

**ESTUDIO DEL POTENCIAL ANTIGENOTÓXICO DE EXTRACTOS  
SUPERCRTICOS (SFT) DE ESPECIES VEGETALES DE LAS FAMILIAS  
ASTERACEAE, LABIATAE Y CAPPARACEAE FRENTE A RADIACIÓN  
ULTRAVIOLETA TIPOB.**

**DAIRO ARLEY FRANCO NIÑO**

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

**2018**

**ESTUDIO DEL POTENCIAL ANTIGENOTÓXICO DE EXTRACTOS SUPER  
CRITICOS DE ESPECIES VEGETALES DE LAS FAMILIAS ASTERACEAE,  
LABIATAE Y CAPPARACEAE FRENTE A RADIACIÓN ULTRAVIOLETA  
TIPOB.**

**DAIRO ARLEY FRANCO NIÑO**

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

**Director**

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

**Co-Director**

**ADRIANA GARCIA FORERO  
BIÓLOGA, M.Sc.**

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

**2018**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por la vida y su compañía.

Dedicado a mis padres y hermanos, son la fuerza que me motivaron en este camino llamado biología.

Profunda gratitud al Doctor Jorge Luis Fuentes, por la oportunidad de hacer parte de su laboratorio y su paciencia que no se equipara.

A mis compañeros de laboratorio y amigos en este andar, *“Si he visto más lejos es porque estoy sentado sobre los hombros de gigantes”*, Isaac Newton.

Especial agradecimiento a Laura Galvis, su incondicionalidad es semejante al amor de madre, gracias.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCIÓN	11
1. COMPETENCIAS DE LA PASANTÍA DE INVESTIGACIÓN	13
1.1 OBJETIVO GENERAL DEL PASANTE	13
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
2. MATERIALES Y MÉTODOS	14
2.1 REACTIVOS, SUSTRATOS Y MEDIOS DE CULTIVO	14
2.2 EXTRACTOS VEGETALES	14
2.3 PRINCIPIO DEL ENSAYO SOS CHROMOTEST	15
2.4 CEPA DE ENSAYO Y CONDICIONES DE CULTIVO	15
2.5 ENSAYO DE GENOTOXICIDAD	16
2.6 ENSAYOS ENZIMÁTICOS	17
2.6.1 Ensayo enzimático de $\beta$ -galactosidasa (BG)	17
2.6.2 Ensayo enzimático de fosfatasa alcalina (FA)	17
2.6.3 Criterio de genotoxicidad	18
2.7 ENSAYO DE ANTIGENOTOXICIDAD	19
2.7.1 Criterio de antigenotoxicidad	20
2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	20
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
3.1 GENOTOXICIDAD DE EXTRACTOS	21
4. CONCLUSIONES	30
5. RECOMENDACIONES	31
BIBLIOGRAFÍA	32

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Extractos analizados con código, familia y especie. F1 y F2 corresponden a fracciones.	16
<b>Tabla 2.</b> A.Asteraceae	21
<b>Tabla 3.</b> A1. Asteraceae	22
<b>Tabla 4.</b> A. Labiatae	22
<b>Tabla 5.</b> B1. Labiatae	23
<b>Tabla 6.</b> A. Capparaceae	23

## LISTA DE FIGURAS

Pág.

- Figura 1.** Porcentaje de la inhibición de la genotoxicidad (%IG), de los extractos pertenecientes a la familia Asteraceae. La línea de corte (puntos discontinuos) corresponde a los valores significativamente diferentes del %IG ( $P < 0.05$  en el test de Dunnet) con respecto al valor del control (%IG=0). 25
- Figura 2.** Porcentaje de la inhibición de la genotoxicidad (%IG), de los extractos pertenecientes a la familia Labiatae. La línea de corte (puntos discontinuos) corresponde a los valores significativamente diferentes del %IG ( $P < 0.05$  en el test de Dunnet) con respecto al valor del control (%IG=0). 26
- Figura 3.** Porcentaje de la inhibición de la genotoxicidad (%IG), del extracto perteneciente a la familia Capparaceae. La línea de corte (puntos discontinuos) corresponde a los valores significativamente diferentes del %IG ( $P < 0.05$  en el test de Dunnet) con respecto al valor del control (%IG=0). 28

## RESUMEN

**TITULO:** ESTUDIO DEL POTENCIAL ANTIGENOTÓXICO DE EXTRACTOS SÚPER CRÍTICOS DE ESPECIES VEGETALES DE LAS FAMILIAS ASTERACEAE, LABIATAE Y CAPPARACEAE FRENTE A RADIACIÓN ULTRAVIOLETA TIPOB.\*

**AUTOR:** DAIRO ARLEY FRANCO NIÑO.\*\*

**Palabras clave:** Extractos súper críticos, aceites esenciales, radiación ultravioleta, genotoxicidad, antigenotoxicidad, SOS chromotest.

### Descripción

La radiación ultravioleta tipo B (UVB) atraviesa la atmósfera y llega la Tierra en un 5%, con efectos a corto y largo plazo sobre la salud humana. A corto plazo, produce daños directos en el ADN, quemaduras, eritema, inflamación, pigmentación y formación de radicales libres. A largo plazo, los efectos son fotodermatosis, inmunosupresión, envejecimiento prematuro y carcinogénesis. El uso de bloqueadores solares es una medida útil para prevenir dichos tumores cancerígenos. Recientemente se han investigado aceites esenciales, extractos de plantas y compuestos vegetales, los cuales han resultado ser importantes genoprotectores. En el presente trabajo se evaluó el efecto genotóxico y potencial antigenotóxico de extractos obtenidos a partir de cinco (5) muestras vegetales pertenecientes a la familia Asteraceae, BIO-AT-sa-S29E, BIO-AT-sa-S31E, BIO-AT-sa-S33E, BIO-AT-sa-S35E, BIO-AT-sa-S39E, cinco (5) extractos de la familia Labiatae, BIO-LT-ar-S05E(F1), BIO-LT-ar-S05E(F2), BIO-LT-ar-S07E(F1), BIO-LT-ar-S07E(F2), BIO-LT-ar-S08E(F1), y una (1) muestra de la familia Capparaceae UN-109-F1. La familia Labiatae cuenta con fracciones las cuales corresponden a F1 y F2 dado su protocolo de extracción. La genotoxicidad y antigenotoxicidad de estos extractos fue determinada empleando diseños experimentales de co-tratamiento utilizando el ensayo bacteriano SOS chromotest, el cual permite medir de manera indirecta el daño causado al ADN. El extracto obtenido de la familia Capparaceae UN-109-F1 exhibió actividad antigenotóxica, postulándose como un compuesto potencialmente fotoprotector.

