

**POTENCIAL FOTOPROTECTOR DE LOS ACEITES ESENCIALES DE
ESPECIES DEL GÉNERO *LIPPIA* Y SUS PRINCIPALES CONSTITUYENTES
FRENTE AL DAÑO INDUCIDO EN EL ADN POR LA RADIACIÓN
ULTRAVIOLETA**

NATHALIA QUINTERO RUIZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2015**

**POTENCIAL FOTOPROTECTOR DE LOS ACEITES ESENCIALES DE
ESPECIES DEL GÉNERO *LIPPIA* Y SUS PRINCIPALES CONSTITUYENTES
FRENTE AL DAÑO INDUCIDO EN EL ADN POR LA RADIACIÓN
ULTRAVIOLETA**

NATHALIA QUINTERO RUIZ

**Trabajo de Investigación para optar al título de
Magíster en Biología**

Director

Dr. JORGE LUIS FUENTES LORENZO

Co-Directora

Dra. ELENA E. STASHENKO.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2015

AGRADECIMIENTOS

A mi familia porque siempre han apoyado mis decisiones y me han acompañado en todos los proyectos que inicio sin importar lo difícil que sea sacarlos adelante.

Al profesor Jorge Luis Fuentes, *PhD*, director de este proyecto, por todo su apoyo y paciencia, así como por la confianza depositada en mí. Agradezco de manera muy especial la formación que recibí en estos años tanto en el ámbito científico como personal.

A la profesora Elena Stashenko por sus aportes y colaboración durante el desarrollo de este proyecto.

A los integrantes del laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental.

A los integrantes de los laboratorios CENIVAM y CROM-MAS, especialmente a Yuri Córdoba por su colaboración incondicional.

A mis amigos por el apoyo, especialmente a Mauricio Torres y Cesar Prada por los aportes realizados a este trabajo.

A los docentes y administrativos de la Escuela de Biología.

A la Universidad Industrial de Santander

A Colciencias por financiación del proyecto.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	14
1. MATERIALES Y METODOS.....	17
1.1. Medios y compuestos químicos.....	17
1.2. Material biológico.....	17
1.3. Estirpe celular y condiciones de cultivo.	18
1.4. Ensayo de genotoxicidad.....	19
1.5. Condiciones de irradiación.....	21
1.6. Ensayo de antigenotoxicidad.....	21
1.7. Cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización en llama.	23
1.8. Análisis estadístico de los datos.	24
2. RESULTADOS.....	25
2.1. Evaluación de la genotoxicidad y antigenotoxicidad de los aceites esenciales.....	25
2.2. Determinación por GC-FID de los constituyentes de los AE solubles en agua.	29
2.3. Evaluación de la genotoxicidad y antigenotoxicidad de los constituyentes mayoritarios de los AE.	31
2.4. Antigenotoxicidad de las mezclas de los constituyentes mayoritarios de los AE.	35
3. DISCUSIÓN.	39
4. CONCLUSIONES.	43
5. RECOMENDACIONES.	44
BIBLIOGRAFÍA.	45
ANEXOS.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Antigenotoxicidad de aceites esenciales frente a radiación ultravioleta.	26
Figura 2. Antigenotoxicidad de compuestos mayoritarios de los aceites esenciales estudiados.	34
Figura 3. Antigenotoxicidad de mezclas de compuestos mayoritarios de los aceites esenciales.....	36
Figura 4. Efecto sinérgico en mezclas de compuestos mayoritarios presentes en los aceites esenciales.	38

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Genotoxicidad aceites esenciales en presencia y ausencia de activación metabólica.....	27
Tabla 2. Composición química de los aceites esenciales obtenidos por MWHD de especies del genero <i>Lippia</i>	29
Tabla 3. Cuantificación de los constituyentes principales de los aceites esenciales solubles en agua.....	30
Tabla 4. Genotoxicidad compuestos mayoritarios de los AE promisorios estudiados como fotoprotectores.	33

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A: Composición química de los AE de especies del género <i>Lippia</i> , obtenidos por hidrodestilación asistida por MWHD.....	54
ANEXO B: Cálculo de la dosis de radiación UV-C usada en los ensayos.....	56
ANEXO C: Curvas de calibración de los compuestos de referencia.	58
ANEXO D: Perfiles cromatográficos de los compuestos solubles en agua de los AE de especies del género <i>Lippia</i> obtenidos por MWHD. Se incluyen los compuestos de referencia usados para su identificación.....	62
ANEXO E: Detalle de la concentración de compuesto usada para cada mezcla evaluada.	67

RESUMEN

TÍTULO: POTENCIAL FOTOPROTECTOR DE LOS ACEITES ESENCIALES DE ESPECIES DEL GÉNERO *LIPPIA* Y SUS PRINCIPALES CONSTITUYENTES FRENTE AL DAÑO INDUCIDO EN EL ADN POR LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA.

AUTOR: NATHALIA QUINTERO RUIZ**

PALABRAS CLAVE: Antigenotoxicidad, SOS Chromotest, Radiación Ultravioleta, género *Lippia*, aceite esencial, terpenos.

DESCRIPCIÓN

La actividad antigenotóxica de los aceites esenciales de especies del género *Lippia* frente a la genotoxicidad inducida por la radiación ultravioleta fue evaluada usando el ensayo SOS Chromotest. La composición química de los aceites esenciales se estableció por cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas y su actividad antigenotóxica frente a la radiación ultravioleta fue evaluada y comparada con la de compuestos fotoprotectores estándar. Basados en el porcentaje de inhibición de la genotoxicidad, el potencial antigenotóxico de los aceites esenciales fue: *L. alba* – citral > *L. graveolens* ≈ *L. origanoides* - timol ≈ *L. origanoides* – carvacrol > *L. micromera* ≈ *L. citriodora* > *L. alba* - mircenona > *L. alba* – carvona = *L. dulcis* = *L. origanoides* – felandreno. Los principales constituyentes de los AE fueron compuestos terpénicos como: carvacrol, *p*-cimeno, neral, genaral, limoneno, α -terpineno, timol y timol-metil-éter. Dentro de estos, *p*-cimeno, geraniol, carvacrol y timol mostraron el potencial antigenotóxico más elevado. Ensayos de antigenotoxicidad en los que se evaluaron diferentes mezclas de compuestos, sugieren que la antigenotoxicidad frente a radiación ultravioleta detectada en los aceites esenciales es producto de actividad sinérgica entre sus constituyentes. Los resultados se discuten en relación con el potencial quimiopreventivo de los aceites esenciales del género *Lippia* y de sus constituyentes mayoritarios.

* Trabajo de Investigación

*-Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Maestría en Biología. Director: Dr. Jorge Luis Fuentes Lorenzo. Codirector: Dra. Elena E. Stashenko.

ABSTRACT

TÍTULO: PHOTOPROTECTIVE POTENTIAL OF THE ESSENTIAL OILS FROM *LIPPIA* SPECIES AND ITS MAJOR CONSTITUENTS AGAINST DNA DAMAGE INDUCED BY ULTRAVIOLET RADIATION.

AUTHOR: NATHALIA QUINTERO RUIZ**

KEYWORDS: Antigenotoxicity, SOS chromotest, ultraviolet radiation, *Lippia* genus, essential oils, terpenes.

DESCRIPTION

The antigenotoxic activity of essential oils obtained from *Lippia* spp, against genotoxicity induced by ultraviolet radiation using the SOS chromotest was evaluated. The essential oils major compounds were characterized by gas chromatography–mass spectrometry and their antigenotoxicity against ultraviolet radiation was evaluated and compared with standard photoprotector compounds. Based on the percentages of genotoxicity inhibition (%GI), the essential oils antigenotoxic potential in *Lippia* spp was as follows: *L. alba* - citral > *L. graveolens* ≈ *L. origanoides* - thymol ≈ *L. origanoides* - carvacrol > *L. micromera* ≈ *L. citriodora* > *L. alba* – mircenona > *L. alba* – carvona = *L. dulcis* = *L. origanoides* – phellandrene. The essential oils major compounds were mostly terpenes as: carvacrol, *p*-cymene, neral, geraniol, limonene, α -terpinene, thymol, and thymol methyl ether, which are likely the responsible for the essential oils antigenotoxicity. Among the terpenes, *p*-cymene, geraniol, carvacrol and thymol showed the highest antigenotoxic potency. Antigenotoxicity assays using different compounds mixtures suggest that synergistic effect can occur in some essential oils. The results are discussed in relation to the chemopreventive potential of *Lippia* essential oils and their major constituents.

* Research work

—Science Faculty. Biology School. Master in Biology. Director: Dr. Jorge Luis Fuentes Lorenzo. Codirector: Dra. Elena E. Stashenko.

INTRODUCCIÓN

La sobre-exposición a radiación solar produce una variedad de efectos deletéreos en la piel que van desde patologías como el enrojecimiento y eritemas, la inmunosupresión sistémica, hasta procesos que ocurren a más largo plazo como el fotoenvejecimiento y diferentes tipos de cáncer (Matsumura y Ananthaswamy 2004; Tsatsou *et al.* 2012; Zaidi *et al.* 2008). El cáncer de piel, especialmente el melanoma cutáneo maligno, ha incrementado su morbilidad y tasa de incidencia a nivel mundial, convirtiéndose en un problema de salud pública (Purdue *et al.* 2008; Zaidi *et al.* 2008; Kohler *et al.* 2015). La radiación solar ha sido reconocida como el principal factor de riesgo para el desarrollo de este tipo de cáncer. La radiación ultravioleta (RUV), el componente más perjudicial y mutagénico del espectro solar, puede causar cambios estructurales en el ADN actuando como un iniciador y promotor del proceso carcinogénico (Ravanat *et al.* 2001; Matsumura y Ananthaswamy 2002; Gandini *et al.* 2005; Zaidi *et al.* 2008; Gallagher y Lee 2006). Por ello, se considera que el aumento en las mencionadas patologías se debe a la excesiva exposición al sol sin una protección adecuada (Gandini *et al.* 2005; Purdue *et al.* 2008; Linos *et al.* 2009). En este sentido, las estrategias de fotoprotección están encaminadas a mitigar los efectos nocivos de la radiación solar en poblaciones humanas saludables (Gilaberte y González 2010; Nichols y Katiyar 2010).

La RUV típicamente se divide en tres rangos espectrales de acuerdo con la energía que contienen: UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) y UVC (200-280 nm). Cada tipo de RUV puede causar diferentes tipos de daño en el ADN, entre los que se destacan: dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD), aductos pirimidina (6-4) pirimidona, fotoproductos de citosina (CC → TT), 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG) y bases pirimidínicas oxidadas; por ello, la RUV se considera el carcinógeno ambiental más ubicuo (Mitchell *et al.* 1999; Ravanat *et al.* 2001; Matsumura y Ananthaswamy 2002; Rastogi *et al.* 2010). Un equilibrio entre la frecuencia con la que se producen estas lesiones en el ADN y la capacidad que

tengan las células de repararlas, garantiza una adecuada estabilidad genómica (Laval *et al.* 1998; Kawanishi *et al.* 2001; Peltomaki 2001). En este contexto, la fotoprotección como una estrategia preventiva permite hacer frente a los efectos deletéreos causados por la radiación solar (Gilaberte y González 2010; Afaq 2011).

Los compuestos fotoprotectores pueden actuar por diferentes mecanismos tales como la absorción directa de fotones, el fortalecimiento del sistema antioxidante endógeno, la estimulación de los mecanismos de reparación del ADN o la melanogénesis, entre otros (Steenvoorden y van Henegouwen 1997; Fuchs 1998; Gilaberte y González 2010; Nichols y Katiyar 2010). En la búsqueda de este tipo de compuestos, se han estudiado numerosas moléculas orgánicas e inorgánicas. Sin embargo, varias de ellas han mostrado efectos secundarios durante su implementación, lo que ha llevado a la búsqueda de compuestos naturales que son generalmente más seguros.

Los compuestos de origen vegetal han ganado popularidad en los últimos años (Gilaberte y González 2010; Nichols y Katiyar 2010). En particular, sus aceites esenciales (AE) ampliamente utilizados en la medicina tradicional y la industria farmacéutica, constituyen una alternativa interesante (Pascual *et al.* 2001; Edris 2007; Bakkali *et al.* 2008). Los AE tienen una amplia gama de propiedades biológicas, entre las que se destacan antioxidante, antígenotóxica, antimutagénica y anticancerígena (Budiyanto *et al.* 2000; Knezevic-Vukcevic *et al.* 2005; Vicuña *et al.* 2010; Bakkali *et al.* 2008; López *et al.* 2011; Sinha *et al.* 2011; Stashenko *et al.* 2014). Es precisamente esta capacidad de mantener la integridad del material hereditario contra el daño genético producido por agentes mutagénicos, incluida la RUV, lo que les confiere su potencial como fuente de compuestos fotoprotectores. De hecho, existen reportes de AE obtenidos de diversas especies vegetales con este tipo de bioactividad (Knezevic-Vukcevic *et al.* 2005; Bakkali *et al.* 2006; Vuković-Gačić *et al.* 2006; Stanojevic *et al.* 2008).

Las especies del género *Lippia* son fuente de AE con propiedades biológicas comprobadas. Este género perteneciente a la familia Verbenaceae cuenta con más de 200 especies distribuidas en zonas tropicales y subtropicales de Asia, África, América Central y América del Sur (Judd *et al.* 1999; Bandoni 2000; Pascual *et al.* 2001). El género se caracteriza por tener especies aromáticas cuyos aceites contienen una mezcla de compuestos volátiles como terpenos y sus derivados oxigenados, responsables del aroma característico de estas plantas (Stashenko *et al.* 1998). Las especies de este género, se han utilizado tradicionalmente como condimento, para tratar enfermedades gastrointestinales, genitourinarias y respiratorias, así como remedio anti-inflamatorio y analgésico (Pascual *et al.* 2001; Oliveira *et al.* 2014). Estudios de la bioactividad del género han demostrado que la vasta diversidad química dada por la variedad de metabolitos secundarios presentes en las plantas de este género constituye una de sus características más importantes (Stashenko *et al.* 2003). Las especies exhiben propiedad antiviral (Meneses *et al.* 2009; Abad *et al.* 1997; Andrighetti-Fröhner *et al.* 2005), antimicrobiana (Santos *et al.* 2004; Oliveira *et al.* 2007), antiprotzoaria (Escobar *et al.* 2010; Borges *et al.* 2012), antioxidante (Stashenko *et al.* 2008) y antigenotóxica (Vicuña *et al.* 2010; López *et al.* 2011). En consecuencia, las especies del género *Lippia* pueden resultar promisorias en la búsqueda de compuestos fotoprotectores.

Dada la necesidad de encontrar compuestos fotoprotectores que contribuyan a disminuir la incidencia de procesos carcinogénicos en piel y a controlar el fotoenvejecimiento, el presente trabajo se enfocó en evaluar el efecto protector frente al daño causado en el ADN por la RUV, de los AE obtenidos a partir de las especies: *Lippia alba*, *L. citriodora*, *L. dulcis*, *L. graveolens*, *L. micromera* y *L. organoides*, así como de sus principales constituyentes; usando como modelo de estudio el ensayo SOS Chromotest.

1. MATERIALES Y METODOS.

1.1. Medios y compuestos químicos.

Los mutágenos de referencia aflatoxina B1 (AFB1) y 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO), así como los compuestos de referencia de carvacrol (98% de pureza), citral (95%), *p*-cimeno (99%), epigallocatequina-3-galato, EGCG (95%), geraniol (98%), (R)+ limoneno (97%), timol (99.5%), Trolox® (97%), resveratrol (99%) y α -tocoferol (97%) se obtuvieron de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, USA). El medio Luria-Bertani (LB) y los sustratos para la β -galactosidasa (2-nitrofenil- β -D-galactopiranosido, ONPG) y la fosfatasa alcalina (4-nitrofenilfosfato, PNPP) fueron adquiridos de Amresco (Solon, Ohio, USA). La fracción S9 de hígado de rata se obtuvo de Moltox (Boone, Carolina del Norte, USA). Los demás reactivos usados fueron obtenidos de las casas comerciales J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EE.UU) y Merck (Kenilworth, NJ, EE.UU).

1.2. Material biológico.

Se estudiaron diez especímenes correspondientes a seis especies del género *Lippia*, previamente identificados en el Herbario Nacional Colombiano del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá, Colombia). Estos son: *L. alba* –quimiotipo carvona (COL480750); *L. alba*, quimiotipo citral (COL512272); *L. alba*, quimiotipo mircenona (COL560257); *L. citriodora* (COL555845); *L. dulcis* (COL512079); *L. graveolens* (COL555839); *L. micromera* (COL516924); *L. origanoides*, quimiotipo carvacrol (COL512075); *L. origanoides*, quimiotipo felandreno (COL519798) y *L. origanoides*, quimiotipo timol (COL519799).

