

**POTENCIAL ANTIGENOTÓXICO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Lippia
origanoides* FRENTE A RADIACIÓN ULTRAVIOLETA TIPO C**

EDINSON RODRIGO SANCHEZ ORTIZ

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

2014

**POTENCIAL ANTIGENOTÓXICO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Lippia
Origanoides* FRENTE A RADIACIÓN ULTRAVIOLETA TIPO C**

EDINSON RODRIGO SANCHEZ ORTIZ

Trabajo de Grado para optar el título de Biólogo

Director

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

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

2014

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de forma especial al Doctor Jorge Luis Fuentes y a la bióloga Nathalia Quintero por su guía e instrucción constante, pertinente y paciente.

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

Agradezco a los diferentes profesores que aportaron de forma significativa en mi formación como profesional y como persona.

Agradezco a mi familia que cree en mí desde que tome la bonita decisión de estudiar Biología.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	11
1. COMPETENCIAS DE LA PASANTÍA DE INVESTIGACIÓN.	14
2. MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1 Extractos vegetales	15
2.2 Cepa de ensayo y condiciones del cultivo de trabajo	16
2.3 Principios del ensayo SOS Chromotest	16
2.4 Ensayo de genotoxicidad	17
2.5 Ensayos enzimáticos	17
2.5.1 Ensayo enzimático de β -galactosidasa (BG).	18
2.5.1 Ensayo enzimático de fosfatasa alcalina (FA).	18
2.6 Cálculo del factor de inducción (FI).	19
2.7 Ensayo de antigenotoxicidad	20
2.8 Criterio de antigenotoxicidad	20
2.9 Análisis estadístico de los datos	21
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4. CONCLUSIONES	28
5. RECOMENDACIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	30

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Composición química de los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación asistida con radiación microondas de la especie <i>Lippia origanoides</i> .	12
Tabla 2. Efecto antigenotóxico de los aceites esenciales de <i>Lippia origanoides</i> frente a R-UVC, medido en el ensayo SOS Chromotest.	21

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Cinética de inducción del gen <i>suIA</i> frente a radiación ultravioleta tipo C, en células de <i>Escherichia coli</i> cepa PQ37.	19

RESUMEN

TÍTULO: POTENCIAL ANTIGENOTOXICO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Lippia Origanoides* FRENTE A RADIACIÓN ULTRAVIOLETA TIPO C

AUTORES: EDINSON RODRIGO SANCHEZ ORTIZ**

PALABRAS CLAVES: *Lippia origanoides*, aceites esenciales, radiación ultravioleta, antigenotoxicidad, *SOS Chromotest*.

En el presente trabajo se realizó la evaluación de las propiedades antigenotóxicas de los aceites esenciales de la especie *Lippia origanoides* quimiotipos Timol, carvacrol y cariofileno, frente al daño inducido por radiación ultravioleta tipo C (RUV-C). Para ello se utilizó el ensayo bacteriano SOS Chromotest, bioensayo colorimétrico que estima el daño primario en el material hereditario a través de un gen reportero (β -galactosidasa) fusionado a uno de los genes de respuesta SOS en bacterias (*suIA*), los ensayos se realizaron usando diseños experimentales de co-tratamientos. La dosis de trabajo de la RUV-C fue determinada experimentalmente realizando curvas de genotoxicidad en el ensayo. Para el aceite esencial de *Lippia origanoides* quimiotipos timol y carvacrol se evidenció actividad antigenotóxica con dependencia de la concentración ensayada, con porcentajes de inhibición de la genotoxicidad entre el 60 y 100% a partir de una concentración de 0.42% V/V del aceite en el ensayo. Por su parte el aceite esencial de *Lippia origanoides* quimiotipo cariofileno, no mostró actividad antigenotóxica frente a la radiación ultravioleta tipo C en el modelo empleado. Dados los resultados obtenidos, se recomienda continuar con los estudios de antigenotoxicidad de los aceites que resultaron ser promisorios; así como con la evaluación de los componentes mayoritarios de estos aceites, esto con el fin de determinar que compuestos son responsables del efecto fotoprotector observado durante la ejecución del presente trabajo.

*Trabajo de grado modalidad Pasantía de investigación

**Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Director: Jorge Luis Fuente Lorenzo, Ph.D.

ABSTRACT

TITLE: ANTIGENOTOXIC POTENTIAL OF *Lippia origanoides* ESSENTIAL OILS AGAINST ULTRAVIOLET RADIATION TYPE C.

Authors: EDINSON RODRIGO SANCHEZ ORTIZ**

Key words: *Lippia origanoides*, essential oils, ultraviolet radiation, antigenotoxicity, SOS Chromotest.

The present work assayed the antigenotoxic properties of *Lippia origanoides* essential oils, chemotypes thymol, carvacrol and caryophyllene against the damage induced by ultraviolet radiation type C (RUV-C). For that purpose a co-treatment experimental design was carried out in the SOS Chromotest bacterial assay, this is a colorimetric assay that estimates the primary damage through a reporter gene (β -galactosidase) fused to a SOS gene (*sulA*). The dose of ultraviolet radiation type C was experimentally determined by genotoxicity curves in the assay. The essential oils of *L. origanoides* chemotypes thymol and carvacrol showed antigenotoxic activity in a concentration dependent manner, with percentages of genotoxicity inhibition between 60 and 100% from a concentration of 0.42% V/V of oil in the assay. Meanwhile, the *L. origanoides* chemotype caryophyllene does not evidence antigenotoxic activity against RUV-C in the assay used. According to our results, we recommend amplify the antigenotoxic studies of promissory oils and their major compounds, in order to determine the compounds responsible for the photoprotective effect observed during the development of this work.