---

\*Trabajo de grado

\*\* Universidad Industrial de Santander, Facultad De Ciencias Básicas, Escuela De Biología.  
Director: FUENTES LORENZO, Jorge Luis. Microbiólogo, PH.D

## ABSTRACT

**TITLE:** STUDY OF THE ANTIGENOTOXIC POTENTIAL OF SUPER-CRITICAL EXTRACTS OF VEGETABLE SPECIES OF THE ASTERACEAE, LABIATAE AND CAPPARACEAE FAMILIES AGAINST TYPE B ULTRAVIOLET RADIATION.\*

**AUTHOR:** DAIRO ARLEY FRANCO NIÑO\*\*

**Keywords:** supercritical extracts, essential oils, ultraviolet radiation, genotoxicity, antigenotoxicity, SOS Chromotest, Photoprotection, Asteraceae, Labiatae, Capparaceae

### **Description.**

Approximately 5% of ultra violet radiation type B (UV-B) crosses the atmosphere and reaches Earth's surface, causing short and long-term effects on human health. In the short term, it produces direct damage on DNA, burns, erythema, inflammation, skin pigmentation and formation of free radicals. In the long term, the effects are photodermatosis, immunosuppression, premature aging and carcinogenesis. The use of sun screens is a useful measure to prevent such cancerous tumors. Recently, essential oils, plant extracts and plant compounds have been investigated, which have proven to be important genoprotectors. In the present research we evaluated the genotoxic effect and antigenotoxic potential of extracts obtained from 5 plant samples belonging to the Asteraceae family, BIO-AT-sa-S29E, BIO-AT-sa-S31E, BIO-AT-sa-S33E, BIO-AT-SA-S35E, BIO-AT-SA-S39E, 5 extracts of the Labiatae family, BIO-LT-AR-S05E (F1), BIO-LT-AR-S05E (F2), BIO-LT-ar-S07E (F1), BIO-LT-ar-S07E (F2), BIO-LT-ar-S08E (F1), and one sample of the Capparaceae family, UN-109-F1. The genotoxicity and antigenotoxicity of these extracts were determined through experimental co-treatment designs using the bacterial SOS Chromotest assay, which indirectly measures the damage caused to DNA. The extract obtained from the Capparaceae family UN-109-F1 exhibited antigenotoxic activity, indicating its potential as a photoprotective compound.

---

\*Degree Paper

\*\* Universidad Industrial de Santander, Facultad De Ciencias Básicas, Escuela De Biología.  
Director: FUENTES LORENZO, Jorge Luis. Microbiólogo, PH.D

## INTRODUCCIÓN

El cáncer, después de las enfermedades cardiovasculares, se posiciona como la segunda causa de muerte a nivel mundial (De Flora, 1998). Entre los distintos tipos de cáncer, el cáncer de piel es de gran preocupación debido a que su incidencia va en aumento (Espey *et al.*, 2007; Purdue *et al.*, 2008; Zaidi *et al.*, 2008). La sobreexposición a la radiación solar es considerada el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de piel, dado que esta puede producir daños en el ADN que actúan como un iniciador de procesos cancerígenos (Zaidi *et al.*, 2008; Gallagher & Lee, 2006). De esta manera, es claro que el aumento de patologías cutáneas se debe a la sobreexposición a la UV solar sin la debida protección y, posiblemente, al aumento de los niveles de irradiación solar en la tierra como una consecuencia del deterioro gradual de la capa de ozono (Madronich *et al.*, 1998; Ichihashi *et al.*, 2003; Matsumura & Ananthaswamy, 2004; Gallagher & Lee, 2006; Zaidi *et al.*, 2008).

Con el objetivo de disminuir los efectos adversos de la sobreexposición a radiación solar, la principal herramienta ha sido el desarrollo de estrategias de prevención (Morse & Stoner, 1993). Siendo una de ellas la búsqueda de compuestos naturales con actividad quimiopreventiva o fotoprotectora, es decir, con capacidad de prevenir, contrarrestar o estimular la reparación del daño genético causado por la UV (Jirova *et al.*, 2007, Hazane *et al.*, 2006). Las familias de plantas Asteraceae, Labiatae y Capparaceae se seleccionaron como fuente promisoría de compuestos fotoprotectores dado que sus compuestos han demostrado tener propiedades anti-oxidantes, anti-inflamatorias, anti-genotóxicas y anti-cancerígenas (Afaq y Katiyar, 2011; Bakkaliet *al.*, 2008; Gilaberte & González, 2010; Light *et al.*, 2005; Nichols y Katiyar, 2010; Saikia *et al.*, 2006; Yesilada, 2005); las cuales pueden resultar relevantes para la fotoprotección de la piel. Un claro ejemplo de esto, son

algunos polifenoles de las plantas para los que se tienen reportes de propiedades quimiopreventivas y que posteriormente se probaron de forma tópica como fotoprotectores, demostrando que pueden absorber la UV evitando que esta penetre en la piel y cause daño (Nichols & Katiyar, 2010).

Como se evidenció, existe la necesidad de encontrar plantas y compuestos con potencial fotoprotector que contribuyan a disminuir la incidencia de procesos carcinogénicos en piel, así como controlar el fotoenvejecimiento. Por ello, el pasante vinculado al proyecto de investigación evaluará las propiedades antigenotóxicas frente a la radiación ultravioleta tipo B (UVB), de extractos de plantas de las familias Asteraceae, Labiatae y Capparaceae, empleando el ensayo SOS Chromotest (Quillardet *et al.*, 1982). Para esto, se realizarán diseños experimentales de co-tratamientos (Fuentes *et al.*, 2006), donde las bacterias se expondrán simultáneamente a los extractos y luz UV-B. Se espera identificar extractos de plantas propiedades antigenotóxicas frente a UV-B; usando como criterio el correspondiente porcentaje de inhibición de la genotoxicidad (%IG).

## **1. COMPETENCIAS DE LA PASANTÍA DE INVESTIGACIÓN**

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

### **1.1 OBJETIVO GENERAL DEL PASANTE**

Evaluar el potencial antigenotóxico frente a UVB de 11 extractos súper críticos de especies vegetales de las familias Asteraceae (5), Labiatae (5) y Capparaceae (1) utilizando el ensayo SOS Chromotest.

### **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar el efecto genotóxico de 11 extractos súper críticos de plantas en el ensayo SOS Chromotest.
- Evaluar el potencial antigenotóxico frente a UVB de los 11 extractos de plantas empleando el ensayo SOS Chromotest.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 REACTIVOS, SUSTRATOS Y MEDIOS DE CULTIVO**

Tanto el medio de cultivo Luria-Bertani (LB) como los sustratos para las enzimas  $\beta$ -galactosidasa (2-nitrofenil- $\beta$ -D- galactopiranosido, ONPG) y fosfatasa alcalina (4-nitrofenilfosfato, PNPP), fueron adquiridos de la casa comercial Amresco (Solon, Ohio, USA). El mutágeno 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO) de la casa comercial Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, USA); los demás reactivos fueron obtenidos de las casas comerciales J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA) o Merck (Kenilworth, NJ, USA).

