophora*. *Phytochemistry Letters*, 9, 123-126. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.05.004>
- Zhang, W. J., & Björn, L. O. (2009). The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. *Fitoterapia*, 80(4), 207-218. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.02.006>

## Apéndices

Apéndice A. Actividad antigenotóxica de AE obtenidos de diferentes especies de plantas.

Especie	Ensayo usado	Mutágeno	Referencia
<i>Salvia officinalis</i>	Ensayo de reversión génica en <i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> y <i>S. cerevisiae</i>	UVC	Simić <i>et al.</i> 1998 Knežević-Vukčević <i>et al.</i> 2005 Vuković-Gačić <i>et al.</i> 2006
<i>Helichrysum italicum</i> <i>Ledum groenlandicum</i> <i>Ravensara aromatica</i>	Ensayo de mutación y recombinación somática en <i>D. melanogaster</i>	U	Idaomar <i>et al.</i> 2002
<i>Myrthus communis</i>	SOS Chromotest	AFB1, NFA	Hayder <i>et al.</i> 2004
<i>Cyperus rotundus</i>	SOS Chromotest	AFB1, NFA	Kilani <i>et al.</i> 2005
<i>Artemisia herba alba</i> <i>Cinnamomum camphora</i> <i>Origanum compactum</i>	Ensayo de conversión y reversión génica en <i>S. cerevisiae</i> D7	UVC	Bakkali <i>et al.</i> 2006
<i>Ocimum basilicum</i>	Ensayo de reversión génica en <i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> y <i>S. cerevisiae</i>	<i>t</i> -BOOH UVC	Berić <i>et al.</i> 2008 Stanogević <i>et al.</i> 2008
<i>Pituranthus chloranthus</i>	SOS Chromotest	NFA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Neffati <i>et al.</i> 2009

<b>Especie</b>	<b>Ensayo usado</b>	<b>Mutágeno</b>	<b>Referencia</b>
<i>Lippia origanoides</i>	SOS Chromotest	BLM	Vicuña <i>et al.</i> 2010
			Korać & Khambholja, 2011
<i>Lippia alba</i>	SOS Chromotest	BLM	López <i>et al.</i> , 2011
<i>Lippia spp.</i>	SOS Chromotest	UVC	Quintero <i>et al.</i> 2017

Abreviación de los mutágenos: AFB1 - aflatoxina B1, BLM - bleomicina, *t*-BOOH - *t*-butilhidroperóxido, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrógeno, NFA - nifuroxazida, U – uretano, UVC – radiación ultravioleta tipo C.