Las plantas utilizadas en este trabajo, fueron colectadas en las parcelas experimentales del Centro Nacional de Investigaciones para la Agro-

industrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM) de la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Colombia), en el marco del proyecto Bio-Red-CO-CENIVAM No. RC-0572-2012. La extracción de los AE se realizó por el CENIVAM mediante la técnica de hidrodestilación asistida por radiación microondas (MWHD, de sus siglas en inglés) como indican Stashenko *et al.* (2010). Con el fin de evitar daño por humedad en los aceites, estos fueron deshidratados utilizando sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), el cual fue posteriormente retirado de las muestras para su almacenamiento en viales ámbar a 4 °C. La caracterización química de los aceites fue realizada por el laboratorio CROM-MAS-CENIVAM de la UIS, mediante la técnica cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, de sus siglas en inglés) como se indica en Stashenko *et al.* (2010, 2013). Los datos sobre la composición química de los AE pueden consultarse en el Anexo A.

1.3. Estirpe celular y condiciones de cultivo.

En este trabajo, se empleó la estirpe celular *Escherichia coli* cepa PQ37 [*F⁻ thr leu his-4 pyrD thi galE galK or galT lacΔU169 srl300::Tn10 rpoB rpsL uvrA rfa trp::Muc⁺ sfiA::Mu d(Ap,lac)ts*], propuesta para detectar carcinógenos (Quillardet *et al.* 1982). Esta cepa posee una copia del gen estructural *LacZ* correspondiente a la enzima β-galactosidasa (βG), fusionado al gen *sfiA* (*sulA*), un gen de la respuesta SOS, responsable de inhibir temporalmente la división celular después de que ocurren daños en el ADN. Adicionalmente, la cepa tiene en su cromosoma una delección en el operón lactosa. Por lo tanto, toda la actividad βG detectada es dependiente de la expresión del gen *sulA*. La enzima βG inducida escinde el compuesto indicador ONPG, para dar lugar a un producto colorimétrico que puede ser monitoreado con un lector de placas. Dado que la cantidad de producto coloreado es directamente proporcional a la cantidad de daño inducido, la actividad específica βG es un indicador cuantificable del nivel de inducción de la respuesta SOS; y por tanto, un indicador indirecto del daño inducido en al ADN.

Las células se cultivaron en medio LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g /L, cloruro de sodio 10 g/L, pH 7.4), suplementado con ampicilina (50 µg/mL) y tetraciclina (17 µg/mL), a 37 °C bajo condiciones de agitación permanente (100 rpm) durante 16 horas. Al día siguiente, para obtener un cultivo de trabajo en fase exponencial, se realizó una dilución 1 en 10 en medio fresco, el cual se dejó crecer bajo idénticas condiciones experimentales hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a 600 nm ($DO_{600nm} = 0.4$).

1.4. Ensayo de genotoxicidad.

La genotoxicidad de los AE y de sus constituyentes mayoritarios se evaluó en el ensayo SOS Chromotest usando la cepa *E. coli* PQ37 (Quillardet *et al.* 1982). Para ello, se siguió el protocolo descrito por Quillardet y Hofnung (1985) con las modificaciones propuestas por Fuentes *et al.* (2006). Teniendo en cuenta que los solventes orgánicos pueden afectar los estimados de genotoxicidad y antigenotoxicidad en el cromoensoyo (Quintero *et al.* 2012), siempre se usó un baño ultrasonido y agua como solvente (Elma, Singen, Alemania) para dissolver los AE y compuestos puros. De manera general, el cultivo en fase exponencial ($DO_{600nm} = 0.4$), fue diluido 10 veces en medio LB y dispensado en tubos de microcentrífuga que contenían diferentes diluciones del AE (entre 0.01 y 1.66%), o del compuesto (a concentraciones, que varían dependiendo de la solubilidad de cada compuesto) para evaluar. Esta mezcla fue incubada a 8 °C durante 30 min para permitir la incorporación del compuesto en la célula y posteriormente, durante 2 horas a 37 °C, con agitación permanente (300 rpm) en un aparato Termomixer Eppendorf (São Paulo, Brasil), para la recuperación celular e inducción SOS. En cada experimento fueron siempre incluidos: control negativo (agua destilada estéril); control positivo, AFB1 (16.68 µM) y 4-NQO (2,34 µM) en presencia y ausencia de activación metabólica (fracción S9 de hígado de rata), respectivamente. El blanco de lectura se diferenció del control negativo, en que

contuvo agua en lugar de sustrato. En todos los casos, se desarrollaron al menos tres experimentos independientes con cuatro réplicas cada uno.

Posterior a la incubación, se desarrollaron en simultáneo los ensayos enzimáticos usando microplacas Brand (Wertheim, Alemania) de 96 pozos, así: en la parte superior de la placa (filas A-D) se llevó a cabo ensayo de β -galactosidasa (β G); mientras en la mitad inferior (filas E-H), el ensayo de fosfatasa alcalina (FA). Las columnas correspondieron: al blanco, control negativo, control positivo y diferentes concentraciones del AE o compuesto a evaluar. Para el ensayo de actividad β G, las membranas celulares se rompieron mezclando 135 μ L de *buffer* Z (Na_2HPO_4 60 mM, NaH_2PO_4 40 mM, KCl 10 mM, Mg_2SO_4 1 mM, SDS 0.1%, β -mercaptoetanol 40 mM, pH 7.0) con 15 μ L de células durante 20 min a temperatura ambiente. La reacción enzimática se inició agregando 30 μ L de ONPG (4 mg/mL en *buffer* fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.0). Después de 40 min de incubación a temperatura ambiente, se detiene la reacción adicionando 100 μ L de carbonato de sodio (1 M). En el caso de la actividad FA, las membranas celulares se rompieron mezclando 135 μ L de *buffer* T (Tris HCl 1 M, SDS 0.1%, pH 8.8) con 15 μ L de células. La reacción enzimática se inició agregando 30 μ L de PNPP (4 mg/mL en *buffer* T) y se detuvo adicionando 50 μ L de HCl (2.5M) y 5 min después 50 μ L de TRIS (2M), para restaurar el color. La lectura de absorbancia de los ensayos enzimáticos se realizó a una DO de 420 nm usando un espectrofotómetro Multiskan GO (Thermo Scientific, MA, EE.UU).

El criterio de genotoxicidad empleado fue el Factor de Inducción (FI), cuyo cálculo se realizó según Quillardet y Hofnung (1985). Primero, se calculó la actividad enzimática β G y FA, así: unidades enzimáticas (UE) = $(1000 \times A_{420}) / t$, donde A_{420} es la lectura de densidad óptica a 420nm y t es el tiempo de incubación en minutos con el sustrato (ONPG o PNPP). La relación de las UE de la β G y la FA ($R = \text{UE-}\beta\text{G}/\text{UE-FA}$), refleja la inducción del gen *suIA*, incluso cuando se produce inhibición de la síntesis de proteínas. El FI representa los datos de inducción del

gen *sulA* normalizados en cada tratamiento y se considera como una medida indirecta del daño primario (genotoxicidad) inducido en el ADN por estos tratamientos. Este parámetro se calculó así: $FI = R_t / R_{nt}$, donde t y nt hacen referencia a las células tratadas y no tratadas, respectivamente. La interpretación de los resultados se realizó considerando lo siguiente: “no genotóxico”, $FI \leq 1.5$; “inconclusos”, $1.5 \leq FI \leq 2.0$, y “genotóxico”, $FI \geq 2.0$ con una clara relación dosis-respuesta.

1.5. Condiciones de irradiación.

En todos los casos, la irradiación se llevó a cabo en oscuridad y se emplearon cultivos de células (1 mL) en fase exponencial $DO_{600nm} = 0.4$ ($\sim 2 \times 10^8$ células/mL), los cuales fueron distribuidos uniformemente en placas Petri de vidrio de 5 cm de diámetro, formando una capa de ~ 1.1 mm. La irradiación con UVC se realizó con una lámpara germicida de 55 Voltios, referencia 0000502-G15W T8 (Sylvania, Inglaterra), con pico de emisión a 253,7 nm y empleando una dosis de $20,28 \text{ J/m}^2$. Dicha dosis fue calculada usando el modelo matemático propuesto por Kowalski *et al.* (2002). Para mayor detalle, véase anexo B. Aunque la UVC tradicionalmente se ha considerado biológicamente irrelevante por ser filtrada por la capa de ozono, se ha utilizado en diferentes estudios debido a que las reacciones fotoquímicas en esta longitud de onda son más eficientes (Mitchell *et al.* 1999; Ravanat *et al.* 2001; Matsumura y Ananthaswamy 2002; Rastogi *et al.* 2010).

1.6. Ensayo de antigenotoxicidad.

Los aceites y compuestos que no resultaron genotóxicos fueron ensayados para su potencial antigenotóxico frente a RUV, usando un procedimiento de co-incubación (Fuentes *et al.* 2006). El procedimiento se desarrolló básicamente como el ensayo de genotoxicidad, pero, en este caso, las células fueron tratadas simultáneamente con RUV y con diferentes concentraciones de los AE

correspondientes a las diferentes especies de *Lippia*, con los compuestos puros y con las mezclas de compuestos (MC). Cada MC se preparó entre compuestos promisorios, usando para cada mezcla tres proporciones diferentes: A (1:1); B (3:1) y C (1:3). La concentración de los compuestos utilizados para preparar cada MC fue estimada teóricamente considerando la concentración efectiva estimada para cada compuesto, cuando estos se disuelven en agua (véase, Sección 1.7).

De forma breve, para los ensayos de antigenotoxicidad, el cultivo en fase exponencial fue diluido 5 veces en medio LB a doble fuerza y mezclado (volumen: volumen) en una serie de tubos de microcentrífuga que contenían diferentes concentraciones del AE, compuesto o MC. La mezcla se dispensó en cajas Petri para su irradiación, posteriormente, las células fueron recuperadas en tubos de microcentrífuga y, finalmente, fueron incubadas para dar lugar a las reacciones enzimáticas, como se describió en el ensayo de genotoxicidad. En estos ensayos siempre se incluyó un control negativo (agua destilada), un control positivo (células irradiadas) y un blanco de lectura. Así mismo, se desarrollaron al menos tres experimentos independientes con cuatro réplicas cada uno.

El criterio de antigenotoxicidad usado fue el porcentaje de inhibición de la genotoxicidad (%IG), el cual representa la habilidad del AE o del compuesto para proteger el ADN. El %IG se midió como una reducción significativa del FI en los co-tratamientos (AE, compuesto o MC + R-UV), en relación al control positivo. Este porcentaje se calculó, según se indica: $\%IG = 1 - (FI_{ct} - FI_{nt} / FI_{R-UV} - FI_{nt}) \times 100$. Donde FI_{ct} representa el factor de inducción SOS en los co-tratamientos; FI_{nt} , el factor de inducción basal en células no tratadas (control negativo), y FI_{R-UV} el factor de inducción en células irradiadas (control positivo). Valores negativos del %IG fueron considerados como cero, así este indicador fue definido para valores entre cero y 100%.

1.7. Cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización en llama.

La identificación de los constituyentes de los AE disueltos en agua bajo nuestras condiciones experimentales (véase sección 1.4), se realizó por comparación con compuestos de referencia certificados, los cuales fueron analizados junto con las muestras por CG-FID bajo las mismas condiciones operacionales. Los constituyentes de los AE fueron recuperados de la matriz acuosa realizando una extracción líquido-líquido. Para ello, cada matriz acuosa (1 mL) fue mezclada con igual volumen de diclorometano, la fracción orgánica fue recuperada y el procedimiento se repitió tres veces más con el fin de recuperar la mayor cantidad posible de compuestos. Finalmente, el volumen se redujo a 1 mL, usando corriente de nitrógeno.

La estimación de la concentración de los constituyentes ($\mu\text{g/mL}$) de los AE disueltos en agua y previamente identificados, se llevó a cabo utilizando el método de calibración externa. Para ello, se prepararon soluciones de las sustancias-patrón de concentración conocida usando diclorometano como solvente y se analizaron por GC-FID. Usando esta información, se construyeron curvas de calibración de los compuestos (área vs. concentración) y por interpolación se estimó la concentración del compuesto de interés. La concentración estimada de cada compuesto puro cuando éste se disuelve en agua, se determinó como se describió para los constituyentes de los AE.

El análisis GC-FID se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases 6890N (*Agilent Technologies Inc*, CA, EE.UU) acoplado a un detector de ionización en llama, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (relación de *split* 30:1) y un inyector automático *Agilent 7863B Series*, con volumen de inyección de 1 μL . La separación de los compuestos se llevó a cabo en una columna capilar apolar DB5-MS (*J&W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 μm , d_f , con fase estacionaria de 5%-fenilpoli(metilsiloxano). Como gas de arrastre se

utilizó helio, con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16.47 psi y flujo constante de 1 mL/min. La temperatura del horno se programó de manera escalonada, así: temperatura inicial de 45 °C (5 min), aumento de temperatura hasta 150 °C a razón de 4 °C/min (2 min), posterior aumento de temperatura a razón de 5 °C/min hasta 250 °C (5 min). Finalmente, se elevó la temperatura hasta llegar a 275 °C a razón de 10 °C/min (15 min). La temperatura del detector fue de 280 °C. El flujo de los gases se mantuvo así: aire, 300 mL/min; hidrógeno, 30 mL/min y nitrógeno, 30 mL/min.

1.8. Análisis estadístico de los datos.

Se calcularon los valores promedio de las unidades enzimáticas de la β G y la FA, así como del FI con sus correspondientes errores estándar. Se realizó el *test* de Kolmogorov-Smirnov para probar la normalidad de los datos y una prueba de F-máxima para probar la homogeneidad de varianza. Las diferencias entre tratamientos se evaluaron con una prueba *a posteriori* de Dunnet. El análisis de correlación “producto-momento” (Pearson) se realizó para examinar la relación “dosis-respuesta”. Para todos los análisis estadísticos, se consideró una $p < 0,05$. Todos los análisis se realizaron con el programa R.

2. RESULTADOS.

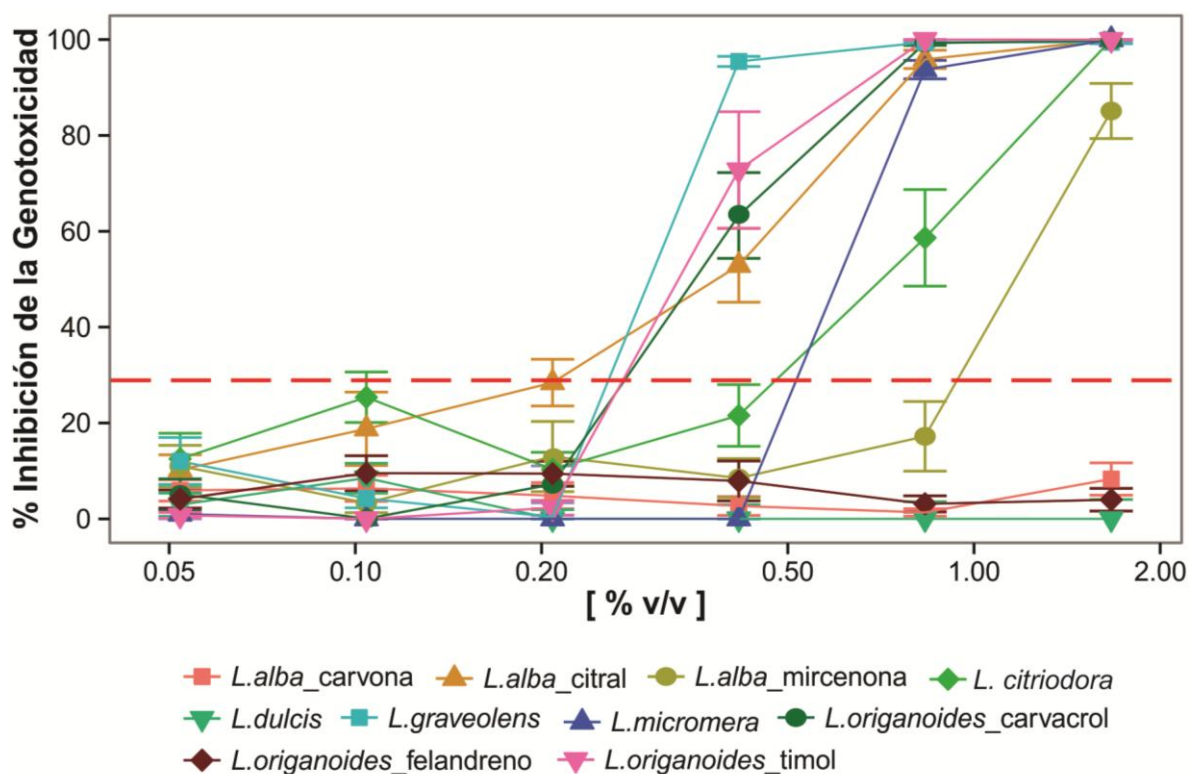
2.1. Evaluación de la genotoxicidad y antigenotoxicidad de los aceites esenciales.