### **2.2 EXTRACTOS VEGETALES**

Los once extractos súper críticos utilizados en el estudio fueron obtenidos a partir de diferentes familias de plantas: cinco de especies de la familia Asteraceae, tres de especies de la familia Labiatae y una de una especie de la familia Capparaceae. Los códigos y familias a la que corresponden se encuentran especificados en la Tabla1. Todos los extractos fueron suministrados por el Centro de Investigación en Biomoléculas (CIBIMOL), obtenidos en el marco del proyecto Bio-Red-CO-CENIVAMNo.RC-0572-2012. Estos extractos fueron elaborados a partir de las hojas y flores frescas por medio de la técnica de extracción de fluidos súper críticos (CO<sub>2</sub>) (Stashenko, *et al.*, 2013). Las extracciones fueron realizadas a presión de 500 bar, pero en el caso de las fracciones F1 y F2 se realizaron a 40 y 80 bar respectivamente. Cada extracto se diluyó en metanol a razón de 30mg/ml como concentración stock y se conservó a 8°C en tubos Eppendorf siempre protegidos de la luz dado que podría causar fotolisis.

### 2.3 PRINCIPIO DEL ENSAYO SOS CHROMOTEST

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

### 2.4 CEPA DE ENSAYO Y CONDICIONES DE CULTIVO

Una alícuota de la cepa *Escherichiacoli*PQ37, genotipo (*F*, *thr*, *leu*, *his-4*, *pyrD*, *thi*, *galE*, *galKgalT*, *lac* $\Delta$ *U169*, *srl300::Tn10*, *rpoB*, *rpsL*, *rfa*, *trp::Muc+sfiA::Mud* (*Ap*, *lac*) *cts*) se dejó creciendo en medio Luria-Bertani (LB) (10 g triptona, 10 g cloruro de sodio, 5 g extracto de levadura, pH 7.4) suplementado con ampicilina (50 $\mu$ g/ml) y tetraciclina (17 $\mu$ g/ml) a una temperatura de 37 °C con agitación permanente (170 rpm) durante 15-16 horas. Al día siguiente se realizó una resiembra en medio fresco adicionando 2 mL del medio crecido en 20 mL de medio LB, el cual se dejó crecer bajo las condiciones experimentales descritas anteriormente un tiempo aproximado de una hora, hasta que alcanzó una densidad óptica DO<sub>600nm</sub> de 0.4.

**Tabla 1.** Extractos analizados con código, familia y especie. F1 y F2 corresponden a fracciones.

<b>Código</b>	<b>Familia</b>	<b>Especie</b>
BIO-AT-sa-S29E	Asteraceae	<i>Wedelia calycina</i>
BIO-AT-sa-S31E	Asteraceae	<i>Tagetes caracasana</i>
BIO-AT-sa-S33E	Asteraceae	<i>Ambrosia peruviana</i>
BIO-AT-sa-S35E	Asteraceae	<i>Achyrocline satureioides</i>
BIO-AT-sa-S39E	Asteraceae	<i>Ageratina popayanensis</i>
BIO-LT-ar-S05E(F1)	Labiatae	<i>Hyptis brachiata</i>
BIO-LT-ar-S05E(F2)	Labiatae	<i>Hyptis brachiata</i>
BIO-LT-ar-S07E(F1)	Labiatae	<i>Hyptis sinuata</i>
BIO-LT-ar-S07E(F2)	Labiatae	<i>Hyptis sinuata</i>
BIO-LT-ar-S08E(F1)	Labiatae	<i>Hyptis suaveolens</i>
UN-109-F1	Capparaceae	<i>Capparis flexuosa</i>

## 2.5 ENSAYO DE GENOTOXICIDAD

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

## 2.6 ENSAYOS ENZIMÁTICOS

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

**2.6.1 Ensayo enzimático de  $\beta$ -galactosidasa (BG).** En cada pozo se dispensaron 135  $\mu$ l de buffer Z ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  3,22 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  1,1 g, KCl 0,15 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,05 g, SDS 0,2 g,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,54 ml, pH 7,0) y se añadieron 15  $\mu$ l de células de cada tratamiento. Esta mezcla se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la lisis celular. Posteriormente, se adicionaron 30  $\mu$ l de la solución Stock del sustrato  $\beta$ -galactosidasa (orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido, ONPG) la cual se preparó a 4 mg/ml en buffer fosfato de sodio (1,42 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M, 1,38 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  0,1 M, pH 8,8) y se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente para el desarrollo del color. La reacción se detuvo añadiendo 100  $\mu$ l de la solución  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1 M) y se realizó la lectura de la microplaca a una densidad óptica  $\text{DO}_{420\text{nm}}$  en el espectrofotómetro de UV/visible Thermo Scientific Multiskan GO.

**2.6.2 Ensayo enzimático de fosfatasa alcalina (FA).** En cada pozo de dispensaron 135  $\mu$ l de buffer T (TRIS 24,22 g y SDS 0,2 g, pH 8,8) y se añadieron 15  $\mu$ l de células de cada tratamiento; se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la lisis celular. Posteriormente, se adicionaron 30  $\mu$ l de la solución Stock del sustrato de la fosfatasa alcalina (4-nitrofenil fosfato, PNPP) el cual se preparó a 4 mg/mL en buffer T, y se incubó durante 40 minutos para el desarrollo del color. La reacción se detuvo añadiendo 50  $\mu$ l de la solución HCl (2,5 M) y cinco minutos después se le agregaron 50  $\mu$ l de la solución TRIS (2 M).

Finalmente se realizó la lectura de la microplaca como se describió en el ensayo de BG.

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

### Ecuación 1

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

**A<sub>420</sub>**: medida de la densidad óptica de la mezcla de la incubación medida a 420nm.  
**t**: tiempo de incubación en presencia del sustrato en minutos

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

### Ecuación 2

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

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

### Ecuación 3

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

**R<sub>t</sub>**: Células tratadas  
**R<sub>nt</sub>**: Células no tratadas

La interpretación de valores se realizó considerando lo siguiente: i) “no genotóxico”, valores de FI menores de 1,5 ii) “inconclusos”, valores de FI entre

1,5–2,0 y iii) “genotóxico”, valores mayores de 2,0 y una clara relación dosis-efecto.