*Degree work, Research internship

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

INTRODUCCIÓN

La radiación ultravioleta (R-UV) es un conocido agente genotóxico cuyo espectro de radiación se divide, de acuerdo a la longitud de onda, en R-UV de onda larga o R-UVA (320-400 nm), de onda media o R-UVB (280-320 nm) y de onda corta o R-UVC (200-280 nm) cuyos efectos biológicos varían en dependencia de su tipo (Matsumura y Ananthaswamy, 2004; Ravanat *et al.*, 2001). La R-UV se considera un iniciador de los procesos de carcinogénesis ya que es capaz de inducir alteraciones estructurales en el ADN. Es por ello que la genotoxicidad producida por este agente se ha ligado al proceso carcinogénico en piel y al fotoenvejecimiento. Actualmente, se conoce que diferentes patologías cutáneas han presentado incrementos importantes en términos de incidencia, debido principalmente a la sobreexposición a la radiación solar sin la debida protección y al incremento de los niveles de radiación en la tierra (Madronich *et al.*, 1998; Ichihashi *et al.*, 2003; Matsumura y Ananthaswamy, 2004; Gallagher y Lee, 2006; Zaidi *et al.*, 2008; Afaq, 2011). Esta situación ha impulsado el desarrollo de estrategias de prevención, siendo una de ellas la búsqueda de compuestos naturales con actividad quimiopreventiva o fotoprotectora; es decir, sustancias con capacidad de prevenir, contrarrestar o estimular la reparación del daño genético causado por la radiación solar (Marrot *et al.*, 2005, Hazane *et al.*, 2006).

Entre los agentes naturales con potencial fotoprotector se encuentran los aceites esenciales (AE); los cuales son mezclas de compuestos volátiles extraídos de plantas y usados tanto en la medicina tradicional como en la industria farmacológica (Pascual *et al.*, 2001; Edris, 2007; Bakkali *et al.*, 2008; Hennebelle *et al.*, 2008). Los AE son ampliamente conocidos por sus propiedades antimicrobianas, antivirales, antioxidantes y antigenotóxicas (Burt, 2004; Bakkali *et al.*, 2008; Kaefer y Milner, 2008, Vicuña *et al.*, 2010).

Su capacidad de mantener la integridad del material hereditario frente al daño genético producido por agentes físicos como la R-UV, es la propiedad que les confiere su potencial como agentes fotoprotectores (Aydin *et al.*, 2005ab; Bakkali *et al.*, 2006, Ipek *et al.*, 2005; Knežević-Vukčević *et al.*, 2005; Mezzoug *et al.*, 2007; Nikolić *et al.*, 2011; Stanojevic *et al.*, 2008; Vuković-Gačić *et al.*, 2006). En este sentido, una fuente promisorio de aceites esenciales con probadas propiedades biológicas es el género *Lippia*, que cuenta con más de 200 especies distribuidas en zonas tropicales y subtropicales de Asia, África, y de centro y Suramérica (Pascual *et al.*, 2001). Donde la amplia diversidad química dada por la variedad de metabolitos secundarios es una de sus características más importantes (Zoghbi *et al.*, 1998; Stashenko *et al.*, 2003).

En la búsqueda de compuestos antígenotóxicos, es importante realizar una selección adecuada del bioensayo a utilizar. Con esto en mente, y teniendo en cuenta que los ensayos en bacterias son en un principio los más adecuados, el ensayo SOS Chromotest surge como un buen candidato. Por un lado, su alta sensibilidad y flexibilidad permiten que pueda ser semi-automatizado, lo que se traduce en una mayor eficiencia en el “*screening*” masivo de compuestos naturales (Fuentes *et al.*, 2006a). Además, es posible realizar diversos diseños experimentales (co, pre, pos incubación), que dan una idea del posible mecanismo empleado por los compuestos en estudio para evitar o disminuir el daño en el ADN (De Flora *et al.*, 1992ab). Por otra parte, este ensayo es particularmente útil en la búsqueda de compuestos con actividad fotoprotectora ya que es sensible al daño inducido por la R-UV (Quillardet y Hofnung, 1984) y diferentes estudios señalan que en *E. coli* la reparación del daño causado por este mutágeno es dependiente principalmente de la respuesta de emergencia celular “SOS” (Bagg *et al.*, 1981, Fogliano y Schendel, 1981; Huisman y D’Ari, 1981, Kenyon y Walker, 1981; Rosenberg y Echols, 1990; Keller *et al.*, 2001). Adicionalmente, trabajos previos ya han validado el uso de este bioensayo para el estudio de antimutágenos naturales frente a R-UV (Sato *et al.*, 1991; Junior *et al.*, 2005).

Con base en lo expuesto, la presente pasantía de investigación tuvo como objetivos los siguientes:

- 1) Establecer la cinética de inducción del gen *suIA* producto del tratamiento con R-UVC en la cepa *Escherichia coli* PQ37.
- 2) Evaluar el potencial antigenotóxico de aceites esenciales de especies del género *Lippia* frente a radiación UV mediante el ensayo SOS Chromotest.

La pasantía se enmarco en el proyecto de investigación “Estudio del potencial antigenotóxico frente a la radiación ultravioleta de extractos SFE y aceites esenciales de especies vegetales de la biodiversidad colombiana”; proyecto que se está desarrollando en el laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental, adscrito a la escuela de Biología de la Universidad Industrial de Santander.