Los valores promedio del FI y sus respectivos errores estándar para los ensayos de genotoxicidad de los AE en estudio, tanto en presencia como en ausencia de activación metabólica, se presentan en la Tabla 1. De acuerdo con los resultados, ningún aceite mostró un incremento significativo en el nivel de inducción del gen *sulA* para las dosis evaluadas. Por lo tanto, se consideró que estos aceites no son genotóxicos, es decir no inducen daño genético en el ensayo SOS Chromotest, bajo las condiciones experimentales de estudio.

Los ensayos de antigenotoxicidad evidenciaron que los AE estudiados mostraron una reducción significativa del efecto genotóxico de la R-UVC para un rango de concentración entre 0.21 y 1.66% v/v (Figura 1). En general, dosis elevadas de los AE inhiben significativamente la genotoxicidad en células co-tratadas (UVC + AE) con respecto al control positivo (UVC); mientras que dosis bajas de éstos no mostraron efecto inhibitorio. Basado en los valores de Mínima Concentración que Significativamente Inhiben la Genotoxicidad (MCSIG), el potencial fotoprotector de los AE fue como sigue: *L. alba* - quimiotipo citral (0.21%) > *L. graveolens* (0.42%) $\approx$ *L. origanoides* - quimiotipo timol (0.42%) $\approx$ *L. origanoides* - quimiotipo carvacrol (0.42%) > *L. micromera* (0.83%) $\approx$ *L. citriodora* (0.83%) > *L. alba* - quimiotipo mircenona (1.66%). Los AE de *L. alba* – quimiotipo carvona, *L. dulcis* y *L. origanoides* – quimiotipo felandreno, no redujeron la genotoxicidad de la UVC a ninguna de las concentraciones ensayadas. Interesantemente, seis de los diez AE mostraron fotoprotección a concentraciones menores de 1%, indicando su potencial para la formulación de fotoprotectores naturales. Así, las especies *L. alba* - quimiotipo citral, *L. graveolens*, *L. origanoides* - quimiotipos carvacrol y

timol, *L. micromera* y *L. citriodora*; mostraron potencial como fuentes de compuestos que protegen el ADN celular del daño genético producido por la RUV.

Figura 1. Antigenotoxicidad de aceites esenciales frente a radiación ultravioleta.



[% v/v]: Concentración del aceite esencial disuelto en agua expresado en porcentaje volumen/volumen (eje x logaritmizado). **Línea punteada:** por encima de esta línea se encuentran los valores de Mínima Concentración que Significativamente Inhiben la Genotoxicidad para cada aceite, esto es la concentración del aceite en la que se evidencia diferencia significativa entre el porcentaje de inhibición de la genotoxicidad del tratamiento respecto al control positivo en cada experimento. ($p < 0,05$).

Tabla 1. Genotoxicidad aceites esenciales en presencia y ausencia de activación metabólica.

Especie	Tratamientos	FI (+S9)	FI	Especie	Tratamientos	FI (+S9)	FI
<i>Lippia alba</i> carvona	C- H ₂ O	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	<i>Lippia graveolens</i>	C- H ₂ O	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
	C+ 4NQO		20.0 ± 1.1		C+ 4NQO		17.0 ± 1.9
	C+ AFB1	11.7 ± 2.4			C+ AFB1	9.5 ± 0.4	
	1.66 % v/v	0.9 ± 0.1 n.s.	0.6 ± 0.1 *		1.66 % v/v	0.3 ± 0.0 n.s.	0.5 ± 0.1 *
	0.83 % v/v	1.2 ± 0.0 n.s.	1.0 ± 0.2 n.s.		0.83 % v/v	0.9 ± 0.0 n.s.	1.1 ± 0.1 n.s.
	0.42 % v/v	1.2 ± 0.0 n.s.	0.8 ± 0.0 n.s.		0.42 % v/v	1.1 ± 0.1 n.s.	1.0 ± 0.1 n.s.
	0.21 % v/v	1.1 ± 0.0 n.s.	1.1 ± 0.2 n.s.		0.21 % v/v	1.1 ± 0.1 n.s.	0.9 ± 0.1 n.s.
	0.10 % v/v	1.1 ± 0.0 n.s.	0.8 ± 0.0 n.s.		0.10 % v/v	1.1 ± 0.0 n.s.	0.8 ± 0.0 n.s.
	0.05 % v/v	1.1 ± 0.0 n.s.	0.9 ± 0.1 n.s.		0.05 % v/v	1.2 ± 0.1 n.s.	0.8 ± 0.1 n.s.
<i>Lippia alba</i> cital	C- H ₂ O	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.0	<i>Lippia micromera</i>	C- H ₂ O	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
	C+ 4NQO		23.5 ± 1.7		C+ 4NQO		19.0 ± 1.4
	C+ AFB1	13.3 ± 0.9			C+ AFB1	11.7 ± 0.5	
	1.66 % v/v	0.3 ± 0.0 *	0.4 ± 0.0 *		1.66 % v/v	0.6 ± 0.0 *	0.9 ± 0.2 n.s.
	0.83 % v/v	1.0 ± 0.1 n.s.	1.1 ± 0.0 n.s.		0.83 % v/v	1.0 ± 0.0 n.s.	1.3 ± 0.2 n.s.
	0.42 % v/v	1.3 ± 0.1 n.s.	0.9 ± 0.0 n.s.		0.42 % v/v	0.8 ± 0.0 n.s.	1.0 ± 0.1 n.s.
	0.21 % v/v	1.5 ± 0.2 n.s.	1.0 ± 0.0 n.s.		0.21 % v/v	1.0 ± 0.1 n.s.	1.1 ± 0.0 n.s.
	0.10 % v/v	1.4 ± 0.1 n.s.	0.9 ± 0.1 n.s.		0.10 % v/v	1.0 ± 0.0 n.s.	0.9 ± 0.0 n.s.
	0.05 % v/v	1.6 ± 0.2 n.s.	0.9 ± 0.0 n.s.		0.05 % v/v	1.0 ± 0.1 n.s.	1.0 ± 0.1 n.s.
<i>Lippia alba</i> mircenona	C- H ₂ O	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.0	<i>Lippia origanoides</i> carvacrol	C- H ₂ O	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.1
	C+ 4NQO		24.3 ± 0.8		C+ 4NQO		21.7 ± 2.7
	C+ AFB1	3.3 ± 0.4			C+ AFB1	12.9 ± 0.8	
	1.66 % v/v	0.7 ± 0.1 n.s.	0.7 ± 0.2 n.s.		1.66 % v/v	0.4 ± 0.0 *	0.4 ± 0.0 *
	0.83 % v/v	0.8 ± 0.2 n.s.	1.1 ± 0.1 n.s.		0.83 % v/v	1.2 ± 0.2 n.s.	1.1 ± 0.1 n.s.
	0.42 % v/v	0.9 ± 0.1 n.s.	1.4 ± 0.1 n.s.		0.42 % v/v	1.0 ± 0.1 n.s.	1.2 ± 0.1 n.s.
	0.21 % v/v	1.0 ± 0.1 n.s.	1.2 ± 0.1 n.s.		0.21 % v/v	1.0 ± 0.0 n.s.	1.0 ± 0.1 n.s.
	0.10 % v/v	1.0 ± 0.1 n.s.	1.0 ± 0.1 n.s.		0.10 % v/v	1.1 ± 0.1 n.s.	1.1 ± 0.1 n.s.
	0.05 % v/v	1.0 ± 0.1 n.s.	1.1 ± 0.0 n.s.		0.05 % v/v	1.0 ± 0.0 n.s.	1.0 ± 0.1 n.s.

Continuación, Tabla 1.

<i>Lippia citriodora</i>	C- H2O	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.0	<i>Lippia origanoides</i> felandreno	C- H2O	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.0
	C+ 4NQO		18.8 ± 2.2		C+ 4NQO		20.1 ± 1.3
	C+ AFB1	10.5 ± 1.8			C+ AFB1	8.1 ± 1.2	
	1.66 % v/v	0.1 ± 0.0 *	0.7 ± 0.1 *		1.66 % v/v	0.7 ± 0.1 n.s.	0.8 ± 0.1 *
	0.83 % v/v	0.6 ± 0.1 n.s.	0.9 ± 0.1 n.s.		0.83 % v/v	0.9 ± 0.1 n.s.	0.6 ± 0.1 *
	0.42 % v/v	0.7 ± 0.1 n.s.	1.0 ± 0.0 n.s.		0.42 % v/v	0.7 ± 0.1 n.s.	1.0 ± 0.1 n.s.
	0.21 % v/v	0.6 ± 0.0 n.s.	1.0 ± 0.1 n.s.		0.21 % v/v	1.1 ± 0.1 n.s.	1.0 ± 0.0 n.s.
	0.10 % v/v	1.1 ± 0.2 n.s.	1.0 ± 0.0 n.s.		0.10 % v/v	0.7 ± 0.1 n.s.	0.9 ± 0.0 n.s.
	0.05 % v/v	1.1 ± 0.2 n.s.	1.0 ± 0.0 n.s.		0.05 % v/v	0.7 ± 0.1 n.s.	1.0 ± 0.0 n.s.
<i>Lippia dulcis</i>	C- H2O	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	<i>Lippia origanoides</i> timol	C- H2O	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
	C+ 4NQO		22.6 ± 1.3		C+ 4NQO		24.9 ± 1.1
	C+ AFB1	9.2 ± 1.1			C+ AFB1	10.3 ± 0.2	
	1.66 % v/v	0.6 ± 0.0 n.s.	0.9 ± 0.1 n.s.		1.66 % v/v	0.7 ± 0.1 n.s.	0.4 ± 0.0 *
	0.83 % v/v	1.3 ± 0.2 n.s.	1.0 ± 0.1 n.s.		0.83 % v/v	1.0 ± 0.1 n.s.	1.4 ± 0.2 n.s.
	0.42 % v/v	0.9 ± 0.1 n.s.	1.0 ± 0.0 n.s.		0.42 % v/v	1.0 ± 0.0 n.s.	1.2 ± 0.1 n.s.
	0.21 % v/v	1.0 ± 0.1 n.s.	1.0 ± 0.1 n.s.		0.21 % v/v	1.1 ± 0.1 n.s.	1.2 ± 0.1 n.s.
	0.10 % v/v	1.0 ± 0.1 n.s.	1.2 ± 0.0 n.s.		0.10 % v/v	1.3 ± 0.3 n.s.	1.2 ± 0.2 n.s.
	0.05 % v/v	0.8 ± 0.0 n.s.	1.0 ± 0.0 n.s.		0.05 % v/v	1.1 ± 0.1 n.s.	1.1 ± 0.1 n.s.

% v/v: Concentración del aceite esencial disuelto en agua, expresado en porcentaje volumen/volumen. C-: control negativo. C+: control positivo. 4-NQO: 4-nitroquinolina-1-óxido (2.34µM), AFB1: aflatoxina B1 (16.68 µM). FI: factor de inducción. * diferencia significativa entre el FI del tratamiento y el FI del control negativo. n.s.: no diferencia significativa entre el FI del tratamiento y el FI del control negativo (p < 0,05). S9: mezcla de activación metabólica usada, fracción S9 de hígado de rata.

2.2. Determinación por GC-FID de los constituyentes de los AE solubles en agua.

Stashenko *et al.* (2008; 2010; 2013; 2014) establecieron que los compuestos presentes en los AE de *Lippia* spp. son principalmente monoterpenos oxigenados, hidrocarburos-monoterpénicos y sesquiterpénicos. Los constituyentes mayoritarios de estos AE se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición química de los aceites esenciales obtenidos por MWHD de especies del género *Lippia*.

N°	Compuesto	LRI	Cantidad Relativa (%) [†]									
			LA-C	LA-LC	LA-M	LC	LD	LG	LM	LO-C	LO-F	LO-T
1	β-Mirceno	990	-	1.0	11.2	-	-	2.2	3.1	2.8	-	2.8
2	α-Felandreno	1009	-	-	-	-	-	-	-	-	9.9	-
3	p-Cimeno	1027	-	-	1.2	-	-	8.7	13.1	10.9	11.2	10.0
4	Limoneno	1030	2.9	31.8	0.9	10.7	-	-	-	-	7.2	-
5	γ-Terpineno	1060	-	-	-	-	-	4.6	12.5	11.8	1.5	5.0
6	Mircenona	1155	-	-	63.1	-	-	-	-	-	-	-
7	Timol metil éter	1228	-	-	-	-	-	-	14.9	-	-	1.9
8	Neral	1246	19.5	-	-	15.6	-	-	-	-	-	-
9	Geraniol	1254	9.5	-	-	2.7	-	-	-	-	-	-
10	Carvona	1257	-	38.3	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Geranial	1276	23.3	-	-	18.9	-	-	-	-	-	-
12	Timol	1296	-	-	-	-	-	70.2	29.1	9.9	-	54.5
13	Carvacrol	1301	-	-	-	-	-	-	-	46.2	-	1.7
14	trans-β-Cariofileno	1432	6.6	-	-	1.3	10.4	3.9	1.9	2.5	11.3	2.4

Composición del aceite esencial extraído de plantas del género *Lippia* mediante hidrodestilación asistida por radiación microondas (MWHD), obtenida mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) en el laboratorio CROM-MAS-CENIVAM de la UIS. N° Orden de elusión de los compuestos en la columna DB-5MS; LRI, Valores de índices de retención lineales calculados de un mínimo de tres cromatogramas independientes. (†), Únicamente fueron considerados compuestos, cuya cantidad relativa fue mayor del 10% en alguno de los aceites. LA-C, *Lippia alba* (citral); LA-LC, *Lippia alba* (limoneno/carvona); LA-M, *Lippia alba* (mircenona); LC, *Lippia citriodora*; LD, *Lippia dulcis*; LG, *Lippia graveolens*; LM, *Lippia micromera*; LO-T, *Lippia origanoides* (timol); LO-C, *Lippia origanoides* (carvacrol) y LO-F, *Lippia origanoides* (felandreno). Para consultar la lista completa de compuestos con cantidad relativa >1% presentes en los AE en estudio, véase Anexo A.

Dado que los terpenos tienen limitada solubilidad en agua (Fichan *et al.* 1999) y que se desconoce, cuáles constituyentes de los AE se disolvieron bajo nuestras condiciones experimentales, estos compuestos fueron recuperados de cada matriz acuosa mediante extracción líquido-líquido y, posteriormente, los extractos orgánicos obtenidos fueron analizados por CG-FID. La identificación de los picos

cromatográficos en los extractos orgánicos se realizó comparándolos con los de compuestos estándar, analizados bajo las mismas condiciones cromatográficas. Finalmente, la concentración de estos compuestos se calculó por interpolación en curvas de calibración (Anexo C) de los compuestos estándar.

En general, los constituyentes mayoritarios de los AE, previamente identificados por CG-MS (Stashenko *et al.* 2013), se detectaron mediante CG-FID (Anexo D). Sin embargo, únicamente fue posible cuantificar de manera adecuada a los constituyentes principales, i.e., timol y carvacrol (Tabla 3).

Tabla 3. Cuantificación de los constituyentes principales de los aceites esenciales solubles en agua.

Especie	Compuesto	GC-MS [‡]	GC-FID [†]
		Área relativa %	[µg/mL] MCSIG
<i>Lippia graveolens</i>	Timol	67.4	78.6
	<i>p</i> -Cimeno	8.3	Detectado
<i>Lippia origanoides</i> , timol	Timol	54.5	114.4
	<i>p</i> -Cimeno	10.0	Detectado
<i>Lippia origanoides</i> , carvacrol	Carvacrol	46.2	122.4
	γ -Terpineno	11.8	No evaluado
	<i>p</i> -Cimeno	10.9	Detectado
	Timol	9.9	20.5
<i>Lippia alba</i> , citral	Geranial	23.3	-
	Neral	19.5	-
	Geraniol	9.5	-
<i>Lippia micromera</i>	Timol	29.1	83.4
	Timol metil éter	14.9	No evaluado
	<i>p</i> -Cimeno	13.1	Detectado
	γ -Terpineno	12.5	No evaluado
<i>Lippia citriodora</i>	Geranial	18.9	Detectado
	Neral	15.6	Detectado
	Limoneno	10.7	Detectado
	1,8-Cineol	5.0	Detectado
	Geraniol	2.7	Detectado

GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, **GC-FID:** Cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización en llama. **Cuantificado:** Compuesto soluble en agua detectado por GC-FID y para el que fue posible estimar su concentración. **Detectado:** Compuesto soluble en agua detectado por GC-FID y pero para el que no fue posible cuantificar, debido a que su concentración se encontraba por debajo del límite de cuantificación de las curvas de calibración realizadas. **No evaluado:** Compuestos reportado como mayoritario pero que no fue evaluado en este trabajo. **MCSIG:** Mínima Concentración que Significativamente Inhiben la Genotoxicidad. **Citral:** Mezcla de los isómeros geométricos neral y geranial. [†]: datos de este trabajo. [‡]: datos proporcionados por CENIVAM.