## **2.7 ENSAYO DE ANTIGENOTOXICIDAD**

Una vez realizados los análisis de genotoxicidad, para aquellos compuestos que no presentaron efecto genotóxico se realizó el ensayo de antígenotoxicidad. El efecto antígenotóxico de los AE frente a R-UVB se evaluó en el ensayo SOS Chromotest (Quillardet *et al.*, 1982), empleando diseños experimentales de co-tratamiento. En estos las células fueron expuestas simultáneamente a diferentes concentraciones de la fracción acuosa del compuesto a evaluar y a la dosis de R-UVB previamente determinada en el LMMA, siguiendo el protocolo propuesto por Fuentes y colaboradores (2006).

El cultivo fresco crecido hasta una densidad óptica DO<sub>600nm</sub> de 0,4 fue diluido cinco veces en medio LB 2X, esta dilución se distribuyó a razón de 600 µl en tubos de microcentrífuga que contenían igual volumen de las diluciones del extracto en estudio. Posteriormente 1 ml de la mezcla fue depositado en cajas petri para realizar la irradiación a una dosis de 0.001 J/m<sup>2</sup>. Las células en las cajas Petri se irradiaron en una cabina de irradiación BS-02 (Opsytec, DrGröbel, Alemania) equipada con cuatro lámparas de R-UVB y con un controlador de irradiación tipo UV-MAT (Opsytec, DrGröbel, Alemania). Posterior a la irradiación se tomó una alícuota de cada co-tratamiento en tubos de microcentrífuga y se incubaron por 30 minutos a una temperatura entre 4-8 °C y posteriormente durante dos horas a 37 °C con agitación permanente (300 rpm) en el Thermomixer Comfort (Eppendorf, Alemania). En todos los casos, se realizaron al menos tres experimentos independientes con cuatro replicas cada uno. En cada experimento se incluyó un control negativo (C- células sin irradiar mezcladas con agua

destilada estéril) y un control positivo (C+ células irradiadas mezcladas con agua destilada estéril).

**2.7.1 Criterio de antigenotoxicidad.** Como criterio de antigenotoxicidad se usó el porcentaje de inhibición de la genotoxicidad (%IG). Este se mide como una reducción significativa del factor de inducción (FI) y representa la capacidad de la sustancia ensayada de proteger el material genético cuando se irradia con luz UV-B se calcula para cada tratamiento según la siguiente ecuación:

#### Ecuación 4

$$\%IG = \frac{Ico - Ibasal}{Iuv - Ibasal}$$

<p><b>Ico:</b> factor de inducción SOS de los cotratamientos (células + extracto vegetal + RUVB). <b>Ibasal:</b> factor de inducción SOS del control negativo. <b>Iuv:</b> factor de inducción SOS del control positivo.</p>
--

## 2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

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

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 GENOTOXICIDAD DE EXTRACTOS

En la tabla 2, se indican los resultados obtenidos mediante el ensayo SOS Chromotesten la evaluación de la genotoxicidad de los extractos analizados. Los extractos mostraron valores promedio de FI < 2; no hay correlación entre las diluciones y el FI, indicando que ningún extracto es genotóxico.

**Tabla 2.** A.Asteraceae

[µg/ml]	BIO-Atsa-S29E	BIO-Atsa S31E
<b>C-</b>	1 ± 0,3	1 ± 0,1
<b>C+</b>	6,8 ± 1,8	4,8 ± 0,7
<b>938</b>	0,8 ± 0,1***	0,6 ± 0,1**
<b>469</b>	0,9 ± 0,1***	0,5 ± 0,1*
<b>234</b>	0,9 ± 0,2**	0,6 ± 0,2*
<b>117</b>	0,7 ± 0,3	0,8 ± 0,2
<b>58</b>	1 ± 0,2	0,8 ± 0,2
<b>29</b>	1 ± 0,2	0,6 ± 0,4
<b>15</b>	1,1 ± 0,3	1 ± 0,1*
<b>7</b>	1 ± 0,3	1 ± 0,1
<b>4</b>	1,3 ± 0,1	0,8 ± 0,4

**Tabla 3.A1. Asteraceae**

<b>[µg/ml]</b>	<b>BIO-Atsa-S33E</b>		<b>BIO-Atsa-S35E</b>		<b>BIO-Atsa-S39E</b>	
<b>C-</b>	1	± 0,1	1	± 0,1	1	± 0,1
<b>C+</b>	4	± 0,8	4,4	± 0,4	4,9	± 0,7
<b>938</b>	0,5	± 0	0,7	± 0	0,8	± 0,1
<b>469</b>	0,5	± 0,1**	0,6	± 0,1**	0,7	± 0,1*
<b>234</b>	0,6	± 0,1**	0,7	± 0,1**	0,6	± 0**
<b>117</b>	0,6	± 0,1**	0,8	± 0,1**	0,8	± 0,1**
<b>58</b>	0,8	± 0,1*	0,9	± 0,1**	0,9	± 0,1**
<b>29</b>	0,8	± 0,1	0,9	± 0,1	1	± 0,1*
<b>15</b>	0,9	± 0,1	0,9	± 0,1	1	± 0,1
<b>7</b>	0,8	± 0,1	0,9	± 0,1*	1,1	± 0,1
<b>4</b>	0,9	± 0,1*	1,1	± 0,1	0,9	± 0,1

Valores promedio del factor de inducción SOS (FI) los extractos pertenecientes a la familia Asteraceae (A, A1). En tres experimentos independientes con cuatro replicas cada uno.\* Reducción significativa ( $p < 0,05$ ) con respecto al control positivo encontrado en la prueba de Dunnett.

**Tabla 4. A. Labiatae**

<b>[µg/ml]</b>	<b>BIO-LTarS05E(F1)</b>		<b>BIO-LTarS05E(F2)</b>	
<b>C-</b>	1	± 0,1	1	± 0,1
<b>C+</b>	3,4	± 0,6	4,1	± 0,7
<b>938</b>	0,6	± 0,1***	0,7	± 0,1**
<b>469</b>	0,8	± 0,1**	0,7	± 0,1***
<b>234</b>	0,8	± 0,1**	0,7	± 0,1**
<b>117</b>	0,9	± 0,1	0,9	± 0,2
<b>58</b>	0,9	± 0,1	0,9	± 0,1
<b>29</b>	1,1	± 0,2	1	± 0,1
<b>15</b>	1	± 0,2	0,9	± 0,2
<b>7</b>	1,1	± 0,3	1	± 0,2
<b>4</b>	1	± 0,1	1	± 0,1