1. COMPETENCIAS DE LA PASANTÍA DE INVESTIGACIÓN.

1. Adquirir habilidades en el desarrollo del ensayo SOS Chromotest.
2. Establecimiento de ensayos de antigenotoxicidad de aceites esenciales de especies vegetales del género *Lippia*.
3. Afianzamiento en el uso de las normas de bioseguridad para el trabajo en un laboratorio de Mutagénesis Ambiental.
4. Adquirir habilidades y destreza en el trabajo de laboratorio y manejo de equipos; así como, en la preparación de medios de cultivo y reactivos requeridos para el trabajo en el laboratorio.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Extractos vegetales

Los AE evaluados en este estudio, así como la información de su composición química obtenida mediante cromatografía (Tabla 1), fueron suministrados por el Centro de Investigación en Biomoléculas (CIBIMOL) y extraídos en el marco del proyecto Bio-Red-CO-CENIVAM No. 550754331904-31893. Con el fin de diferenciar los tres AE evaluados, estos serán nombrados de acuerdo a su quimiotipo; el cual es designado con base en la molécula con mayor presencia en el AE puro. La evaluación de la genotoxicidad de los AE de *Lippia organoides* fue previamente realizada en el laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental (LMMA), donde se encontró que estos no son genotóxicos en el modelo experimental empleado (datos no publicados).

Tabla 1. Composición química de los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación asistida con radiación microondas de la especie *Lippia organoides*.

No.	Compuestos	I _k	Cantidad relativa (%) [†]		
			Quimiotipo 1	Quimiotipo 2	Quimiotipo 3
1	α-Pineno	936	-	2.3	-
2	Canfeno	954	-	2.6	-
3	β-Mirceno	990	2.8	-	2.8
4	α-Cariofileno	1009	-	9.9	-
5	α-Terpineno	1017	3.1	-	1.6
6	ρ-cimeno	1027	10.9	11.2	10.0
7	Limoneno	1030	-	7.2	-
8	γ-Terpineno	1060	11.8	1.5	5.0
9	Borneol	1180	-	3.1	-
10	Timol metil éter	1228	-	-	1.9
11	Timol	1296	9.9	-	54.5
12	Carvacrol	1301	46.2	-	1.7
13	Thymyl acetate Acetato de timil	1347	-	-	4.8
14	trans-β-cariofileno	1432	2.5	11.3	2.4
15	α-humuleno	1469	1.4	6.0	-

Los metabolitos secundarios fueron separados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas GC-MS. No., Orden de elución en una columna DB-5MS, I_k, Valores del índice de retención (Kovats, 1965) calculado de un mínimo de tres cromatogramas independientes. (†), Únicamente se consideraron los componentes cuya cantidad relativa fue mayor al 1%.

2.2 Principio del ensayo SOS Chromotest

El ensayo SOS Chromotest permite monitorear la inducción de la respuesta SOS en la enterobacteria *Escherichia coli* cepa PQ37, como respuesta al daño causado en su ADN por mutágenos químicos y físicos (Quillardet *et al.*, 1982). La cepa cuenta con una fusión transcripcional del gen *sulA* (regulado bajo la respuesta SOS) que codifica un péptido involucrado en la formación del septo celular y el gen estructural de la β -galactosidasa del operón Lactosa (*sulA::LacZ*); el cual ha sido previamente deleccionado del cromosoma de la cepa. De esta manera toda la actividad β -galactosidasa detectada, depende exclusivamente de la expresión del gen *sulA*, siendo un indicador del nivel de inducción de la respuesta SOS; y por tanto, un indicador indirecto del daño inducido al ADN. La cepa tiene además una mutación en el gen *uvrA*, que la hace deficiente en la reparación por escisión de nucleótidos y en consecuencia sensible a una amplia variedad de mutágenos que inducen daños en el ADN reparados por este mecanismo. Adicionalmente cuenta con una mutación *rfa* que la hace deficiente en lipo-polisacáridos de membrana, lo que eleva la permeabilidad de la membrada celular (Quillardet *et al.*, 1982, Sancar y Rupp, 1983, Quillardet & Hofnung 1985, Quillardet & Hofnung 1993).

2.3 Cepa de ensayo y condiciones del cultivo de trabajo

Una alícuota de la cepa *Escherichia coli* PQ37, genotipo (*F- thr leu his-4 pyrD thi galE galK or galT lac ΔU169 srl300::Tn10 rpoB rpsL uvrA rfa trp::Muc+ sfiA::Mud(Ap, lac)cts*) se dejó creciendo en medio Luria-Bertani (LB) (10 g tripton, 10 g cloruro de sodio, 5 g extracto de levadura disueltos en agua destilada) suplementado con ampicilina (50 $\mu\text{g/ml}$) y tetraciclina (17 $\mu\text{g/ml}$) a una temperatura de 37 °C con agitación permanente (100 rpm) durante toda la noche. Al día siguiente se realizó una resiembra en medio fresco adicionando 2 ml del medio crecido en 20 ml de medio LB, el cual se dejó crecer bajo las condiciones experimentales descritas anteriormente un tiempo aproximado de dos horas, hasta que alcanzó una densidad óptica $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,4.

2.4 Ensayo de genotoxicidad

La genotoxicidad de la R-UVC fue evaluada usando el ensayo SOS Chromotest siguiendo el procedimiento descrito por Quillardet *et al.*, (1982) con las modificaciones propuestas por Fuentes *et al.*, (2006a), así como pequeñas modificaciones realizadas por el LMMA. El cultivo de la cepa PQ37, crecido hasta una $DO_{600nm} = 0.4$, fue diluido 10 veces en medio LB a doble fuerza (20 g Triptona/L, 10 g Extracto de Levadura/L, 20 g Cloruro de Sodio/L, pH 7.4). Este fue dispensado a razón de 600 μ L por tubo eppendorf, que contenía igual volumen de agua destilada estéril (que en ensayos de antigenotoxicidad será reemplazada por diluciones del compuesto a evaluar). Se tomó 1 ml de esta mezcla y se depositó en placas Petri de 3cm de diámetro para irradiación. Para esto se usó una lámpara germicida de 55 voltios referencia 0000502-G15W T8 (Sylvania, Inglaterra) con pico de emisión a 253,7nm. El rango de dosis ensayado estuvo entre 1.35 y 27.04 J/m^2 , calculado según lo indicado por Kowalski *et al.*, (2000). Posterior a la irradiación, se traspasó las muestras irradiadas a tubos de microcentrífuga que fueron incubados por 30 minutos a una temperatura entre 4-8 °C y posteriormente durante dos horas a 37 °C con agitación permanente (300 rpm). 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 + agua destilada estéril) y un control positivo (C+: células sin irradiar + 4NQO).