Para otros constituyentes de los AE detectados por CG-FID, como neral, geranial, limoneno, geraniol y *p*-cimeno no fue posible estimar su concentración, dado que se encontraban por debajo del nivel mínimo de cuantificación de las curvas de calibración realizadas para estos compuestos. Esto significa que, al menos parcialmente, los terpenos presentes en los AE evaluados son solubles en agua y por lo tanto, pueden estar relacionados con la actividad antigenotóxica detectada en los AE.

Resulta interesante, que los compuestos *p*-cimeno y timol estuvieron presentes en cuatro de los de seis AE que resultaron antigenotóxicos contra la RUV, estos son: el AE de *L. graveolens*, AE de *L. origanoides*- timol, AE de *L. origanoides*-carvacrol y AE de *L. micromera*. Adicionalmente, se detectaron geraniol y 1,8-cineol en el AE de *L. citriodora*; compuestos presentes en concentraciones relativamente bajas en el AE de esta planta, según análisis por CG-MS. Estos resultados indican que la solubilidad en agua de los compuestos es un punto crítico para considerar en los estudios de antigenotoxicidad de AE, cuando se emplea el ensayo SOS Chromotest como modelo de estudio.

2.3. Evaluación de la genotoxicidad y antigenotoxicidad de los constituyentes mayoritarios de los AE.

Dado que la solubilidad de los terpenos en agua es baja y variable dependiendo del compuesto y con el fin de determinar la concentración de los mismos, se determinó la concentración de los compuestos en la primera dilución en agua, usando el procedimiento indicado anteriormente (véase acápite 1.7). El compuesto se recuperó de la matriz acuosa mediante extracción líquido-líquido y, posteriormente, se determinó su concentración por CG-FID. Por lo tanto, todas las concentraciones de compuestos indicadas en lo adelante, se refieren a la estimada a partir de la primera dilución en agua de cada compuesto.

Considerando los siguiente criterios, se evaluaron los compuestos mayoritarios presentes en los AE: i). Ser un constituyente mayoritario, cuyo porcentaje relativo en el AE analizado por CG-MS fuese mayor o igual del 10%, calculado así: cantidad relativa, % = $(A_x * 100 / A_t)$, donde A_x y A_t corresponden a las áreas cromatográficas del pico correspondiente al compuesto de interés y de la suma de todos los picos, respectivamente; ii). Que el constituyente mayoritario esté presente en dos o más de los AE considerados promisorios; iii). Que se detecte por CG-FID en la fracción orgánica recuperada de la matriz acuosa en la que se disolvieron los AE y iv). Que los constituyente sean compuestos disponibles comercialmente.

Siguiendo estos criterios, se evaluó la genotoxicidad y antigenotoxicidad de los siguientes compuestos: *p*-cimeno, carvacrol, citral (neral + geranial), geraniol, limoneno y timol; usando para ello compuestos estándar. El compuesto timol metil éter no fue evaluado, ya que únicamente cumplía con el primer criterio. Por otra parte, el compuesto γ -terpineno, aunque cumplía con los criterios i, ii y iv mencionados, no pudo ser evaluado, ya que al momento de compra no estaba disponible en la casa comercial, por esta razón, tampoco fue posible establecer, si cumplía con el criterio iii. Para comparación, se incluyeron los siguientes compuestos fotoprotectores estándar: EGCG, resveratrol, Trolox® y α - tocoferol.

Los datos de genotoxicidad de los compuestos mayoritarios mencionados se presentan en la Tabla 4. Ninguno de los compuestos, excepto el limoneno, resultaron genotóxicos en el modelo de estudio. El limoneno mostró un incremento significativo del FI en las concentraciones 98.9 y 197.7 $\mu\text{g/mL}$. Así mismo, se evidenció una correlación positiva ($R^2 = 0.975$) entre la concentración del compuesto y el FI para el rango de dosis 1.5 – 197.7 $\mu\text{g/mL}$.

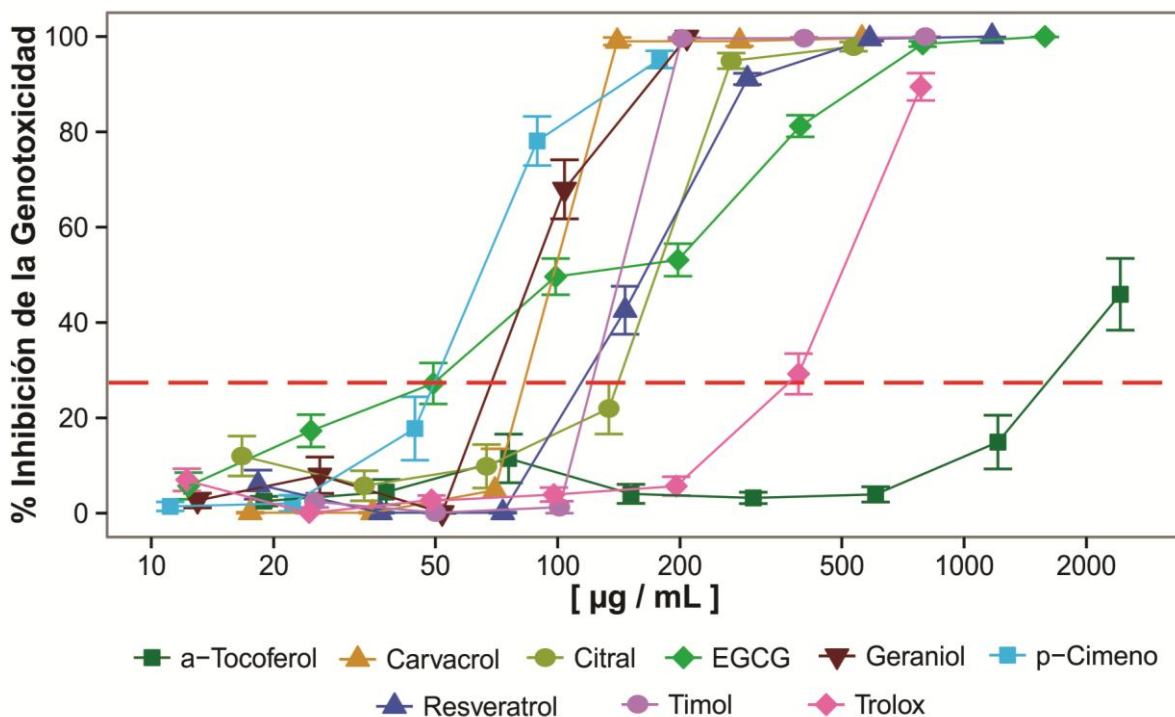
Tabla 4. Genotoxicidad compuestos mayoritarios de los AE promisorios estudiados como fotoprotectores.

Compuesto	Tratamientos	FI	Compuesto	Tratamientos	FI
<i>p</i> -Cimeno	C- H ₂ O	1.0 ± 0.0	Geraniol	C- H ₂ O	1.0 ± 0.0
	C+ 4-NQO	22.6 ± 1.4		C+ 4-NQO	22.8 ± 1.2 *
	89.0 µg/mL	2.2 ± 0.1 *		207.9 µg/mL	1.6 ± 0.1 *
	44.5 µg/mL	1.4 ± 0.1 *		103.9 µg/mL	1.3 ± 0.1 n.s.
	22.3 µg/mL	1.1 ± 0.0 n.s.		52.0 µg/mL	1.3 ± 0.1 n.s.
	11.1 µg/mL	1.1 ± 0.1 n.s.		26.0 µg/mL	1.2 ± 0.0 n.s.
	5.6 µg/mL	1.1 ± 0.1 n.s.		13.0 µg/mL	1.3 ± 0.1 n.s.
	2.8 µg/mL	0.9 ± 0.1 n.s.		6.5 µg/mL	1.2 ± 0.1 n.s.
	1.4 µg/mL	1.0 ± 0.0 n.s.		3.2 µg/mL	1.1 ± 0.0 n.s.
	0.7 µg/mL	1.0 ± 0.0 n.s.		1.6 µg/mL	1.2 ± 0.1 n.s.
Carvacrol	C- H ₂ O	1.0 ± 0.0	Limoneno	C- H ₂ O	1.0 ± 0.0
	C+ 4-NQO	16.7 ± 1.5		C+ 4-NQO	16.1 ± 0.7
	560.4 µg/mL	1.1 ± 0.1 n.s.		197.7 µg/mL	4.6 ± 0.4 *
	280.2 µg/mL	0.9 ± 0.0 n.s.		98.9 µg/mL	2.1 ± 0.2 *
	140.1 µg/mL	1.0 ± 0.0 n.s.		49.4 µg/mL	1.4 ± 0.1 n.s.
	70.1 µg/mL	1.1 ± 0.1 n.s.		24.7 µg/mL	1.0 ± 0.0 n.s.
	35.0 µg/mL	0.9 ± 0.1 n.s.		12.4 µg/mL	1.0 ± 0.0 n.s.
	17.5 µg/mL	0.8 ± 0.0 n.s.		6.2 µg/mL	1.1 ± 0.1 n.s.
	8.8 µg/mL	0.9 ± 0.1 n.s.		3.1 µg/mL	1.1 ± 0.0 n.s.
	4.4 µg/mL	1.0 ± 0.1 n.s.		1.5 µg/mL	1.0 ± 0.0 n.s.
Citral	C- H ₂ O	1.0 ± 0.0	Timol	C- H ₂ O	1.0 ± 0.0
	C+ 4-NQO	19.3 ± 0.4		C+ 4-NQO	19.8 ± 1.0
	534.5 µg/mL	0.8 ± 0.1 *		807.9 µg/mL	1.0 ± 0.1 n.s.
	267.3 µg/mL	1.1 ± 0.0 n.s.		404.0 µg/mL	1.2 ± 0.1 n.s.
	133.6 µg/mL	1.1 ± 0.0 n.s.		202.0 µg/mL	1.3 ± 0.1 *
	66.8 µg/mL	1.1 ± 0.0 n.s.		101.0 µg/mL	1.2 ± 0.0 n.s.
	33.4 µg/mL	1.1 ± 0.1 n.s.		50.5 µg/mL	1.0 ± 0.0 n.s.
	16.7 µg/mL	1.1 ± 0.0 n.s.		25.2 µg/mL	1.1 ± 0.1 n.s.
	8.4 µg/mL	1.0 ± 0.0 n.s.		12.6 µg/mL	1.0 ± 0.0 n.s.
	4.2 µg/mL	1.0 ± 0.0 n.s.		6.3 µg/mL	1.1 ± 0.0 n.s.

µg/mL: Concentración del compuesto en el ensayo, expresado en microgramos por mililitro. C-: control negativo. C+: control positivo. 4-NQO: 4-nitroquinolina-1-óxido (2.34µM). FI: factor de inducción. * diferencia significativa entre el FI del tratamiento y el FI del control negativo. n.s.: no diferencia significativa entre el FI del tratamiento y el FI del control negativo.

Los resultados de la actividad antigenotóxica de los constituyentes de los AE estudiados, que no resultaron genotóxicos, se presentan en la Figura 2. De forma general, los compuestos provocaron una disminución significativa en la genotoxicidad inducida por la RUV (valores del FI). Los %IG aumentan con la concentración del compuesto, lo que sugiere un modo de acción directo de los compuestos para la antigenotoxicidad. Basados en los valores de MCSIG de cada compuesto, el potencial fotoprotector de los mismos es como sigue: EGCG (49.4 $\mu\text{g/mL}$) > *p*-cimeno (89.0 $\mu\text{g/mL}$) > geraniol (103.9 $\mu\text{g/mL}$) > carvacrol (140.1 $\mu\text{g/mL}$) > resveratrol (146.5 $\mu\text{g/mL}$) > timol (202.0 $\mu\text{g/mL}$) > citral (267.3 $\mu\text{g/mL}$) > Trolox® (391.4 $\mu\text{g/mL}$) > α -tocoferol (2422.7 $\mu\text{g/mL}$). Los compuestos *p*-cimeno, geraniol y carvacrol, mostraron valores de fotoprotección intermedios entre EGCG y resveratrol, que son los compuestos fotoprotectores de referencia más efectivos.

Figura 2. Antigenotoxicidad de compuestos mayoritarios de los aceites esenciales estudiados.



[$\mu\text{g/mL}$]: Concentración del compuesto en el ensayo expresado en microgramos por mililitro (eje x logarítmico). **Línea punteada:** por encima de esta línea se encuentran los valores de Mínima Concentración que Significativamente Inhiben la Genotoxicidad para cada compuesto, esto es la concentración del compuesto en la que se evidencia diferencia significativa entre el porcentaje de inhibición de la genotoxicidad del tratamiento respecto al control positivo en cada experimento. ($p < 0,05$).

2.4. Antigenotoxicidad de las mezclas de los constituyentes mayoritarios de los AE.

Resulta interesante, que *p*-cimeno y geraniol, compuestos que se encuentran en menor proporción en los AE estudiados, respecto a otros como citral, carvacrol y timol, resulten con potencial fotoprotector más alto. Adicionalmente, las concentraciones estimadas para timol y carvacrol en los AE a su MCSIG, fueron menores respecto a las MCSIG de estos compuestos, cuando se evaluaron en forma pura. Esto sugiere que el efecto fotoprotector de los AE aquí estudiados, se debe posiblemente, a efectos aditivos o sinérgicos entre sus compuestos. Para dilucidar ésta hipótesis, se evaluó aditividad o sinergismo entre los constituyentes mayoritarios timol, carvacrol y *p*-cimeno, preparando para ello MC como sigue: i). **MC1**, Timol + Carvacrol; ii). **MC2**, Timol + *p*-Cimeno; iii). **MC3**, Carvacrol + *p*-Cimeno; cada MC fue preparada usando tres proporciones diferentes, (A) 1:1; (B) 3:1 y (C) 1:3, como se indica en materiales y métodos (sección 1.6).

Estos compuestos fueron seleccionados teniendo en cuenta que: i). Timol y *p*-cimeno, están presentes en cuatro de los seis AE promisorios; ii). Carvacrol es un isómero de posición del timol y es el constituyente mayoritario del aceite de *L. origanoides* - carvacrol, el único, de estos cuatro aceites, cuyo compuesto mayoritario no es timol; iii). Carvacrol y *p*-cimeno se encuentran en el grupo de compuestos cuya actividad fotoprotectora es intermedia entre EGCG y resveratrol.

De forma general, las nueve MC muestran valores del %IG superiores al 90% a menores concentraciones que sus correspondientes compuestos evaluados de forma pura (Figura 3). Sin embargo, la proporción en que los compuestos son mezclados, mostró ser un factor determinante para el potencial fotoprotector de cada MC. Por lo tanto, los tratamientos MC1-B (timol 74.75 µg/mL / carvacrol 17.51 µg/mL), MC2-B (timol 74.75 µg/mL / *p*-cimeno 2.78 µg/mL) y MC3-A (carvacrol 70.05 µg/mL / *p*-cimeno 11.13 µg/mL) resultaron ser las MC con mayor actividad fotoprotectora. En el anexo E se puede consultar en detalle la

Figure 1 displays the genotoxicity and inhibition of genotoxicity of three mixtures (MC.1, MC.2, and MC.3) across three rows (A, B, and C). The x-axis represents the concentration in $\mu\text{g / mL}$ on a logarithmic scale (1 to 1000). The y-axis represents the percentage of inhibition of genotoxicity (0 to 100%).

Row A: Genotoxicity

- MC.1: Timol / Carvacrol:** Genotoxicity is low (around 0-10%) at concentrations up to 50 $\mu\text{g / mL}$, then increases to around 40% at 100 $\mu\text{g / mL}$, and reaches 100% at 200 $\mu\text{g / mL}$ and above.
- MC.2: Timol / *p*-Cimeno:** Genotoxicity is low (around 0-10%) at concentrations up to 50 $\mu\text{g / mL}$, then increases to around 30% at 100 $\mu\text{g / mL}$, and reaches 100% at 200 $\mu\text{g / mL}$ and above.
- MC.3: Carvacrol / *p*-Cimeno:** Genotoxicity is low (around 0-10%) at concentrations up to 50 $\mu\text{g / mL}$, then increases to around 100% at 100 $\mu\text{g / mL}$ and above.

Row B: Inhibition of genotoxicity

- MC.1: Timol / Carvacrol:** Inhibition is low (around 0-10%) at concentrations up to 50 $\mu\text{g / mL}$, then increases to around 90% at 100 $\mu\text{g / mL}$, and reaches 100% at 200 $\mu\text{g / mL}$ and above.
- MC.2: Timol / *p*-Cimeno:** Inhibition is low (around 0-10%) at concentrations up to 50 $\mu\text{g / mL}$, then increases to around 20% at 100 $\mu\text{g / mL}$, and reaches 100% at 200 $\mu\text{g / mL}$ and above.
- MC.3: Carvacrol / *p*-Cimeno:** Inhibition is low (around 0-10%) at concentrations up to 50 $\mu\text{g / mL}$, then increases to around 100% at 100 $\mu\text{g / mL}$ and above.