Tabla 5. B1. Labiatae

[µg/ml]	BIO-LTarS07E(F1)		BIO-LTarS07E(F2)		BIO-LTarS08E(F1)	
<b>C-</b>	1	± 0,1	1	± 0,1	1	± 0,1
<b>C+</b>	5,5	± 0,9	6	± 1	5	± 1,1
<b>938</b>	0,7	± 0,1***	0,8	± 0,7	0,7	± 0,1***
<b>469</b>	0,6	± 0,1***	0,7	± 1,1	0,6	± 0,1***
<b>234</b>	0,8	± 0,1**	0,9	± 1,1	0,7	± 0,1**
<b>117</b>	0,9	± 0,2	0,9	± 0,9	0,8	± 0,2
<b>58</b>	1,1	± 0,1	0,6	± 1,1	1	± 0,2
<b>29</b>	1,1	± 0,2	0,9	± 1,7	1	± 0,2
<b>15</b>	1,1	± 0,1	1	± 0,9	1	± 0,3
<b>7</b>	1,1	± 0,1	1	± 0,8	0,9	± 0,2
<b>4</b>	1,2	± 0,2	1	± 1,1	1,2	± 0,2

Valores promedio del factor de inducción SOS (FI) los extractos pertenecientes a la familia Labiatae (B, B1). En tres experimentos independientes con cuatro replicas cada uno.\* Reducción significativa ( $p < 0,05$ ) con respecto al control positivo encontrado en la prueba de Dunnett.

Tabla 6. A. Capparaceae

[µg/ml]	UN 109 F1	
<b>C-</b>	1	± 0,3
<b>C+</b>	3,8	± 1,4
<b>938</b>	0,6	± 0,2***
<b>469</b>	0,3	± 0,2***
<b>234</b>	0,5	± 0,2***
<b>117</b>	0,8	± 0,2***
<b>58</b>	1	± 0,2***
<b>29</b>	0,9	± 0,1
<b>15</b>	1	± 0,2
<b>7</b>	1	± 0,2*
<b>4</b>	1,1	± 0,1*

Valores promedio del factor de inducción SOS (FI) el extracto perteneciente a la familia Capparaceae (C). En tres experimentos independientes con cuatro replicas

cada uno.\* Reducción significativa ( $p < 0,05$ ) con respecto al control positivo encontrado en la prueba de Dunnett.

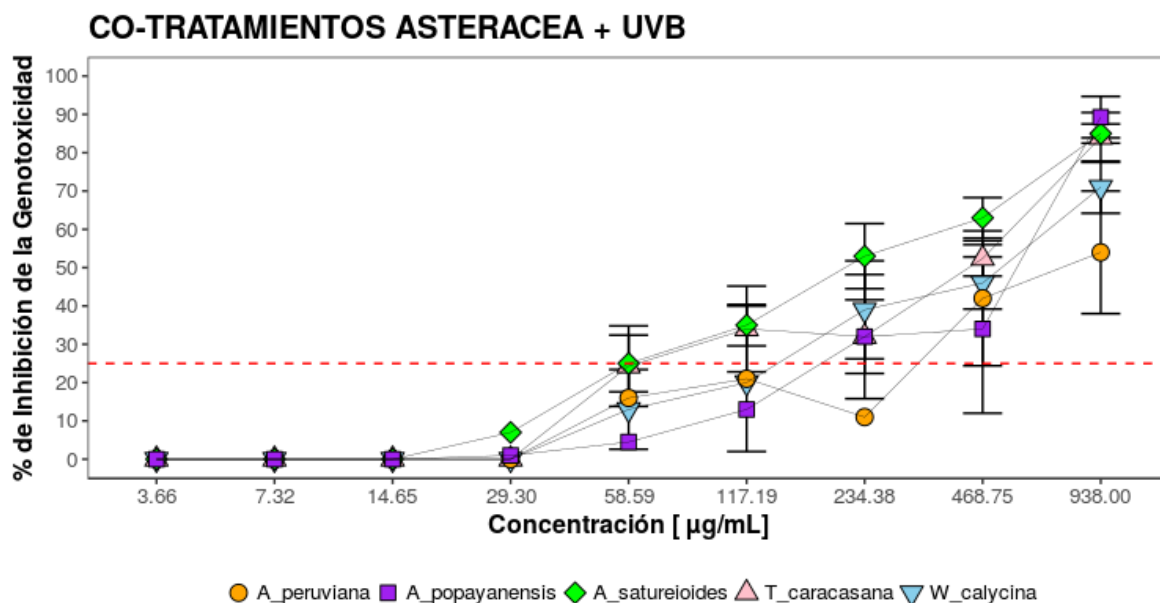
Ninguno de los extractos evaluados mostró incrementos significativos respecto al control no tratado. Por el contrario, las dosis más altas de algunos extractos resultaron significativamente inferiores al control. Con estos resultados negativos para la genotoxicidad de los extractos, se procedió a evaluar el potencial antigenotóxico ante daño causado por luz ultravioleta tipo B (UVB).

### **Antigenotoxicidad de extractos**

#### **Familia Asteraceae**

Las especies evaluadas de la familia Asteraceae con su respectivo código fueron: *Wedelia calycina* BIO-AT-sa-S29E, *Tagetes caracasana* BIO-AT-sa-S31E, *Ambrosia peruviana* BIO-AT-sa-S33E, *Achyrocline satureioides* BIO-AT-sa-S35E y *Ageratina aff popayanensis* BIO-AT-sa-S39E. Basado en los valores de las concentraciones mínimas que inhiben la genotoxicidad, el potencial antigenotóxico frente a UVB para la familia Asteraceae fue así: *Achyrocline satureioides* (59  $\mu\text{g/mL}$ ) > *Tagetes caracasana* (117  $\mu\text{g/mL}$ ) > *Ageratina aff popayanensis* (234  $\mu\text{g/mL}$ ) > *Wedelia calycina* (234  $\mu\text{g/mL}$ ) > *Ambrosia peruviana* (469  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 1).

**Figura 1.** Porcentaje de la inhibición de la genotoxicidad (%IG), de los extractos pertenecientes a la familia Asteraceae. La línea de corte (puntos discontinuos) corresponde a los valores significativamente diferentes del %IG ( $P < 0.05$  en el test de Dunnett) con respecto al valor del control (%IG=0).