2.5 Ensayos enzimáticos

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

2.5.1 Ensayo enzimático de β -galactosidasa (BG).

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

2.5.2 Ensayo enzimático de fosfatasa alcalina (FA).

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

2.6 Cálculo del 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.

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

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

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

$$R = \frac{\text{unidades } \beta\text{-galactosidasa}}{\text{unidades fosfatasa alcalina}}$$

Ecuación 2.

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

Ecuación 3.

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

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

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

2.7 Ensayo de antigenotoxicidad

El potencial antigenotóxico de los AE frente a R-UVC se evaluó en el ensayo SOS Chromotest descrito por Quillardet y colaboradores (1982). El ensayo de antigenotoxicidad se desarrolló básicamente como el protocolo de genotoxicidad descrito previamente, pero las células fueron expuestas simultáneamente a diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite a evaluar y a la dosis de R-UVC determinada en el ensayo de genotoxicidad. Los ensayos enzimáticos y posteriores mediciones se desarrollaron siguiendo los procedimientos anteriormente descritos. Para cada aceite se realizaron al menos tres experimentos independientes con cuatro replicas cada uno. En cada experimento se incluyó un control negativo (C-: células sin irradiar + agua destilada estéril) y un control positivo (C+: células irradiadas + agua destilada estéril).

2.8 Criterio de antigenotoxicidad

El criterio de antigenotoxicidad empleado fue el porcentaje de inhibición de la genotoxicidad (%IG), el cual representa la capacidad de la sustancia ensayada para proteger el material genético y se mide como una reducción significativa del FI en los co-tratamientos (células irradiadas + compuesto a evaluar) respecto al control positivo, como se muestra en la ecuación 4.

Ecuación 4.

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

<p>I co: Factor de inducción SOS de los co-tratamientos (células irradiadas + compuesto a evaluar). I basal: Factor de inducción SOS del control negativo. I uvc: Factor de inducción SOS del control positivo.</p>
--

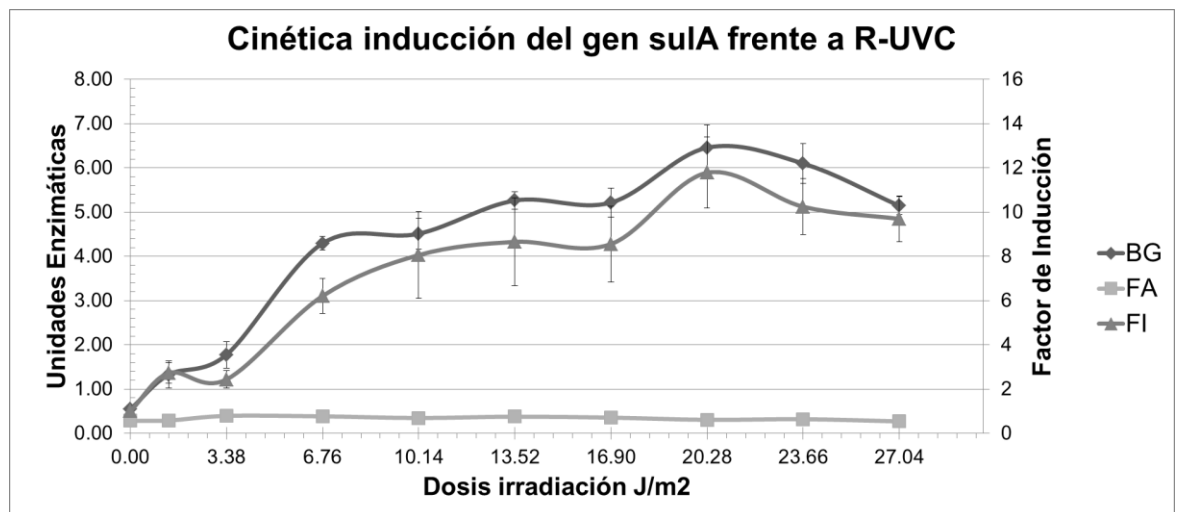
2.9 Análisis estadístico de los datos

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

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cinética de inducción del gen *sulA* frente a la R-UVC fue evaluada para nueve dosis, partiendo de 1.35 J/m² hasta 27.04 J/m². Los resultados indican que la inducción del gen frente a este agente físico es dosis dependiente. Para el rango de dosis evaluadas, el aumento en la inducción del gen *sulA* es significativo desde la primera dosis y máximo para la dosis 20.28 J/m² (Figura 1). Por otra parte, no se evidenció reducción significativa de la actividad constitutiva de la fosfatasa alcalina por el tratamiento con R-UVC, sugiriendo que este agente físico no afecta la síntesis de proteínas en la enterobacteria *E. coli* cepa PQ37. Dado que la dosis 20,28 J/m² muestra los mayores niveles de inducción SOS y además no resultó tóxica para las células, fue elegida como dosis de trabajo para los ensayos de antigenotoxicidad.