Row C: Inhibition of genotoxicity

- MC.1: Timol / Carvacrol:** Inhibition is low (around 0-10%) at concentrations up to 50 $\mu\text{g / mL}$, then increases to around 100% at 100 $\mu\text{g / mL}$ and above.
- MC.2: Timol / *p*-Cimeno:** Inhibition is low (around 0-10%) at concentrations up to 50 $\mu\text{g / mL}$, then increases to around 100% at 100 $\mu\text{g / mL}$ and above.
- MC.3: Carvacrol / *p*-Cimeno:** Inhibition is low (around 0-10%) at concentrations up to 50 $\mu\text{g / mL}$, then increases to around 100% at 100 $\mu\text{g / mL}$ and above.

{ 36 }

concentración a la que se encuentra cada uno de los componentes de la mezcla evaluada.

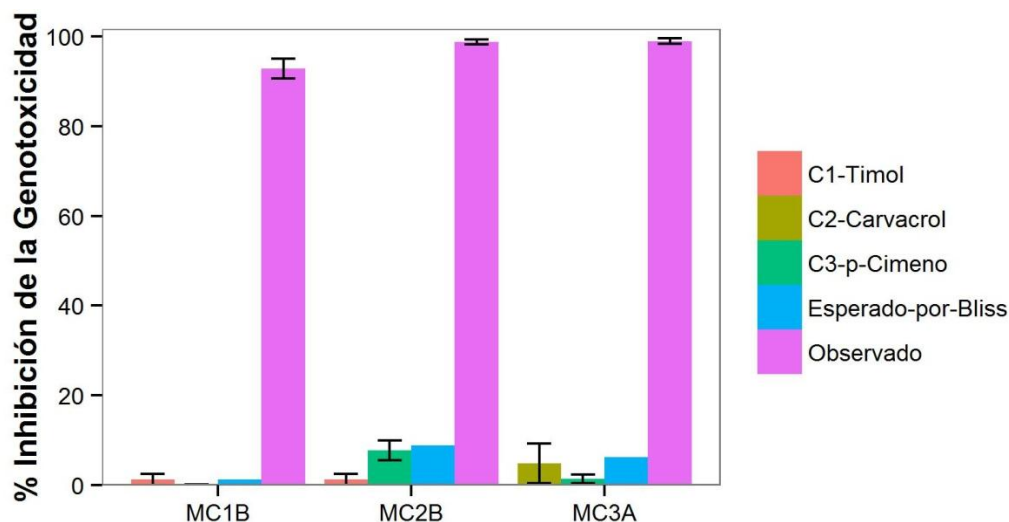
Interesantemente, las concentraciones de timol (74.75 µg/mL) y carvacrol (70.05 µg/mL) en las mezclas MC1-B, MC2-B y MC3-A también fueron inferiores a las determinadas por CG-FID para estos compuestos en la MCSIG de los AE (Tabla 3). Esto resulta relevante, ya que con dichas mezclas, usando concentraciones de compuestos más bajas, se pueden obtener niveles de protección similares al que presenta el AE; minimizando así las reacciones adversas que podrían tener algunos constituyentes de los AE (Harris 2002; Zhao *et al.* 2014). El panel de expertos de la Revisión de Ingredientes Cosméticos (CIR, por sus siglas en Inglés) ha indicado que el uso del timol y carvacrol en cosméticos es seguro a concentraciones por debajo del 0.5% (Andersen 2006).

Con el objetivo dilucidar, si el efecto fotoprotector detectado en MC1-B, MC2-B Y MC3-A es producto de un efecto sinérgico o aditivo entre los compuestos, se utilizó el modelo de sinergismo de Bliss (Bliss 1939). Este modelo se deriva de la teoría de probabilidad de aditividad completa y se considera un modelo de referencia (Zhao *et al.* 2014). En él, se comparan las respuestas observada (Y_o) y esperada (Y_E). Para Y_E se supone que no hay efecto por interacción de los componentes en la mezcla, y se calcula de la siguiente manera: $Y_{ab,E} = Y_a + Y_b - Y_a Y_b$; donde Y , en este caso, es el efecto fotoprotector expresado como %IG, mientras que a y b son los componentes de la mezcla a una dosis determinada. La interacción de los componentes en la mezcla es considerada sinergismo si $Y_o > Y_E$, antagonismo si $Y_o < Y_E$, e independiente si $Y_o \approx Y_E$.

La interacción de los compuestos en MC1-B, MC2-B Y MC3-A se muestra en la Figura 4. De acuerdo con el modelo de Bliss, los valores de Y_E para MC1-B, MC2-B Y MC3-A fueron calculados en 1.3, 8.9 y 6.2%, respectivamente, mientras experimentalmente se obtuvo un Y_o para estas MC de 92.9, 98.8 y 99.0%,

respectivamente. Estos resultados sugieren que el efecto fotoprotector en la mezcla es causado por interacciones sinérgicas entre estos componentes.

Figura 4. Efecto sinérgico en mezclas de compuestos mayoritarios presentes en los aceites esenciales.



MC: Mezcla de compuestos, **MC1B:** Timol + Carvacrol, mezclado en proporción 3:1. **MC2B:** Timol + *p*-Cimeno, mezclado en proporción 3:1. **MC3A:** Carvacrol + *p*-Cimeno, mezclado en proporción 1:1. **C1:** Efecto antigenotóxico del compuesto timol, evaluado a la concentración que se encuentra en la mezcla de forma independiente. **C2:** Efecto del carvacrol, evaluado a la concentración que se encuentra en la mezcla de forma independiente. **C3:** Efecto del *p*-cimeno, evaluado a la concentración que se encuentra en la mezcla de forma independiente. **Esperado por Bliss:** Efecto antigenotóxico de la mezcla de compuestos indicada, según lo esperado por el modelo de Bliss. El cálculo se realizó con el resultado experimental del efecto antigenotóxico de cada compuesto a la concentración que se encuentra en la mezcla. **Observado:** Efecto antigenotóxico de cada una de las mezclas de compuestos indicadas, tomando como referencia la mínima concentración cuyo, porcentaje de inhibición de la genotoxicidad es $\geq 90\%$.

3. DISCUSIÓN.

Este trabajo se centró en las propiedades fotoprotectoras de especies colombianas del género *Lippia*, que contienen compuestos potencialmente útiles para fotoprotección y prevención del cáncer de piel. Se demostró que los AE de *L. alba*, *L. graveolens* y *L. origanoides*, son promisorios como fuente de compuestos fotoprotectores. Aunque en menor medida, los AE de *L. micromera* y *L. citriodora*, pueden también ser promisorios. Estos AE inhiben la genotoxicidad inducida por la RUV en el SOS Chromotest, efecto que fue directamente relacionado con sus constituyentes mayoritarios. Por lo tanto, carvacrol, citral, *p*-cimeno, geraniol y timol se pueden considerar como potenciales compuestos antígenotóxicos contra la RUV.

Estudios previos han demostrado propiedades antígenotóxicas de los AE de especies del género *Lippia* y sus constituyentes mayoritarios. Por ejemplo, el AE de *L. graveolens* cuenta con actividad antimutagénica frente a 4-nitro-*o*-fenilendiamina (4-NPD) y azida de sodio (Martínez-Rocha *et al.* 2008). El AE de *L. origanoides* y *L. alba*, así como sus constituyentes mayoritarios (carvacrol, carvona, citral y timol), tienen actividad antígenotóxica contra el clastógeno bleomicina (Vicuña *et al.* 2010; López *et al.* 2011). Timol y carvacrol puros reducen roturas en la cadena de ADN inducidas por 2-amino-3-metilimidazo[4,5-*f*]-quinolina (IQ), mitomicina-C (MMC) y H₂O₂ en linfocitos humanos (Sevtap Aydin *et al.* 2005b; Sevtap Aydin *et al.* 2005a); de igual forma, protegen el ADN de las roturas en su cadena inducidas por H₂O₂ en líneas celulares humanas de leucemia (K562), hepatoma (K562) y colon (Caco-2) (Horvathova *et al.* 2007; Slameňová *et al.* 2007). Adicionalmente, carvacrol inhibe la mutagenicidad del uretano, 4NPD y 2-aminofluoreno en el ensayo de *Salmonella*/microsoma (Ipek *et al.* 2005; Mezzoug *et al.* 2007), inhibe la inducción del intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos (Ipek *et al.* 2003) y tiene actividad anticancerígena en la

línea celular de cáncer de pulmón en humanos y en células de mioblasto de ratón (Koparal y Zeytinoglu 2003; Zeytinoglu *et al.* 2003). Por su parte, el timol cuenta con radioprotección frente a la radiación gamma (Archana *et al.* 2011).

Otros terpenos oxigenados como citral y geraniol también tienen propiedades quimiopreventivas. Así, citral es antigenotóxico frente a bleomicina (López *et al.* 2011) y cuenta con actividad anticlastogénica frente a ciclofosfamida, MMC y níquel metálico en ratones (Rabbani *et al.* 2005; Rabbani y Devi 2006). Por su parte, el geraniol tiene actividad anticancerígena tanto en líneas celulares humanas de cáncer de colón (Carnesecchi *et al.* 2001) y de pancreas (Burke *et al.* 1997), como en líneas celulares murinas de leucemia y melanoma (Shoff *et al.* 1991). Adicionalmente, posee actividad antitumoral en hepatomas y melanomas transplantados en ratas y ratones (Yu *et al.* 1995). No se encontraron reportes de efectos antigenotóxicos para el *p*-cimeno, por lo tanto, nuestro trabajo constituye el primer informe sobre su potencial antigenotóxico. Sin embargo, es importante mencionar que diferentes complejos de los cuales forma parte el *p*-cimeno, cuentan con actividad antitumoral en diversas líneas celulares humanas (Kaluderović *et al.* 2015; Vajs *et al.* 2015).

Todos los trabajos mencionados, y otros no citados, destacan el potencial beneficio de los AE obtenidos de plantas del género *Lippia* como suplementos dietéticos con propiedades quimiopreventivas. Dado que la genotoxicidad de la UVC involucra principalmente la producción de fotoproductos en el ADN (Zaidi *et al.* 2008); se puede esperar que el efecto antigenotóxico de los AE de *Lippia* frente a UVC ocurra por estimulación de la reparación de fotoproductos en la molécula de ADN. Se conoce, que constituyentes de los AE de *Lippia* spp, como timol y carvacrol, reducen el daño oxidativo en el ADN en linfocitos humanos tratados con H₂O₂ (Sevtap Aydin *et al.* 2005a; S Aydin *et al.* 2005). Igualmente, otros constituyentes monoterpénicos del AE de *Salvia officinalis*, como alcanfor, cineol y tujona actúan como bioantimutágenos contra la UVC, y modulan los procesos de

reparación del ADN (Vuković-Gačić *et al.* 2006). Por otra parte, carvacrol y timol pueden unirse al surco mayor y menor del ADN sin causar mayores cambios en la configuración de la molécula de ADN (Nafisi *et al.* 2004); no obstante, estos cambios conformacionales podrían interferir con la formación de los fotoproductos. Todos estos trabajos soportan la hipótesis donde los terpenos evaluados en este trabajo podrían actuar estimulando la reparación de fotoproductos. Estudios adicionales serán necesarios con el fin de aclarar los mecanismos de su fotoprotección.

Hemos planteado y soportado la hipótesis que el efecto fotoprotector de los AE de *Lippia* es causado por interacciones de tipo sinérgico entre sus constituyentes. El sinergismo es un evento común entre los constituyentes de los AE y otros tipos de extractos que podría tener una significancia práctica (Harris 2002; Yang *et al.* 2014). En este trabajo, se demostró, que las MC (MC1-B, MC2-B y MC3-A), que contienen carvacrol, timol y *p*-cimeno en diferentes proporciones, produjeron efecto fotoprotector contra la RUV a concentraciones menores que cuando se usanban individualmente. Un efecto sinérgico similar se encontró entre estos tres compuestos al medir la actividad antioxidante del AE de *L. graveolens* (Arana-Sánchez *et al.* 2010). Lograr el mismo efecto biológico a menor concentración de compuestos, constituye una ventaja práctica, ya que los terpenos en altas concentraciones pueden generar citotoxicidad (Sevtap Aydin *et al.* 2005b; Sevtap Aydin *et al.* 2005a; Buyukleyla y Rencuzogullari 2009). Debido a que el modelo de Bliss no tiene en cuenta la variabilidad de la respuesta (Zhao *et al.* 2014), la hipótesis de sinergismo para los constituyentes de los AE de *Lippia* tendrá que ser valida en estudios futuros.

Con base en datos de la literatura (Edris 2007; Bakkali *et al.* 2008), los AE de las especies de *Lippias*, y sus constituyentes mayoritarios, cuentan con un amplio potencial terapéutico. Las propiedades antígeno-tóxicas frente a la RUV reportadas en este trabajo, amplían su potencial como fuente de compuestos con posible

aplicación en la quimiopreención del cáncer y fotoprotección. En conclusión, nuestros resultados demuestran que los AE de las especies de *Lippia* son fuentes de compuestos protectores frente al daño inducido en el ADN por UVC. Este efecto fotoprotector, está estrechamente relacionado con los constituyentes mayoritarios de los AE e influenciado por la solubilidad de estos compuestos. Basados en los datos de antigenotoxicidad de los ensayos con mezclas de compuestos, sugerimos que el efecto fotoprotector de los AE, posiblemente, se debe a interacciones de tipo sinérgico entre sus constituyentes.

4. CONCLUSIONES.

Los aceites esenciales del genero *Lippia* evaluados, presentan actividad antígeno tóxica frente a UVC en el modelo de estudio; siendo *L. graveolens*, *L. origanoides* (quimiotipos timol y carvacrol), *L. alba* (quimiotipo citral), *L. micromera* y *L. citriodora*, las especies más promisorias como fuente de compuestos con actividad fotoprotectora.

El efecto fotoprotector de los aceites esenciales en estudio está directamente relacionado con sus compuestos mayoritarios, i.e. *p*-cimeno, geraniol, carvacrol, timol y citral, y depende tanto de la solubilidad de estos compuestos en agua, como de la actividad sinérgica entre ellos que se pueda presentar.

De acuerdo con los indicadores de estudio usados en esta tesis, los compuestos *p*-cimeno, geraniol y carvacrol, cuentan con efecto fotoprotector intermedio entre EGCG y resveratrol, los dos compuestos fotoprotectores de referencia más efectivos evaluados.

5. RECOMENDACIONES.

Realizar a cada compuesto que se va a evaluar, estudio de solubilidad en agua previo a los ensayos.

Realizar la evaluación de los patrones γ -terpineno y timol metil éter, para determinar su influencia en el potencial fotoprotector de los aceites obtenidos de las plantas *L. organoides*, quimiotipo carvacrol, y *L. micromera*.

Evaluar el potencial fotoprotector de la mezcla citral:geraniol, para determinar, si entre estos compuestos se presenta sinergismo, ya que estos compuestos están presentes en la fracción acuosa de dos AE promisorios, *L. alba*, quimiotipo citral, y *L. citriodora*.

Realizar diseños experimentales que permitan evaluar el sinergismo encontrado entre los compuestos timol:carvacrol, timol:*p*-cimeno y carvacrol:*p*-cimenol, con modelos que tengan en cuenta la variabilidad de los resultados.

BIBLIOGRAFÍA.

- Abad, M.J. *et al.*, 1997. Antiviral Activity of Medicinal Plant Extracts. , 11, pp.198–202.
- Afaq, F., 2011. Natural agents: Cellular and molecular mechanisms of photoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 508(2), pp.144–151.
- Andersen, A., 2006. Final Report on the Safety Assessment of Sodium p-Chloro-m-Cresol, p-Chloro-m-Cresol, Chlorothymol, Mixed Cresols, m-Cresol, o-cresol, p-cresol, Isopropyl Cresols, Thymol, o-cymen-5-ol, and carvacrol. *International Journal of Toxicology*, 25(suppl.1), pp.29–127.
- Andrighetti-Fröhner, C.R. *et al.*, 2005. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. *Fitoterapia*, 76(3-4), pp.374–378.
- Arana-Sánchez, A. *et al.*, 2010. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in β -cyclodextrin. *Letters in Applied Microbiology*, 50(6), pp.585–590.
- Archana, P., Nageshwar, B. & Satish, B., 2011. In vivo radioprotective potential of thymol, a monoterpene phenol derivative of cymene. *Mutation research*, 726(2), pp.136–45.
- Aydin, S., Başaran, A. & Başaran, N., 2005. The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. *Mutation research*, 581(1-2), pp.43–53.
- Aydin, S., Başaran, A.A. & Başaran, N., 2005a. Modulating effects of thyme and its major ingredients on oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), pp.1299–1305.
- Aydin, S., Başaran, A.A. & Başaran, N., 2005b. The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 581(1-2), pp.43–53.
- Bakkali, F. *et al.*, 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*, 606(1-2), pp.27–38.