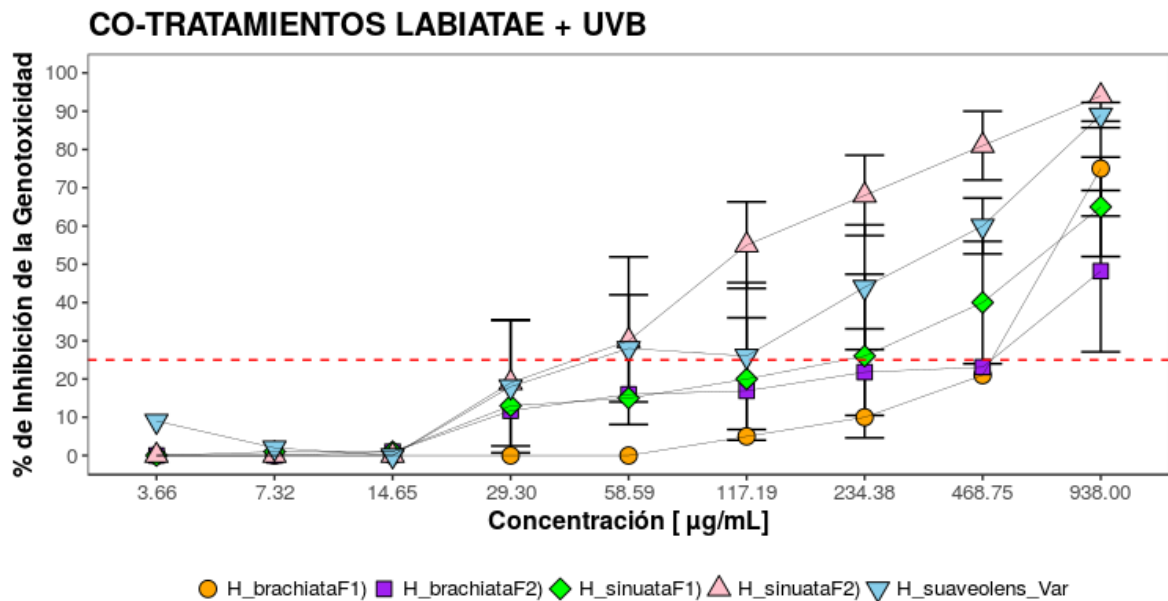


Asteraceae conforma la familia más grande de plantas con flores del planeta, incluye más de 1,600 géneros y 23,000 especies individuales. Muchos miembros de la familia Asteraceae son importantes para fines medicinales (Hurelly Puentes 2013), ornamentales y económicos (Gao *et al.*, 2010). La relevancia que posee este grupo de plantas ha promovido diferentes estudios de citotoxicidad y genotoxicidad (Josivany *et al.*, 2014; Delarmelina 2012). No obstante, se han probado diferentes extractos de las inflorescencias de *Achyrocline satureioides* encontrando que posee actividad antiinflamatoria, analgésica, antiespasmódica, constipante y sedantes (Olivera *et al.*, 1988). *Tagetes caracasana* es una especie de gran importancia económica en la medicina tradicional y en la industria para obtención de aceites esenciales (Barrientos *et al.*, 2012).

## Familia Labiatae

En total se analizaron cinco extractos de la familia Labiatae, pertenecientes a tres especies puesto que de las especies *Hyptis brachiata*, *Hyptis sinuata* se analizaron dos fracciones obtenidas a diferentes presiones denotándose con F1 y F2, La tercera especie analizada fue *Hyptis suaveolens* Var BIO-LT-ar-S08E (F1). De acuerdo a los valores de las concentraciones mínimas que inhiben la genotoxicidad, el potencial antigenotóxico frente a UVB para la familia Labiatae fue como sigue: *Hyptis suaveolens* Var (59 µg/mL) > *Hyptis sinuata* (F2) (59 µg/mL) > *Hyptis sinuata* (F1) (234µg/mL) > *Hyptis brachiata* (F2) (938µg/mL) > *Hyptis brachiata* (F1) (938 µg/mL) (Figura 2).

**Figura 2.** Porcentaje de la inhibición de la genotoxicidad (%IG), de los extractos pertenecientes a la familia Labiatae. La línea de corte (puntos discontinuos) corresponde a los valores significativamente diferentes del %IG ( $P < 0.05$  en el test de Dunnet) con respecto al valor del control (%IG=0).



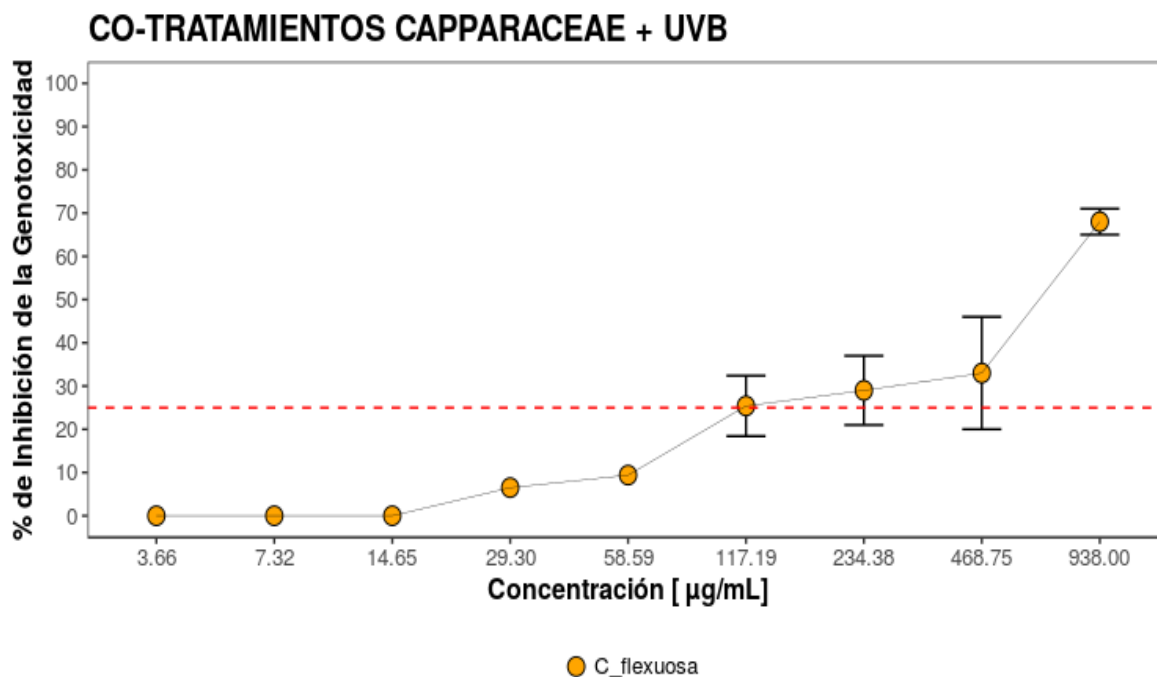
La familia Lamiaceae o Labiatae (Ramasubramania, 2012) se encuentra ampliamente distribuidas en todo el mundo, comprende alrededor de 221 géneros y 6000 especies (Chengyih & Hsiwen, 1982). En Colombia existen 25 géneros y más de 190 especies (Fernández-Alonso & Rivera-Díaz, 2002; Fernández-Alonso *et al.*, 2003). *Hyptis* y *Erioposon* característicos del piedemonte cordillerano y de las sabanas de los llanos orientales de Colombia (Fernández-Alonso y Rivera-Díaz, 2002; Fernández-Alonso *et al.*, 2003). El interés farmacológico en las especies del género *Hyptis* se fundamenta en que tienen aplicaciones como: repelentes, insecticidas, antinociceptivos, antihiperglicémicos, antifúngicos, antibacterianos, anti-inflamatorios, antimaláricos, gastrointestinales, contra deficiencias respiratorias y en programas de manejo integrado de plagas, entre otros (Malele *et al.*, 2003; Araújo *et al.*, 2003; Grassi *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2004; Joy *et al.*, 2008).