Figura 1. Cinética de inducción del gen *sulA* frente a radiación ultravioleta tipo C, en células de *Escherichia coli* cepa PQ37.



BG: Unidades enzimáticas de β -galactosidasa. **FA:** Unidades enzimáticas de fosfatasa alcalina. **FI:** Factor de Inducción.

La composición química de la especie *L. origanoides* ha mostrado una variación significativa de acuerdo con los constituyentes mayoritarios identificados en sus extractos, hasta el momento se ha propuesto la existencia de 6 quimiotipos diferentes (Castañeda 2007, Ruiz *et al.*, 2007, Stashenko *et al.*, 2010, Ribeiro *et al.*, 2014). De acuerdo con los datos de cromatografía suministrados por el CIBIMOL, se logró identificar un total de 15 compuestos y tres quimiotipos, cuyos compuestos mayoritarios fueron: Quimiotipo 1: Carvacrol 46.2%, γ -Terpineno 11.8% y p-cimeno 10.9%; Quimiotipo 2: *trans*- β -cariofileno 11.3%, p-cimeno 11.2% y α -cariofileno 9.9%; Quimiotipo 3: Timol 54.5% (tabla 1). De ahora en adelante nos referiremos a ellos como *L. origanoides* quimiotipo carvacrol, cariofileno y timol, respectivamente. Las variaciones en la producción de los metabolitos secundarios en plantas de la misma especie tradicionalmente se ha atribuido a condiciones geobotánicas de crecimiento y más recientemente a factores genéticos, ya que se encontraron plantas del mismo quimiotipo creciendo en regiones geográficas con condiciones ambientales diferentes, así como plantas de diferentes quimiotipos que se someten a crecimiento bajo exactamente las mismas condiciones y mantienen las diferencias en su composición química (Oliveira *et al.*, 2007, Ruiz *et al.*, 2007, Stashenko *et al.*, 2010). De acuerdo con Stashenko y colaboradores (2013) los tres quimiotipos evaluados en este trabajo se perfilan como fuentes de compuestos bioactivos debido a su alto contenido de compuestos como timol, carvacrol, quercetina, naringenina, pinocembrina, y luteolina; cuyas actividad antioxidante y antimicrobiana son bien conocida.

Los resultados de la evaluación del potencial antigenotóxico del AE de los tres quimiotipos de *Lippia origanoides* se presentan en la Tabla 2. El comportamiento del AE de *L. origanoides* quimiotipos timol y carvacrol fue muy similar, obteniéndose que en el ensayo SOS Chromotest ambos disminuyen el daño inducido en el ADN por la R-UVC de forma dosis dependiente. Esta disminución de la genotoxicidad fue significativa a partir de la dosis 0,42 %V/V de la fracción acuosa del aceite en el ensayo; dosis en la que se evidencia una inhibición de la

genotoxicidad mayor al 60% respecto a la inducida en células irradiadas sin protección del aceite. Por su parte, el AE de *L. origanoides* quimiotipo cariofileno no presenta un potencial fotoprotector marcado frente a R-UVC, ya que la inhibición de la genotoxicidad es significativa solo en la dosis más alta evaluada.

Tabla 2. Efecto antigenotóxico de los aceites esenciales de *Lippia origanoides* frente a R-UVC, medido en el ensayo SOS Chromotest.

Tratamientos	<i>L. origanoides</i> carvacrol		<i>L. origanoides</i> cariofileno		<i>L. origanoides</i> timol	
	FI	%IG	FI	%IG	FI	%IG
C- H ₂ O	1.0 ± 0.0		1.0 ± 0.0		1.0 ± 0.0	
C+ 20,28 J/m ²	8.1 ± 0.6		12.7 ± 1.3		12.6 ± 0.9	
3.33 % V/V	0.5 ± 0.0 *	100.0	0.9 ± 0.1 *	100.0	0.4 ± 0.1 *	100.0
1.67 % V/V	0.6 ± 0.1 *	100.0	16.5 ± 1.5 n.s.	0.0	0.4 ± 0.1 *	100.0
0.83 % V/V	0.9 ± 0.1 *	100.0	13.2 ± 0.4 n.s.	0.0	0.4 ± 0.1 *	100.0
0.42 % V/V	3.5 ± 0.7 *	64.3	13.9 ± 0.9 n.s.	0.0	4.0 ± 1.6 *	74.1
0.21 % V/V	10.0 ± 0.9 n.s.	0.0	12.2 ± 0.6 n.s.	4.5	12.8 ± 2.1 n.s.	0.0
0.10 % V/V	9.8 ± 0.4 n.s.	0.0	12.2 ± 0.6 n.s.	4.5	17.5 ± 0.7 n.s.	0.0
0.05 % V/V	8.5 ± 0.5 n.s.	0.0	13.1 ± 0.6 n.s.	0.0	14.5 ± 0.7 n.s.	0.0
0.03 % V/V	10.6 ± 1.0 n.s.	0.0	14.2 ± 0.9 n.s.	0.0	15.2 ± 1.0 n.s.	0.0
0.01 % V/V	8.2 ± 0.4 n.s.	0.0	9.9 ± 0.2 n.s.	24.5	12.5 ± 1.1 n.s.	1.6

Concentración final en el ensayo de los extractos acuosos del aceite. Valores promedio del factor de inducción SOS (FI) de un mínimo de tres experimentos independientes con cuatro réplicas cada uno y su correspondiente error estandar. %GI, Porcentaje de inhibición de la genotoxicidad. *Reducción significativa (p<0.05) con respecto al control positivo empleando la prueba de Dunnett. n.s. no se encontró diferencia significativa del control positivo.