- Bakkali, F. *et al.*, 2008. Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), pp.446–475.
- Bandoni, A.(Editor), 2000. *Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica: Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores*, La Plata, Argentina: Editorial de la Universidad Nacional de La Plata.
- Bliss, C.I., 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Applied Biology*, 26(3), pp.585–615.
- Borges, A.R. *et al.*, 2012. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. *Experimental Parasitology*, 132(2), pp.123–128.
- Budiyanto, A. *et al.*, 2000. Protective effect of topically applied olive oil against photocarcinogenesis following UVB exposure of mice. *Carcinogenesis*, 21(11), pp.2085–2090.
- Burke, Y.D. *et al.*, 1997. Inhibition of pancreatic cancer growth by the dietary isoprenoids farnesol and geraniol. *Lipids*, 32(2), pp.151–156.
- Buyukleyla, M. & Rencuzogullari, E., 2009. The effects of thymol on sister chromatid exchange, chromosome aberration and micronucleus in human lymphocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(3), pp.943–947.
- Carnesecchi, S. *et al.*, 2001. Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 298(1), pp.197–200.
- Edris, A.E., 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their Individual Volatile constituents: A review. *Phytotherapy Research*, 21(4), pp.308–323.
- Escobar, P. *et al.*, 2010. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian Lippia spp essential oils and their major components. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(2), pp.184–190.
- Fichan, I., Larroche, C. & Gros, J.B., 1999. Water Solubility, Vapor Pressure, and Activity Coefficients of Terpenes and Terpenoids. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 44(1), pp.56–62.
- Fuchs, J., 1998. Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR-alpha-tocopherol, L.ascorbic acid and B-carotene in cutaneous photoprotection. *Free radical biology & medicine*, 25(7), pp.848–873.

- Fuentes, J.L. *et al.*, 2006. Tannins from barks of *Pinus caribaea* protect *Escherichia coli* cells against DNA damage induced by γ -rays. *Fitoterapia*, 77, pp.116–120.
- Gallagher, R.P. & Lee, T.K., 2006. Adverse effects of ultraviolet radiation: A brief review. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 92(1), pp.119–131.
- Gandini, S. *et al.*, 2005. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *European Journal of Cancer*, 41(1), pp.45–60.
- Gilaberte, Y. & González, S., 2010. Update on Photoprotection. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*, 101(8), pp.659–672.
- Harris, R., 2002. Synergism in the essential oil world. *International Journal of Aromatherapy*, 12(4), pp.179–186.
- Horvathova, E., Turcaniova, V. & Slamenova, D., 2007. Comparative study of DNA-damaging and DNA-protective effects of selected components of essential plant oils in human leukemic cells K562. *Neoplasma*, 54(6), pp.478–483.
- Ipek, E. *et al.*, 2005. Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chemistry*, 93(3), pp.551–556.
- Ipek, E., Tüylü, B.A. & Zeytinoğlu, H., 2003. Effects of carvacrol on sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. *Cytotechnology*, 43(1-3), pp.145–8.
- Judd, W.S. *et al.*, 1999. *Plant Systematics: A phylogenetic approach*, Sunderland, USA: Sinauer Associates INC.
- Kaluđerović, G.N. *et al.*, 2015. Ruthenium(II) p-cymene complex bearing 2,2'-dipyridylamine targets caspase 3 deficient MCF-7 breast cancer cells without disruption of antitumor immune response. *Journal of Inorganic Biochemistry*, (li).
- Kawanishi, S., Hiraku, & Oikawa, S., 2001. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 488(1), pp.65–76.
- Knezevic-Vukcevic, J. *et al.*, 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), pp.163–172.

- Kohler, B. a. *et al.*, 2015. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 107(6), pp.1–25.
- Koparal, A.T. & Zeytinoglu, M., 2003. Effects of Carvacrol on a Human Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Cell Line, A549. *Cytotechnology*, 43(1-3), pp.149–154.
- Kowalski, W.J. *et al.*, 2000. Mathematical Modeling of Ultraviolet Germicidal Irradiation for Air Disinfection. *Quantitative Microbiology*, 2, pp.249–270.
- Laval, J. *et al.*, 1998. Antimutagenic role of base-excision repair enzymes upon free radical- induced DNA damage. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 402(1-2), pp.93–102.
- Linos, E. *et al.*, 2009. Increasing burden of melanoma in the United States. *The Journal of investigative dermatology*, 129(7), pp.1666–1674.
- 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), pp.479–488.
- Martinez-Rocha, A. *et al.*, 2008. Antioxidant and antimutagenic activities of Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth). *Plant foods Human Nutrition*, 63(1), pp.1–5.
- Matsumura, Y. & Ananthaswamy, H.N., 2002. Molecular Mechanisms of photocarcinogenesis. *Frontiers in Bioscience*, 7, pp.765–783.
- Matsumura, Y. & Ananthaswamy, H.N., 2004. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 195(3), pp.298–308.
- Meneses, R. *et al.*, 2009. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication in vitro. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 8(8).
- Mezzoug, N. *et al.*, 2007. Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. *Mutation research*, 629(2), pp.100–110.
- Mitchell, D.L. *et al.*, 1999. Effects of Chronic Low-Dose Ultraviolet B Radiation on DNA Damage and Repair in Mouse Skin. *Cancer Research*, 59, pp.2875–2884.

- Nafisi, S., Hajiakhoondi, A. & Yektadoost, A., 2004. Thymol and carvacrol binding to DNA: model for drug-DNA interaction. *Biopolymers*, 74(5), pp.345–351.
- Nichols, J. a & Katiyar, S.K., 2010. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of dermatological research*, 302(2), pp.71–83.
- Oliveira, D.R. *et al.*, 2007. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. *Food Chemistry*, 101(1), pp.236–240.
- Oliveira, D.R. *et al.*, 2014. Ethnopharmacological studies of *Lippia origanoides*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24, pp.206–214.
- Pascual, M.E. *et al.*, 2001. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 76(3), pp.201–214.
- Peltomaki, P., 2001. DNA mismatch repair and cancer. *Mutation research*, 488(1), pp.77–85.
- Purdue, M.P. *et al.*, 2008. Recent trends in incidence of cutaneous melanoma among US Caucasian young adults. *The Journal of investigative dermatology*, 128(12), pp.2905–2908.
- Quillardet, P. *et al.*, 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 Science of the United States of America*, 79(October), pp.5971–5975.
- Quillardet, P. & Hofnung, M., 1985. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutation Research*, 147, pp.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(2), pp.503–514.
- Rabbani, S.I. & Devi, K., 2006. Anti-mutagenic effect of citral against Mitomycin-C. *Journal of natural remedies*, 6(1), pp.77–82.
- Rabbani, S.I., Devi, K. & Zahra, N., 2005. Anti-Clastogenic Effects of Citral. *Iranian journal of pharmacology & therapeutics*, 4(1), pp.28–31.
- Rastogi, R.P. *et al.*, 2010. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *Journal of nucleic acids*, 2010, 32 pages.

- 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), pp.88–102.
- Santos, F.J.B. dos *et al.*, 2004. Composition and Biological Activity of Essential Oils from *Lippia origanoides* H.B.K. *Journal of Essential Oil Research*, 16(5), pp.504–506. Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2004.9698782>.
- Shoff, S.M. *et al.*, 1991. Concentration-dependent increase in murine P388 and B16 population doubling time by the acyclic monoterpene geraniol. *Cancer Research*, 51(1), pp.37–42.
- Sinha, S., Biswas, D. & Mukherjee, A., 2011. Antigenotoxic and antioxidant activities of palmarosa and citronella essential oils. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(3), pp.1521–1527. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.08.046>.
- Slameňová, D. *et al.*, 2007. DNA-protective effects of two components of essential plant oils carvacrol and thymol on mammalian cells cultured in vitro. *Neoplasma*, 54(2), pp.108–112.
- Stanojevic, J. *et al.*, 2008. The effect of essential oil of basil (*Ocimum basilicum* L.) on UV-induced mutagenesis in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biological Sciences*, 60(1), pp.93–102.
- Stashenko, E. *et al.*, 2008. Composition and Antioxidant activity of Essential Oils of *Lippia origanoides* H.B.K. grown in Colombia. *Natural Product Communications*, 3(4), pp.563–566.
- Stashenko, E.E. *et al.*, 2013. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. *Journal of Separation Science*, 36(1), pp.192–202.
- Stashenko, E.E. *et al.*, 2014. Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género *Lippia* (Verbenaceae) cultivadas en Colombia . *Revista - Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 38(supl 85), pp.89–105.
- Stashenko, E.E. *et al.*, 2010. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *Journal of Separation Science*, 33, pp.93–103.

- Stashenko, E.E., Combariza, Y. & Puertas, A.M., 1998. *Aceites esenciales, técnicas de extracción y análisis*, Bucaramanga, Colombia: Laboratorio de Fitoquímica y Cromatografía. Universidad Industrial de Santander.
- Stashenko, E.E., Jaramillo, B.E. & Martínez, J.R., 2003. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Revista Academica Colombiana De Ciencias*, 27(105), pp.579–597.
- Steenvoorden, D.P. & van Henegouwen, G.M., 1997. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 41(1-2), pp.1–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9440308>.
- Tsatsou, F. *et al.*, 2012. Extrinsic aging: UV-mediated skin carcinogenesis. *Dermato-Endocrinology*, 4(3), pp.285–297.
- Vajs, J. *et al.*, 2015. The 1,3-diaryltriazenido(p-cymene)ruthenium(II) complexes with a high in vitro anticancer activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, (li). Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0162013415300805>.
- Vicuña, G.C., Stashenko, E.E. & Fuentes, J.L., 2010. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. *Fitoterapia*, 81(5), pp.343–349. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2009.10.008>.
- Vuković-Gačić, B. *et al.*, 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), pp.1730–1738.
- Yang, Y. *et al.*, 2014. Synergy effects of herb extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. *Fitoterapia*, 92, pp.133–147. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2013.10.010>.
- Yu, S.G., Hildebrandt, L.A. & Elson, C.E., 1995. Geraniol, an inhibitor of mevalonate biosynthesis, suppresses the growth of hepatomas and melanomas transplanted to rats and mice. *The Journal of nutrition*, 125(11), pp.2763–2767.
- Zaidi, M.R., Day, C.-P. & Merlino, G., 2008. From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. *The Journal of investigative dermatology*, 128(10), pp.2381–2391.

Zeytinoglu, H., Incesu, Z. & Baser, K.H.C., 2003. Inhibition of DNA synthesis by carvacrol in mouse myoblast cells bearing a human N-RAS oncogene. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 10(4), pp.292–299.

Zhao, W. *et al.*, 2014. A New Bliss Independence Model to Analyze Drug Combination Data. *Journal of biomolecular screening*, 19(5), pp.817–821. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24492921>.

ANEXOS.

ANEXO A: Composición química de los AE de especies del género *Lippia*, obtenidos por hidrodestilación asistida por MWHD.

A	Compuesto	LRI	Cantidad relativa (%) [†]								
			LA-C	LA-LC	LA-M	LC	LD	LG	LM	LO-C	LO-F T
1	α -Thujeno	928	-	-	-	-	-	-	2.8	-	-
2	α -Pineno	936	-	-	-	-	-	-	1.0	-	2.3
3	Canfeno	954	-	-	-	-	-	-	-	-	2.6
4	Sabineno	976	-	-	-	1.9	-	-	-	-	-
5	β -Pineno	982	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	6-Methyl-5-hepten-2-ona	986	2.6	-	-	1.5	4.0	-	-	-	-
7	β -Mirceno	990	-	1.0	11.2	-	-	2.2	3.1	2.8	-
8	α -Felandreno	1009	-	-	-	-	-	-	-	-	9.9
9	α -Terpineno	1017	-	-	-	-	-	1.2	4.0	3.1	-
10	<i>p</i> -Cimeno	1027	-	-	1.2	-	-	8.7	13.1	10.9	11.2
11	Limoneno	1030	2.9	31.8	0.9	10.7	-	-	-	-	7.2
12	β -Felandreno		-	-	-	-	-	-	5.0	-	6.5
13	1,8-Cineol	1035	-	-	-	5.0	-	-	-	-	-
14	<i>trans</i> - β -Ocimeno	1048	-	1.0	0.3	-	-	-	-	-	-
15	γ -Terpineno	1060	-	-	-	-	-	4.6	12.5	11.8	1.5
16	Terpinoleno	1085	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Linalol	1096	1.5	-	3.1	-	-	-	-	-	-
18	Citronelal	1153	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-
19	Mircenona	1155	-	-	63.1	-	-	-	-	-	-
20	Borneol	1180	-	-	-	-	-	-	-	-	3.1
21	Terpinen-4-ol	1184	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	Timol metil eter	1228	-	-	-	-	-	-	14.9	-	-
23	Nerol	1228	4.5	-	-	2.0	-	-	-	-	-
24	<i>cis</i> -Ocimenona	1234	-	-	4.8	-	-	-	-	-	-
25	<i>trans</i> -Ocimenona	1238	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-

Anexo A. Continuación.

26	Neral	1246	19.5	-	-	15.6	-	-	-	-	-	-
27	Geraniol	1254	9.5	-	-	2.7	-	-	-	-	-	-
28	Carvona	1257	-	38.3	-	-	-	-	-	-	-	-
29	Piperitona	1263	-	2.6	-	-	-	-	-	-	-	-
30	Geranial	1276	23.3	-	-	18.9	-	-	-	-	-	-
31	Timol	1296	-	-	-	-	-	70.2	29.1	9.9	-	54.5
32	Carvacrol	1301	-	-	-	-	-	-	-	46.2	-	1.7
33	Acetato de timilo	1347	-	-	-	-	-	-	2.7	-	-	4.8
34	Piperitenona	1349	-	4.4	-	-	-	-	-	-	-	-
35	Acetato de geranilo	1376	3.6	-	-	1.3	-	-	-	-	-	-
36	α -Copaeno	1384	-	-	-	-	8.4	-	-	-	-	-
37	β -Bourboneno	1394	-	1.3	-	-	2.0	-	-	-	-	-
38	β -Elemeno	1397	1.9	1.2	1.4	-	-	-	-	-	-	-
39	<i>trans</i> - β -Cariofileno	1432	6.6	-	-	1.3	10.4	3.9	1.9	2.5	11.3	2.4
40	α -Guaieno	1444	1.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	<i>trans</i> - β -Farneseno	1456	-	-	0.9	-	2.5	-	-	-	-	-
42	α -Humuleno	1469	1.3	-	-	-	-	2.1	-	1.4	6.0	-
43	Germacreno D	1492	-	-	4.7	-	2.4	-	-	-	-	-
44	Biciclosesquifelandreno	1493	3.0	9.0	-	-	-	-	-	-	-	-
45	β -Bisaboleno	1512	-	-	-	-	2.6	-	-	-	-	-
46	δ -Cadinene	1526	-	-	-	-	8.8	-	-	-	-	-
47	Óxido de cariofileno	1599	-	-	-	-	2.5	-	-	-	-	-

Composición del aceite esencial extraído de plantas del genero *Lippia* mediante hidrodestilación asistida por radiación microondas (MWHD), obtenida mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) en el laboratorio CROM-MAS-CENIVAM de la UIS. N° Orden de elusión de los compuestos en la columna DB-5MS; LRI, Valores del índice de retención lineal calculado de un mínimo de tres cromatogramas independientes. (†), Únicamente fueron considerados compuestos, cuya cantidad relativa fue mayor de 1% en alguno de los aceites. LA-C, *Lippia alba* (citra); LA-LC, *Lippia alba* (limoneno/carvona); LA-M, *Lippia alba* (mircenona); LC, *Lippia citriodora*; LD, *Lippia dulcis*; LG, *Lippia graveolens*; LM, *Lippia micromera*; LO-T, *Lippia origanoides* (timol); LO-C, *Lippia origanoides* (carvacrol) y LO-F, *Lippia origanoides* (felandreno).

ANEXO B: Cálculo de la dosis de radiación UV-C usada en los ensayos.

El modelo matemático de irradiación con radiación ultravioleta germicida para desinfección de aire propuesto por Kowalski y colaboradores (2000), se basa en factores de vista y radiación térmica, los cuales definen la cantidad de radiación difusa transmitida desde una superficie a otra. De manera general se calcula como sigue:

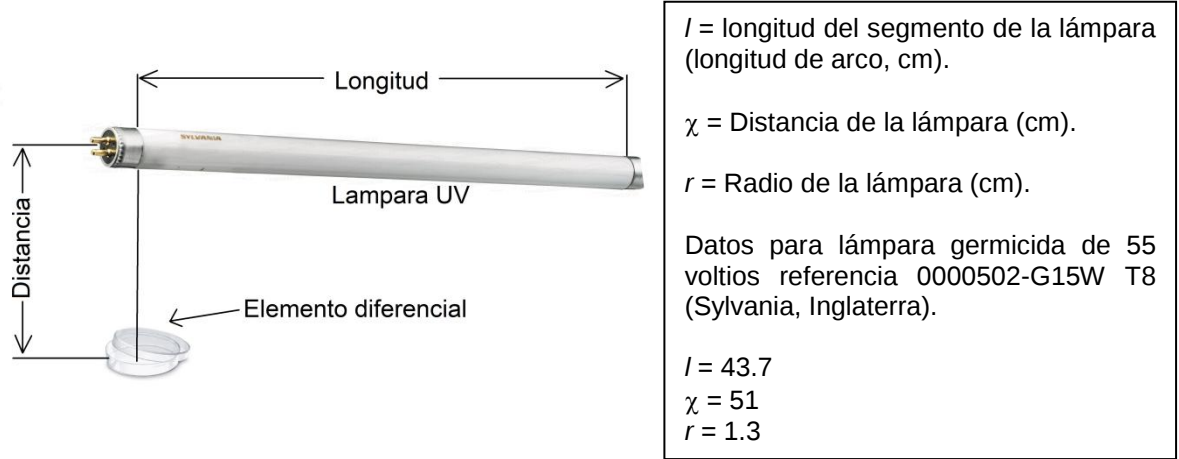


Figura tomada de Kowalski et al. 2000: Se ilustra cómo la superficie plana en la que se va a determinar la intensidad de UV, debe estar perpendicular al eje de la lámpara (dibujada como un cilindro).