### **Familia Capparaceae**

La especie *Capparis flexuosa* UN-109-F1, fue la única muestra evaluada de la familia Capparaceae. *Capparis flexuosa* obtuvo valores significativos para antigenotoxicidad a una concentración de 117µg/mL, valores semejantes a estudios previos (J. L. Fuentes *et al.*, 2016).

Diferentes géneros pertenecientes a la familia Capparaceae han sido utilizados en estudios toxicológicos arrojando resultados positivos (Seck *et al.*, 1993).

**Figura 3.** Porcentaje de la inhibición de la genotoxicidad (%IG), del extracto perteneciente a la familia Capparaceae. La línea de corte (puntos discontinuos) corresponde a los valores significativamente diferentes del %IG ( $P < 0.05$  en el test de Dunnet) con respecto al valor del control (%IG=0).



La presente investigación encontró que extractos súper críticos de las familias Asteraceae, Labiatae y Capparaceae presentan actividad antígenotóxica ante daño causado por luz UVB en el modelo bacteriano *E. coli*. En bacterias, pudimos comprobar que algunos extractos súper críticos evaluados poseen actividad quimiopreventiva, a través de la inhibición de la respuesta SOS. La radiación ultravioleta induce la formación de CPDs y 6,4 PPs, los cuales distorsionan en gran medida la doble hélice y detienen la replicación y la división celular; eventos que desencadenan la respuesta de emergencia SOS. La cepa PQ37 que se usa en el ensayo SOS Chromotest, tiene una mutación en el gen *uvrA* que le impide llevar a cabo la reparación por la vía NER para remover los fotoproductos. Por lo tanto, la reducción observada en la respuesta SOS, al evaluar los compuestos vegetales usados, nos lleva a pensar que estos actúan disminuyendo la cantidad

de CPDs, causados por la R-UVB, quizás a través de la absorción de fotones. Sin embargo, son necesarios nuevos estudios para ver el mecanismo de fotoprotección de los extractos, y los compuestos más importantes en estos responsables de la actividad antígenotóxica ante luz UVB.

#### 4. CONCLUSIONES

- 1) Ninguno de los compuestos evaluados es genotóxico
- 2) El extracto perteneciente a la especie *Hyptis sinuata* (F2) y *Hyptis suaveolens* son promisorios como materia prima para la obtención de elementos antigenotóxicos frente a UVB.
- 3) *Hyptissinuata* (F2) mostró diferencias significativas en relación a *Hyptissinuata* (F1) siendo la misma especie, el método de extracción permitió que la fracción uno (F1), generara valores de %IG significativos a partir de la concentración 234,38µg/mL.

## 5. RECOMENDACIONES

Es necesario realizar más estudios para identificar los compuestos causantes de la acción antígenotóxica en las muestras analizadas.

Es importante conocer los mecanismos de actuación de los compuestos de los extractos responsables de la actividad antígenotóxica, a través de estudios adicionales.

Dado que ningún extracto evaluado se catalogó como genotóxico, es indispensable realizar pruebas adicionales en otros modelos biológicos antes de ser implementados para uso humano.

## BIBLIOGRAFÍA

1. AFAQ, F., KATIYAR, S. Polyphenols: skin Photoprotection and Inhibition of Photocarcinogenesis. *Mini Rev Med Chem*, 11(14), 2011. pp.1200-1215.
2. ARAUJO, E.; SILVEIRA, E.; LIMA, M. A.; ANDRADE, M.; LIMA, M. A. Anticarcinogenic activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martius* Benth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 2003, pp.3760-3762
3. BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 2008. 446-475. doi: 10.1016/j.fct. 2007.09.106.
4. BARRIENTOS, J.; REINA, M., CHACÓN, M. Potencial económico de cuatro especies aromáticas promisorias para producir aceites esenciales en Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 6(2), 2012. pp.225-237.
5. BEENA. J., M. OMANAKUTTY & MOLLY. M. Antibacterial Effects and Chemical Composition of the Essential Oil of *Hyptis suaveolens* Poit Leaves. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11, 2013. pp.384-390.
6. D. SECK G. LOGNAY E. HAUBRUGE J. -P. WATHELET M. MARLIER C. GASPAR M. SEVERIN. Biological activity of the shrub *Boscia senegalensis* (PERS.) LAM. ex Poir. (Capparaceae) on stored grain insects. *Journal of Chemical Ecology*, 19, 1993. 377
7. DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research*, 402(1-2), 1998. 151–158.
8. ESPEY, D. K., WU, C., SWAN, J., WIGGINS, C., JIM, M., WARD,

- E...EDWARDS, B. K. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2004, featuring cancer in American Indians and Alaska Natives. *Cancer*, 110(10), 2007. pp.2119–2152. doi:10.1002/cncr.23044
9. FERNÁNDEZ, J. Studies in Colombian Labiatae IV. Novelty in *Salvia* and synopsis of sections *Angulatae* and *Purpureae*. *Caldasia*, 25(2), 2003. pp.235-281.
  10. FUENTES, J. L.; GARCÍA-FORERO, A.; QUINTERO RUIZ, N.; PRADA MEDINA, C. A.; REY-CASTELLANO, N.; FRANCO-NIÑO, D. A., CONTRERAS-GARCÍA, D. A.; CORDOBA-CAMPO, Y.; AND STASHENKO, E. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2017, Doi: 10.1039/C7PP00024C.
  11. FUENTES, J., ALONSO, A., CUÉTARA, E., VERNHE, M., ALVAREZ, N., SÁNCHEZ-LAMAR, A., LLAGOSTERA, M. Usefulness of the SOS Chromotest in the study of medicinal plants as radioprotectors. *International Journal of Radiation Biology*, 82(5), 2006. pp.323–329. doi:10.1080/09553000600733168
  12. GALLAGHER, P., LEE, K. Adverse effects of ultraviolet radiation: a brief review. *Progress in Biophysics and Molecular Biology B: Biology*, 92(1), 2006. pp119-131.
  13. GILABERTE, Y., GONZALEZ, S. Update on Photoprotection. *ACTAS Dermo-Sifiliográficas*, 101(8), 2010. pp.659-672.
  14. GRASSI P, NUÑEZ MJ, REYES TSU, FRANZ C. Chemical variation in the essential oil composition of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). *Nat Prod Comm* 3: 2008. pp.1137–1140
  15. HAZANE, F., SAUVAIGO, S., DOUKI, T., FAVIER, A., BEANI, J. Age-dependent DNA repair and cell cycle distribution of human skin fibroblasts in response to UVA irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 82, 2006. pp.214–223