La actividad antigenotóxica encontrada en los AE de *L. origanoides* quimiotipos carvacrol y timol se suma a la larga lista de bioactividades reportadas para esta especie, que además ha sido ampliamente usada en la medicina tradicional por diferentes pueblos de América del Sur (Oliveiro *et al.*, 2014). Dentro de los reportes se incluye: *i*) actividad bacteriostática del AE frente a tres especies de la bacteria gram positiva *Nocardia* spp (Mendez *et al.*, 2007), *ii*) actividad antimicrobiana contra microorganismos tanto patógenos como no patógenos (Santos *et al.*, 2004, Rodríguez y Sanabria 2005, Oliveira *et al.*, 2007, Betancur-Galvis *et al.*, 2011, Madeiros *et al.*, 2014), *iii*) efecto repelente frente a *Tribolium castaneum* y *Sitophilus zeamais* superior al mostrado por el producto comercial

IR3535 (Nerio *et al.*, 2009, Olivero-Verbel *et al.*, 2009, Caballero-Gallardo *et al.*, 2012), *iv*) inhibición de la replicación *in vitro* del virus de la fiebre amarilla (Meneses *et al.*, 2009), *v*) actividad antiprotozoaria frente a promastigotes de *Leishmania chagasi* y epimastigotes y amastigotes de *Trypanosoma cruzi* sin efectos citotóxicos para las células de mamífero donde crece el parásito (Celis *et al.*, 2007, Escobar *et al.*, 2010, Raposo *et al.*, 2012). Finalmente, es importante resaltar la actividad antioxidante probada por diferentes grupos de investigación (Muñoz-Acevedo *et al.*, 2009, Stashenko *et al.*, 2008, Teles *et al.*, 2014), así como, la capacidad de protección al ADN frente al daño inducido por el clastógeno bleomicina (Vicuña *et al.*, 2010), lo que convierte los AE de esta planta con fuentes potenciales de quimiopreventivos.

En la mayoría de estudios con plantas en el área de productos naturales, los investigadores establecen relaciones entre la bioactividad encontrada y los metabolitos secundarios detectados en el extracto (Ruiz *et al.*, 2007), dado que para éstos generalmente también se han reportado diversas actividades biológicas. Ejemplo de ello son los estudios realizados en *L. origanoides* por Betancur-Galvis y colaboradores (2011) quienes también encontraron el efecto antifúngico del AE al evaluar los compuestos timol y carvacrol. Escobar y colaboradores (2010) encontraron lo mismo para la actividad antiprotozoaria del aceite esta vez con Timol y carvona. Muñoz-Acevedo (2009) encontró que timol y carvacrol presentaron incluso mayor actividad antioxidante que los AE que los contenían. Finalmente Vicuña y colaboradores (2010) establecieron que el efecto antigenotóxico del AE frente a bleomicina se debe al alto contenido de timol y/o carvacrol en el aceite. En esta misma línea, reportes para otras especies vegetales en las que timol y carvacrol también son los constituyentes mayoritarios se ha encontrado que estos monoterpenos fenólicos cuentan en mayor o menor medida con capacidad antigenotóxica y antimutagénica frente a diversos agentes que dañan en material genético, lo que sugiere su importancia farmacológica para la prevención del cáncer (Ipek *et al.*, 2005, Mezzoug *et al.*, 2007).

Cabe mencionar que timol y carvacrol también han resultado tener efectos negativos. Se encontró por ejemplo que aumentan el número de revertantes en el ensayo de Ames aunque no a niveles que se consideran significativos y que resultaron ser genotóxicos en células de medula ósea de ratón (Stammati., *et al.*, 1999, Azirak y Rencuzogullari 2008). Así mismo carvacrol fue tóxico y timol genotóxico en el modelo *Drosophila melanogaster* (Karpouhtsis *et al.*, 1998). Por su parte timol mostro efecto genotóxico en los ensayos de intercambio de cromatides hermanas, aberraciones cromosómicas y micronucleos en linfocitos humanos (Buyukleyla y Rencuzogullari, 2009). Sin embargo algunos autores proponen que la genotoxicidad encontrada en los compuestos mayoritarios en su forma pura no corresponde con su participación en aceites esenciales o mezclas de estos dos compuestos (Demir *et al.*, 2013, Karpouhtsis *et al.*, 1998).

Finalmente, la genotoxicidad causada por la R-UV se debe principalmente a la formación de dímeros de pirimidina y 6-4 fotoproductos (Cadet *et al.*, 2005). La célula elimina este tipo de daños mediante el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos. Existen reportes de actividad bio-antimutagénica usando monoterpenoides (De Flora, 1998). Teniendo esto en mente, uno de los posibles mecanismos de acción del Carvacrol y el Timol podría ser por modulación de los mecanismos de reparación de fotoproductos.

En el caso de *L. origanoides* quimiotipo cariofileno solo existe un reporte de la evaluación de la actividad antifúngica del aceite, sin embargo este no fue activo en las concentraciones evaluadas (Betancur-Galvis *et al.*, 2011). Este quimiotipo ha sido reportado solo dos veces y no ha sido tan ampliamente estudiado como los otros dos (Betancur-Galvis *et al.*, 2011, Stashenko *et al.*, 2013). Por lo anterior, se propone que este no es un quimiotipo promisorio como fuente de compuestos con actividad biológica.

Este trabajo aporta nuevo conocimiento sobre potencial terapéutico de la especie *Lippia organoides* quimiotipos timol, carvacrol y cariofileno con la evaluación de sus propiedades antigenotóxicas. Así mismo se sugiere que timol y carvacrol son responsables del potencial fotoprotector encontrado en el AE de *Lippia organoides* quimiotipos timol y carvacrol, ya que como se mencionó estos compuestos químicos son capaces de proteger el material genético frente al daño inducido por diferentes mutágenos.