La fracción de la intensidad de radiación, que sale del cuerpo cilíndrico y llega a un área diferencial, es:

$$F = \frac{L}{\pi H} \left[\frac{1}{L} \text{ATAN} \left(\frac{L}{\sqrt{H^2 - 1}} \right) - \text{ATAN}(M) + \frac{X - 2H}{\sqrt{XY}} \text{ATAN} \left(M \sqrt{\frac{X}{Y}} \right) \right]$$

Dónde:

$$H = \chi / r \quad L = l / r \quad X = (1 + H)^2 + L^2$$

$$Y = (1 - H)^2 + L^2 \quad M = \sqrt{\frac{H - 1}{H + 1}}$$

El campo de intensidad como una función de la distancia desde el eje de la lámpara es el producto de la intensidad de superficie y el factor de vista, donde la intensidad de superficie se calcula dividiendo la potencia de salida UV por el área de superficie de la lámpara:

$$I = \frac{E_{UV}}{2\pi r l} F_{total}$$

E_{UV} = Potencia de salida de la lámpara a 25°C en μW .

Datos para lámpara germicida de 55 voltios referencia 0000502-G15W T8 (Sylvania, Inglaterra).

$E_{UV} = 4900000$

El valor de I es por segundo, la irradiación se llevó a cabo durante 15 segundos.

ANEXO C: Curvas de calibración de los compuestos de referencia.

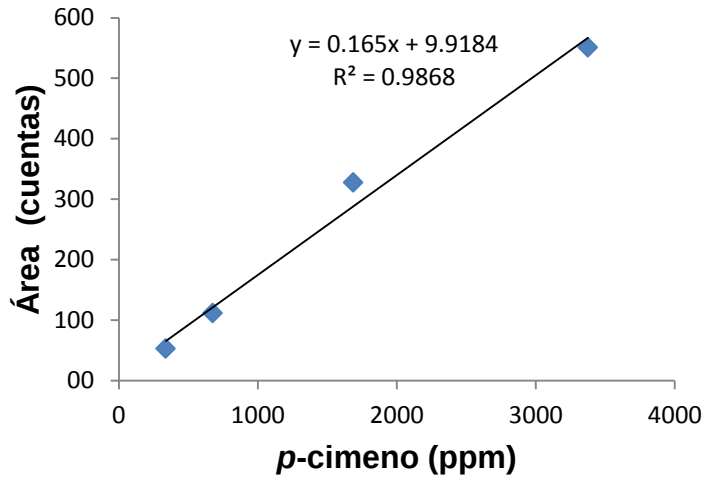
El método de **cuantificación externa**, en el cual se compara una propiedad del analito con la de estándares de concentración conocida del mismo analito, fue empleado para realizar tanto la estimación de la concentración de los constituyentes ($\mu\text{g/mL}$) de los AE disueltos en agua, así como de la concentración de cada compuesto puro cuando este fue disuelto en agua.

Para ello se construyeron “curvas de calibración”, de cada uno de los analitos de interés, así: Se prepararon soluciones stock para cada analito usando sustancias patrón y diclorometano como solvente. A partir de estas soluciones, se prepararon diluciones de concentraciones conocidas. Posteriormente se procedió a analizarlas por GC-FID bajo las mismas condiciones operacionales empleadas para el análisis de los AE y compuestos puros (Veasé, sección 1.7). Con los datos obtenidos, se construyeron las curvas de calibración (Áreas Vs. Concentración) para cada uno de los analitos de interés. Las curvas se ajustaron por regresión lineal teniendo en cuenta que la respuesta del detector en el rango de concentraciones preparadas fuera lineal. La recta de calibración está definida por una ecuación del tipo $y = mx + b$. Donde b representa la ordenada al origen, y m la pendiente. Para comprobar que la recta encontrada con los puntos experimentales para cada compuesto se ajusta al modelo matemático de la ecuación, se calculó el valor de: la ordenada al origen, la pendiente y el coeficiente de determinación R^2 de cada una. Finalmente, a partir de la ecuación de la recta obtenida con la curva de calibración de cada sustancia patrón, se calculó la concentración de los analitos en las muestras de concentración desconocida. Para esto, se despejó el valor de la concentración en la ecuación de la recta y se utilizó la medida de la señal correspondiente, en este caso, el área cromatográfica del pico de interés.

$$\text{Concentración (ppm)} = \frac{(A \pm b)}{m}$$

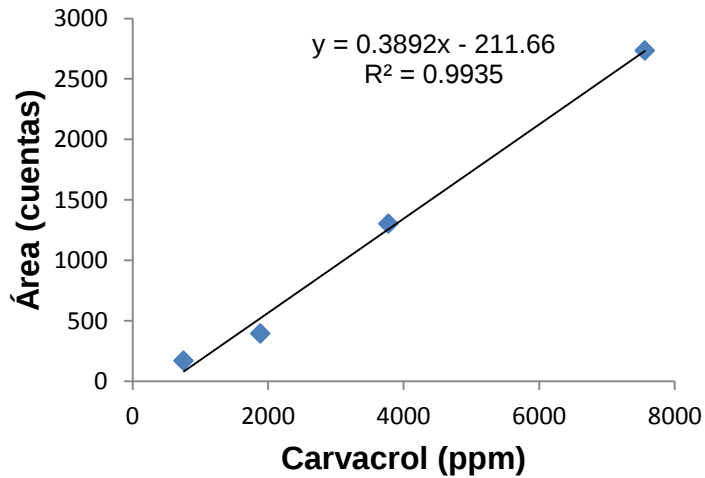
A = Área cromatográfica del pico de interés.
 b = Ordenada al origen.
 m = Pendiente

Figura C.1. Curva de calibración del *p*-cimeno, obtenida por GC-FID.



$$\text{Concentración } p - \text{cimeno (ppm)} = \frac{(\text{Área} - 9.9184)}{0.165}$$

Figura C.2. Curva de calibración del carvacrol, obtenida por GC-FID.



$$\text{Concentración carvacrol (ppm)} = \frac{(\text{Área} + 211.66)}{0.3892}$$

Figura C.3. Curva de calibración del citral, obtenida por GC-FID. El citral está compuesto por los isómeros neral y geranial.

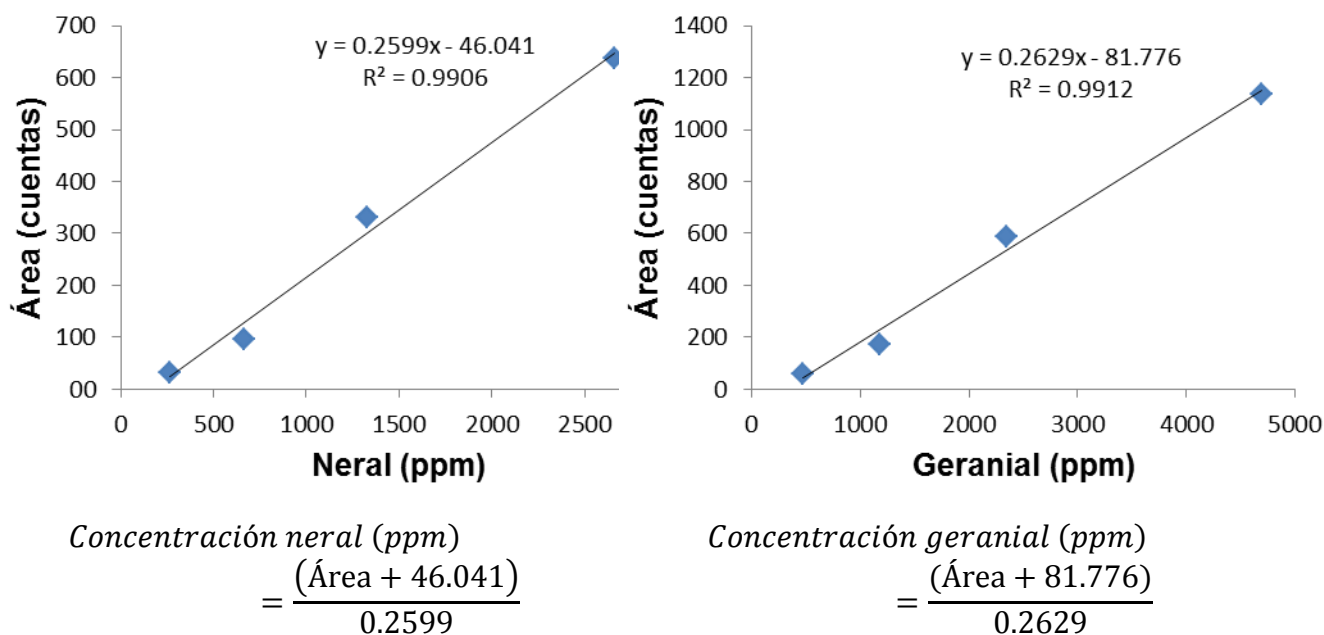


Figura C.4. Curva de calibración del geraniol, obtenida por GC-FID.

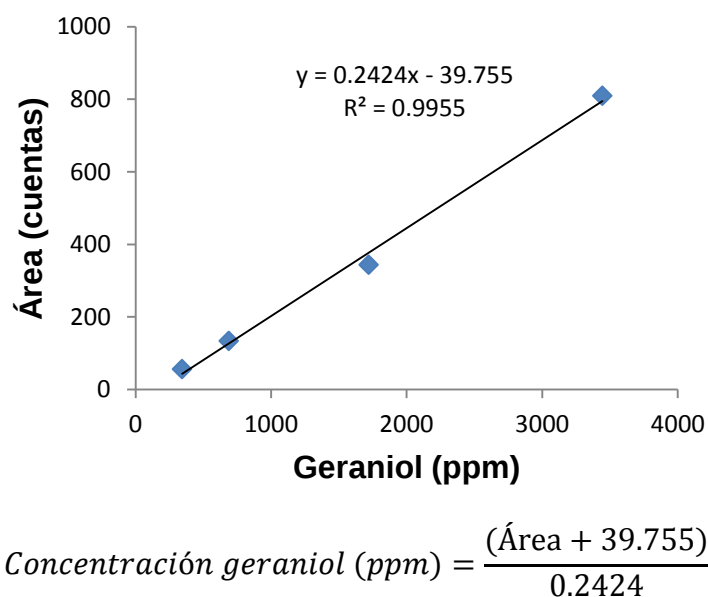
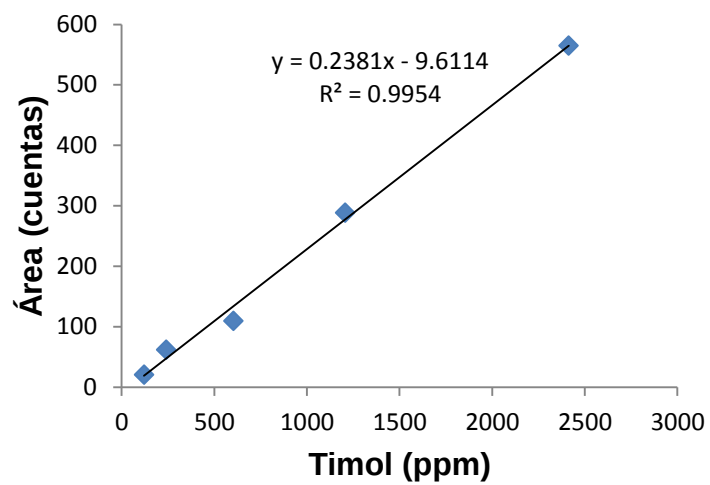


Figura C.5. Curva de calibración del timol, obtenida por GC-FID.



$$\text{Concentración timol (ppm)} = \frac{(\text{Área} + 9.6114)}{0.2381}$$

ANEXO D: Perfiles cromatográficos de los compuestos solubles en agua de los AE de especies del género *Lippia* obtenidos por MWHD. Se incluyen los compuestos de referencia usados para su identificación.

Figura D-1. *Lippia citriodora*.

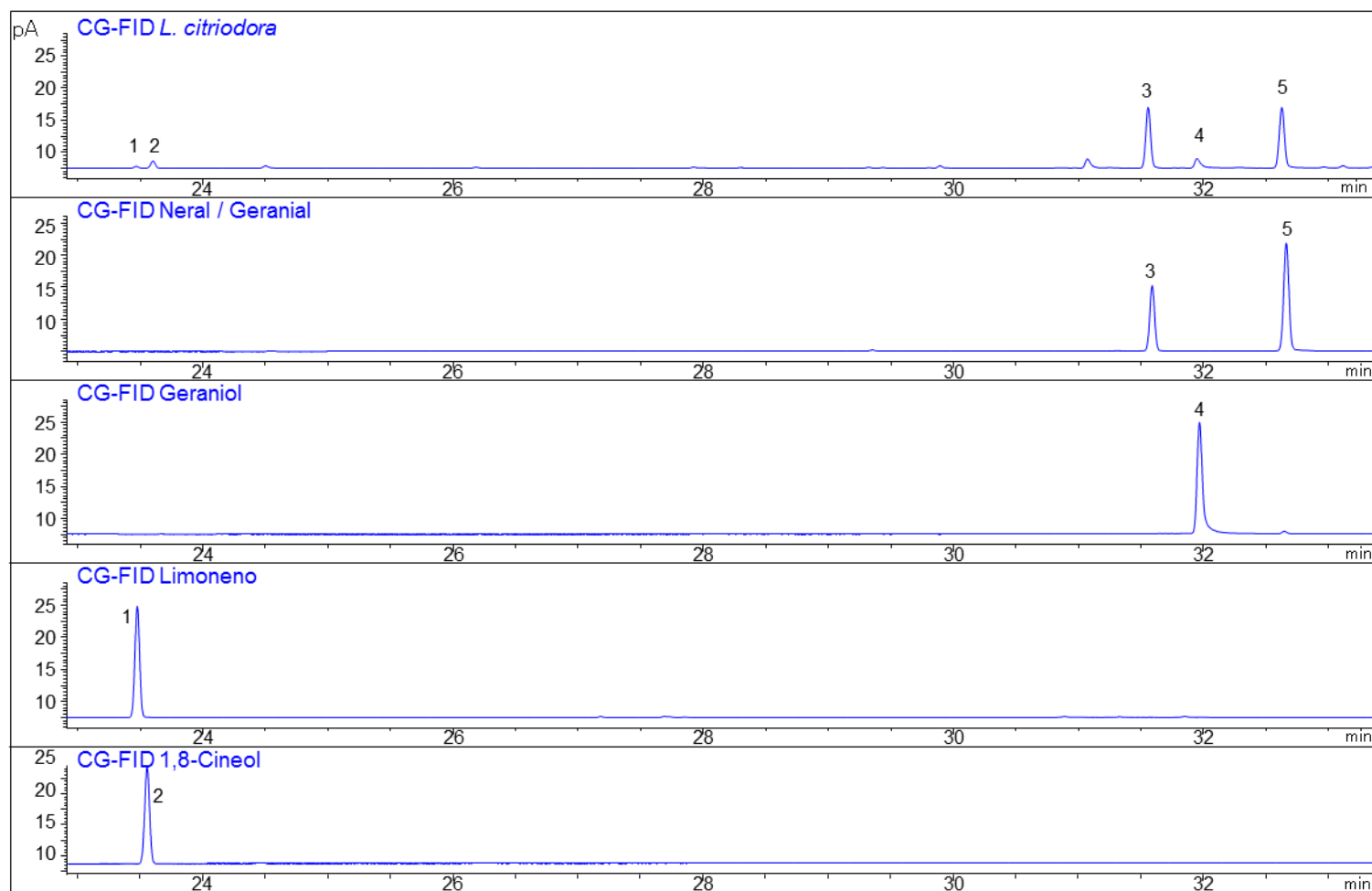


Figura D-2. *Lippia graveolens*.