16. ICHIHASHI, M., UEDA, M., BUDIYANTO, A., BITO, T., OKA, M., FUKUNAGA, M., HORIKAWA, T. UV-induced skin damage. *Toxicology*, 189(1-2), 2003. Pp.21–39. doi:10.1016/S0300- 483X(03)00150-1.
17. IVERA, O. & JL, F. Análisis corológico de la flora endémica de la Serranía de Perijá, Colombia. *Anales.Jard.Bot.Madrid*, 60(2), 2002. pp.47-369.
18. JIROVA, D., LIEBSCH, M., BASKETTER, D., SPILLER, E., KEJLOVA, K., BENDOVA, H., MARRIOTT, M. AND KANDAROVA, H. Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular in vitro assays and animal in vivo data. 100th ed. 2007
19. LIGHT, M. E., SPARG, S. G., STAFFORD, G. I., STADEN, J. Riding the wave: South Africa's contribution to ethnopharmacological research over the last 25 years. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2). 2005. pp.127–130. doi:10.1016/j.jep.2005.05.028.
20. LIGHT, M. E., SPARG, S. G., STAFFORD, G. I., STADEN, J. Riding the wave: South Africa's contribution to ethnopharmacological research over the last 25 years. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 2005. Pp.127–130. doi:10.1016/j.jep.2005.05.028.
21. MADRONICH, S., MCKENZIE, R. L., BJÖRN, L. O., CALDWELL, M. M. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 46(1-3), 1998. pp.5–19.
22. MADRONICH, S., MCKENZIE, R. L., BJÖRN, L. O., CALDWELL, M. M. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 46(1-3), 1998. 5–19.
23. MATSUMURA, Y., ANANTHASWAMY, H. N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 195(3), 2004. pp.298–308. doi:10.1016/j.taap.2003.08.019.

24. MORSE, M., STONER, G. D. Cancer chemoprevention: principles and prospects. *Carcinogenesis*, 14(9), 1993. pp.1737–46.
25. MSC. JOSIVANY V. DE FREITAS, I DRA. C. MARIA DO CARMO P. BATITUCCI, I DRA. C. MARCIENE A. ANDRADE, LIC. FERNANDO DE SOUZA SANTOS, MSC. ANNY CAROLYNE DA LUZ, LIC. URRACA J. A. PEREIRA I. Phytochemical screening and evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of *Helenium cf. amarum* (Raf.) H. Rock. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(1), 2014. pp.338-348.
26. MSC. JULIANA MACEDO DELARMELENA, DRA. C. MARIA DO CARMO PIMENTEL BATITUCCI, LIC. JEFFERSON LUIZ DE OLIVEIRA GONÇALVES. Efeitos citotóxico, genotóxico e mutagênico da tintura de *Matricaria chamomilla* L. in vivo. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(2), 2012. pp.149-159.
27. NICHOLS, J., KATIYAR, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of Dermatological Research*, 302(2), 2010. pp.71–83. Doi: 10.1007/s00403-009-1001-3.
28. OLIVERA, C.; SCHENKEL, E.; BAUER, L.; LANGELOH, A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC., Compositae. *Journal of Ethnopharmacology*, 22, 1988. 281- 293.
29. PURDUE, M. P., FREEMAN, B., ANDERSON, W. F., TUCKER, M. Recent trends in incidence of cutaneous melanoma among US Caucasian young adults. *The Journal of Investigative Dermatology*, 128(12), 2008. 2905–2908. doi:10.1038/jid.2008.159.
30. QUILLARDET, P., HOFNUNG, M. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutation Research*, 147, 1985. 65-78.

31. QUILLARDET, P., HUISMAN, O., D'ARI, R., HOFNUNG, M. SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in Escherichia coli K-12 to measure genotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79, 1982. pp.5971-5975.
32. R. S. MALELE , C. K. MUTAYABARWA , J. W. MWANGI , G. N. THOITHI , A. G. LOPEZ , E. I. LUCINI & J. A. ZYGADLO Essential Oil of Hyptis suaveolens (L.) Poit. from Tanzania: Composition and Antifungal Activity, *Journal of Essential Oil Research*, 15:6, 2003. pp.438-440, DOI: 10.1080/10412905.2003.9698633
33. RAMASUBRAMANIA RAJA, R. Medicinally Potencial Plants of Labiatae (Lamiaceae) Family: An Overview. *Research Journal of Medicinal Plant*, 6(3), 2012. pp.203-213.
34. SAIKIA, A. P., RYAKALA, V. K., SHARMA, P., GOSWAMI, P., BORA, U. Ethnobotany of medicinal plants used by Assamese people for various skin ailments and cosmetics. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(2), 2006. pp.149–157. doi:10.1016/j.jep.2005.11.033.
35. SILVA-SANTOS A, ANTUNES AMS, BIZZO HR, D'AVILA CA, SOUZA-SANTOS LC. The application of essential oils and terpenics/terpenoids compounds in the fields of pharmaceutic and cosmetic through the knowledge registered in patents. *Rev Bras Farmacogn*, 14 (Supl. 1): 2004. pp.48-50.
36. TING GAO, HUI YAO, JINGYUAN SONG, YINGJIE ZHU, CHANG LIU, SHILIN CHEN. Evaluating the feasibility of using candidate DNA barcodes in discriminating species of the large Asteraceae family. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 2010. p.324.
37. W CHENGYIH, L HSIWEN. On the evolution and distribution in Labiatae. *Acta Botanica Yunnanica*. 1982.

38. YESILADA, E. Past and future contributions to traditional medicine in the health care system of the Middle-East. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 2005. pp.135–137. doi:10.1016/j.jep.2005.06.003
39. ZAIDI, M., DAY, C., MERLINO, G. From UVs to Metastases: Modeling Melanoma Initiation and Progression in the Mouse. *Journal of Investigative Dermatology*, 128, 2008. pp.2381–2391. doi:10.1038/jid.2008.177.