4. CONCLUSIONES

A partir de los datos obtenidos durante el desarrollo del trabajo experimental se puede concluir que la dosis mínima a la que se obtiene la máxima inducción del gen *sulA* sin que se presente inhibición de la síntesis de proteínas es 20,28 J/m².

Los aceites esenciales de *Lippia organoides* quimiotipos timol y carvacrol presentaron actividad antígenotóxica frente a radiación ultravioleta tipo C, siendo los quimiotipos más promisorios como fuente de compuestos con actividad fotoprotectora. Por su parte, el aceite esencial correspondiente al quimiotipo cariofileno no exhibió una actividad antígenotóxica relevante.

5. RECOMENDACIONES

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

BIBLIOGRAFÍA

AFAQ, F. Natural agents: cellular and molecular mechanisms of photoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2001; 508 (2): 144-151.

AYDIN, S., BASARAN, A.A., BASARANA, N. Modulating Effects of Thyme and Its Major Ingredients on Oxidative DNA Damage in Human Lymphocytes. *Mutation Research* 2005a; 581: 43–53.

AYDIN, S., BASARAN, A., BASARANA, N. The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005b; 53 (4): 1299–1305.

AZIRAK, S., RENCUZOGULLARI., E. The In Vivo Genotoxic Effects of Carvacrol and Thymol in Rat Bone Marrow Cells. *Wiley InterScience* 2008; 23 (6): 57–755

BAGG E., KENYON C., WALKER, G. Inducibility of a gene product required for UV and chemical mutagenesis in *Escherichia coli*. *PNAS* 1981; 78: 5749-5753.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., ZHIRI, A., BAUDOUX, D y IDAOMAR, M. Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) after treatments with UVC radiation, 8-MOP plus UVA and MMS. *Mutation Research* 2006; 606 (1-2): 27-38.

BAKKALI, F; AVERBECK, S; AVERBECK, D y IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology* 2008, 46 (2): 446-475.

BETANCUR-GALVIS, L., ZAPATA, B., BAENA, A., RUÍZ-NOVA, C. A., BUENO, J., STASHENKO, E., & MESA-ARANGO, A. C. Antifungal, cytotoxic and chemical analyses of essential oils of *Lippiaoriganoides* HBK grown in Colombia. *RevistaSalud UIS* 2011; 43(2): 141-148.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food. *International Journal of Food Microbiology* 2004; 94: 223– 253.

BUYUKLEYLA, M., RENCUZOGULLARI, E. The effects of thymol on sister chromatid exchange, chromosome aberration and micronucleus in human lymphocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2009; 72: 943–947

CABALLERO-GALLARDO, K., OLIVERO-VERBEL, J., STASHENKO, E. Repellency and toxicity of essential oils from *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon flexuosus* and *Lippia organoides* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*. *Journal of Stored Products Research* 2012; 50: 62-65

CADET, J. SAGE, E. DOUKI, T. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutation Research*, 2005; 571: 3–17

CASTAÑEDA, M. I., MUÑOZ, A., MARTÍNEZ, J. R., & STANSCHENKO, E. E. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Scientia et Technica*, 2007; 1(33): 165-166.

CELIS, C., ESCOBAR-RIVERO, P., ISAZA, J., STASHENKO, E., MARTINEZ, J. Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia organoides*, y *Phyla dulcis*, especies de la familia Verbenaceae. *Scientia et Technica XIII* 2007; 33: 103 – 105.

CORDELL, G., COLVARD, M. Some thoughts on the future of ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 100: 5–14.

DE FLORA S, BRONZETTI G, SOBELS FH: Assessment of antimutagenicity and anticarcinogenicity. *Mutat Res* 1992a; 267: 153-155.

DE FLORA S, CAMOIRANO A, D'AGOSTINO F, BALANSKY R: Modulation of the mutagenic response in prokaryotes. *Mutat Res* 1992b; 267: 183-192.

DE FLORA S, Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 1998; 402: 151-158.

DEMİR, E., KAYA, B., MARCOS, R., KOCAOĞLU, S., CETİN, H. Investigation of the genotoxic and antigenotoxic properties of essential oils obtained from two *Origanum* species by *Drosophila* wing SMART assay. *Turkish Journal of Biology*. 2013; 37: 129-13

DOS SANTOS, F., LOPES, A., GRACAS, M. Composition and Biological Activity of Essential Oils from *Lippia organoides* H.B.K. *J. Essent. Oil Res* 2004; 16: 504-506.

EDRIS, A. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents. *Phytotherapy research* 2007, 21: 308–323.

ESCOBAR, P., LEAL, S., HERRERA, L., MARTINEZ., J., STASHENKO, E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105(2): 184-190.

FOGLIANO M, SCHENDEL PF: Evidence for the inducibility of the *uvrB* operon. *Nature* 1981, 289: 196-198.

FUENTES, JL., VERNHE, M., CUETARA, EB., SÁNCHEZ-LAMAR, A., SANTANA, JL y LLAGOSTERA, M. Tannins from Barks of *Pinus caribaeae* Morelet Protect *Escherichia coli* Cells Against ADN Damage Induced by γ -rays. *Fitoterapia* 2006^a, 77 (2) :116-120.

GALLAGHER, RP., y LEE, TK. Adverse effects of ultraviolet radiation: a brief review. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2006, 92 (1): 119-131.

GANDINI, S., SERA, F., CATTARUZZA, M.S., PASQUINI, P., ABENI, D., BOYLE, P., MELCHI, C.F. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer* 2005; 41(1): 28-44.