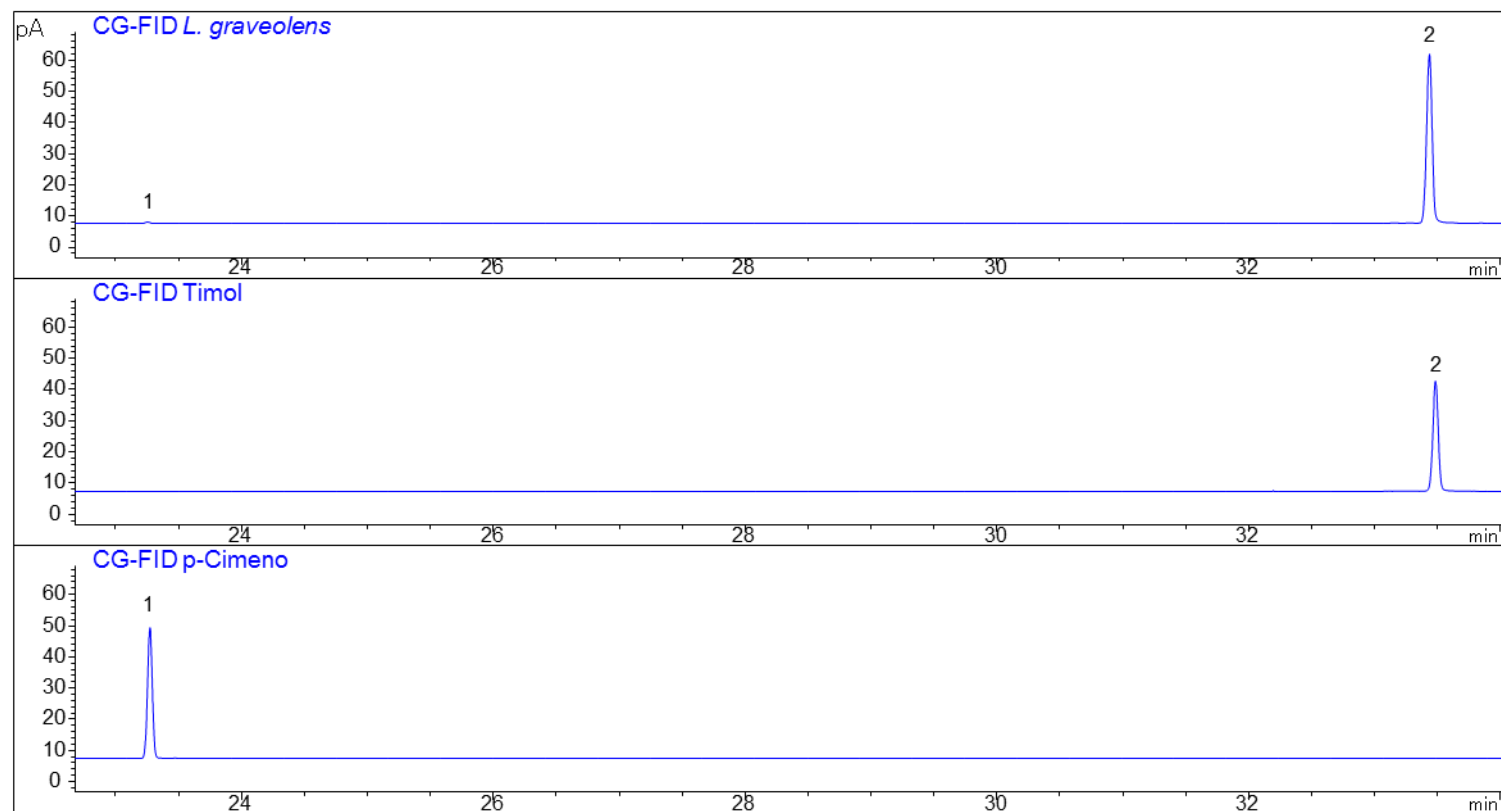


Figura D-3. *Lippia micromera*.

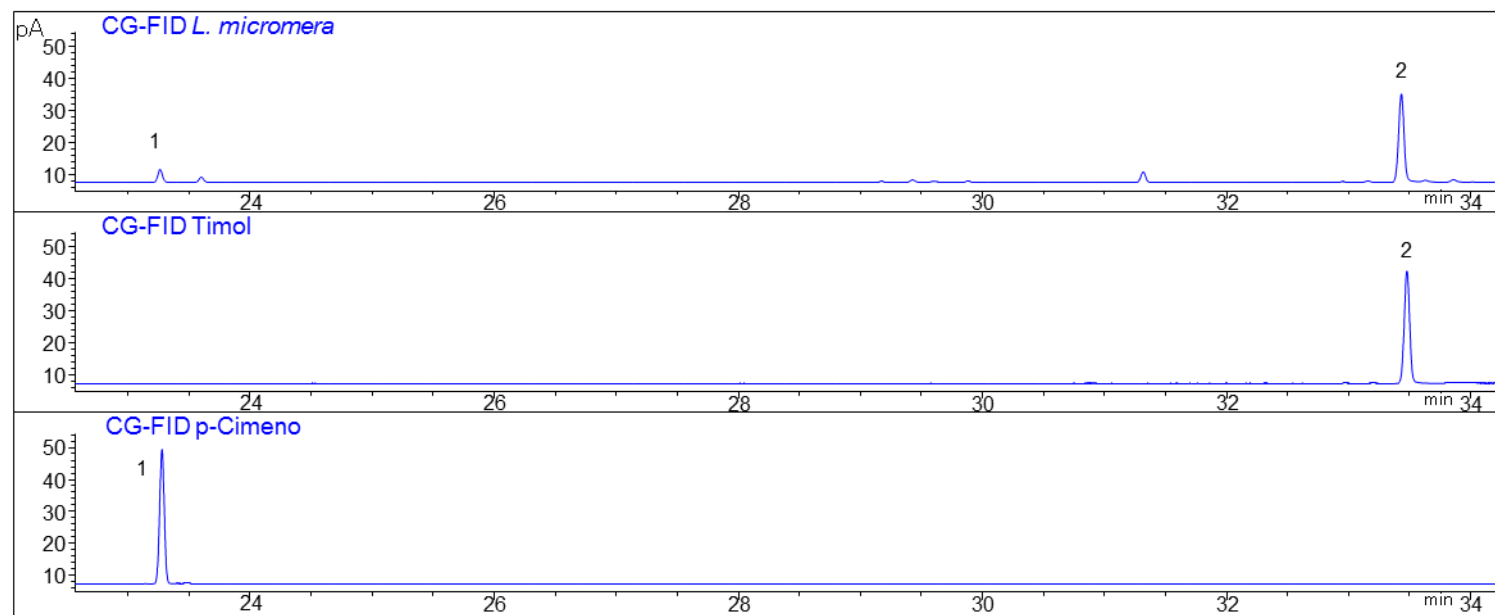


Figura D-4. *Lippia organoides* - quimiotipo carvacrol.

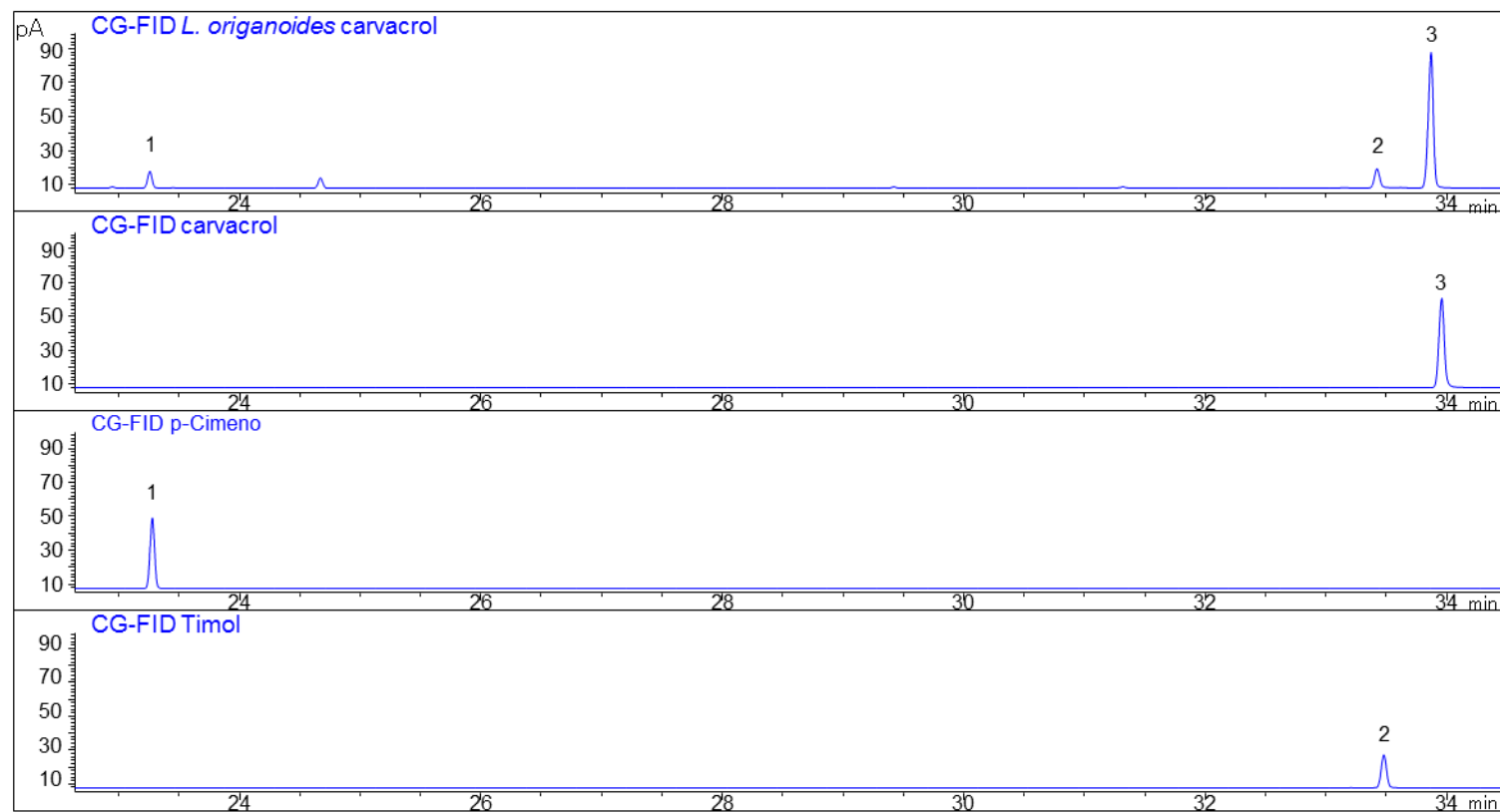
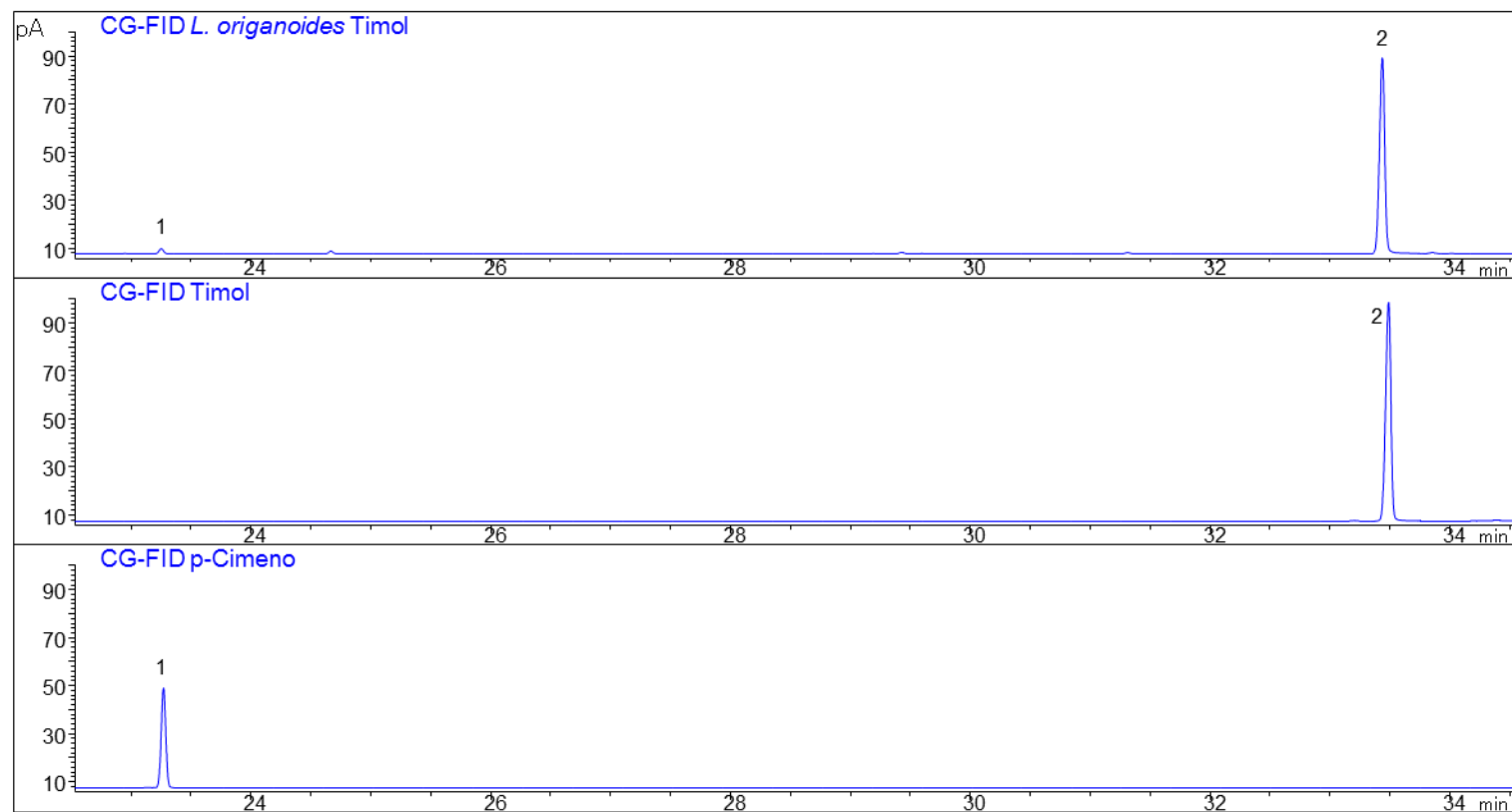


Figura D-5. *Lippia organoides* - quimiotipo timol.



ANEXO E: Detalle de la concentración de compuesto usada para cada mezcla evaluada.

	MC.1			MC.2			MC.3		
	Timol µg/mL	Carvacrol µg/mL	%IG	Timol µg/mL	p-Cimeno µg/mL	%IG	Carvacrol µg/mL	p-Cimeno µg/mL	%IG
A (1:1)	403.96	280.21	100.0	403.96	44.52	94.6	280.21	44.52	98.5
	201.98	140.11	100.0	201.98	22.26	93.8	140.11	22.26	98.9
	100.99	70.05	100.0	100.99	11.13	26.2	70.05	11.13	99.3
	50.50	35.03	34.8	50.50	5.57	0.0	35.03	5.57	0.0
	25.25	17.51	0.0	25.25	2.78	0.0	17.51	2.78	0.0
	12.62	8.76	0.7	12.62	1.39	0.0	8.76	1.39	0.0
	6.31	4.38	5.8	6.31	0.70	0.0	4.38	0.70	0.0
	3.16	2.19	17.3	3.16	0.35	0.0	2.19	0.35	0.0
B (3:1)	605.94	140.11	100.0	605.94	22.26	96.4	420.32	22.26	99.4
	302.97	70.05	100.0	302.97	11.13	97.2	210.16	11.13	96.9
	151.49	35.03	100.0	151.49	5.57	97.6	105.08	5.57	97.2
	75.74	17.51	92.9	75.74	2.78	99.1	52.54	2.78	0.0
	37.87	8.76	0.0	37.87	1.39	13.5	26.27	1.39	0.0
	18.94	4.38	0.0	18.94	0.70	0.0	13.14	0.70	0.0
	9.47	2.19	13.4	9.47	0.35	0.0	6.57	0.35	0.0
	4.73	1.09	3.8	4.73	0.17	6.6	3.28	0.17	0.0
C (1:3)	201.98	420.32	100.0	201.98	66.78	100.0	140.11	66.78	98.2
	100.99	210.16	100.0	100.99	33.39	96.0	70.05	33.39	99.3
	50.50	105.08	100.0	50.50	16.70	0.0	35.03	16.70	0.0
	25.25	52.54	2.8	25.25	8.35	0.0	17.51	8.35	0.0
	12.62	26.27	0.0	12.62	4.17	0.0	8.76	4.17	0.0
	6.31	13.14	0.0	6.31	2.09	0.0	4.38	2.09	0.0
	3.16	6.57	0.0	3.16	1.04	0.0	2.19	1.04	0.0
	1.58	3.28	0.0	1.58	0.52	18.5	1.09	0.52	0.5

MC: Mezcla de Compuestos, en diferentes proporciones **A** (1:1); **B** (3:1) y **C** (1:3). **µg/mL:** Concentración de los compuestos en la mezcla expresada en microgramos por mililitro. **%IG:** Porcentaje de inhibición de la genotoxicidad.