HAZANE, F., SAUVAIGO, S., DOUKI, T., FAVIER, A., BEANI, JC: Age-dependent DNA repair and cell cycle distribution of human skin fibroblast in response to UVA irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology* 2006; 82:214-223.

HENNEBELLE, T., SAHPAZ, S., JOSEPH, H., BAILLEUL, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*, *Journal of Ethnopharmacology* 2008, 116: 211–222.

HUISMAN, O. & D'ARI, R. An inducible DNA replication cell division coupling mechanism in *E. coli*. *Nature* 1981, 290: 797-799.

ICHIHASHI, M., UEDA, M., BUDIYANTO, A., BITO, T., OKA, M., FUKUNAGA, M; TSURU, K., y HORIKAWA, T. UV-induced skin damage. *Toxicology* 2003, 189: (12): 21-39.

IPEK, E., ZEYTIÑOGLU, H., OKAY, S., TUYLU, B.A., KURKCUOGLU, M., CAN BASER, K.H. Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. Food Chemistry 2005, 93: 551–556

JÚNIOR, A., ASAD, L., DE OLIVEIRA, E.B., KOVARY, K., ASAD, N.R., FELZENSZWALB, I. Antigenotoxic and antimutagenic potential of an annatto pigment (norbixin) against oxidative stress. Genet. Mol. Res 2005, 4 (1): 94-99

KAEFER, C., MILNER, J. The role of herbs and spices in cancer prevention. Journal of Nutritional Biochemistry 2008, 19: 347–361.

KARPOUHTSIS, I., PARDALI, V., FEGGOU, E., KOKKINI, S., SCOURAS, Z., MAVRAGANI-TSIPIDOU, P. Insecticidal and Genotoxic Activities of Oregano Essential Oils. J. Agric. Food Chem. 1998, 46: 1111-1115

KELLER, K.L., OVERBECK-CARRICK, T.L., BECK, D.J. Survival and induction of SOS in *Escherichia coli* treated with cisplatin, UV-irradiation, or mitomycin C are dependent on the function of the RecBC and RecFOR pathways of homologous recombination. Mutation Research 2001, 486: 21–29

KENYON CJ, WALKER GC: Expression of the *Escherichia coli uvrA* gene is inducible. *Nature* 1981, 289: 808-810.

KNEŽEVIĆ-VUKČEVIĆ, J., VUKOVIĆ-GAČIĆ, B., STEVIĆ, T., STANOJEVIĆ, J. NIKOLIĆ, B., SIMIĆ, D. Antimutagenic effect of essential oil of sage (*salvia officinalis* L.) and its fractions against uv-induced mutations in bacterial and yeast cells. *arch. biol. sci.*, 2005, 57 (3):163-172.

KOWALSKI, W., BAHNFLETH, W., WITHAM, D., SEVERIN, B., WHITTAM, T. Mathematical Modeling of Ultraviolet Germicidal Irradiation for Air Disinfection. Quantitative Microbiology 2000; 2: 249–270.

MEDEIROS, H., LIMA, S., RESENDE, K., ALMEIDA, R., CAVALCANTI, R., MELO, H., MARIA, J., MEDEIROS, F., LOPES, M. Effect of *Lippia origanoides* H.B.K. essential oil in the resistance to aminoglycosides in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. European Journal of Integrative Medicine 2014.

MADRONICH, S., MCKENZIE, RL., BJÖRN, LO., y CALDWELL, MM. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 1998; 46 (1-3): 5-19.

MARROT L, BELAÏDI JP, MEUNIER JR: The importance of UVA photoprotection as shown by genotoxic related endpoints: DNA damage and p53 status. *Mutat Res* 2005; 571: 175-184.

MATSUMURA, Y., ANANTHASWAMY, H. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2004, 195 (3): 298-308.

MÉNDEZ, R., SERRANO, J., CHATAING, B., Jimenez, D., MORA, D., ROJAS, L., USUBILLAGA, A., O'CALLAGHAN. Estudio Comparativo de la Actividad Biológica del Aceite Esencial *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March y el Aceite Esencial *Lippia organoides* Hbk Sobre Tres Especies de *Nocardia* sp. *Salud y Desarrollo Social* 2007, 6:49-52.

MENESES, R., OCAZIONES, R., MARTINEZ, J. STASHENKO, E. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on Yellow Fever Virus replication *in vitro*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2009, 8: 1-6

MEZZOUG, A., ELHADRI, A., DALLOUH, A., AMKISS, S., SKALI, N.S., ABRINI, J., ZHIRI, A., BAUDOUB, D., DIALLO, B., EL JAZIRI, M., IDAOMAR, M. Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. *Mutation Research* 2007, 629: 100–110.

MUÑOZ-ACEVEDO, A., KOUZNETSOV, V., STASHENKO, E. Composición y capacidad antioxidante *in-vitro* de aceites esenciales ricos en Timol, Carvacrol, *trans*-Anetol o Estragol. *Salud UIS* 2009; 41: 287-294

NERIO, L., OLIVERO-VERBEL, J., STASHENKO., E. Repellent activity of essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera). *Journal of Stored Products Research* 2009; 45: 212–214

NIKOLIĆ, S., KECK, C., ANSELMINI, C., MÜLLER, R. Skin photoprotection improvement: Synergistic interaction between lipid nanoparticles and organic UV filters. *International Journal of Pharmaceutics* 2011; 414: 276–284

OLIVEIRA, DR., LEITÃO, GG., BIZZO, HR., LOPES, D., ALVIANO, DS., ALVIANO, CS., y LEITÃO, SG. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* HBK. Food Chemistry 2007, 101 (1): 236-240.

OLIVEIRA, D., LEITÃO, G., FERNANDES, P., LEITÃO, S. Ethnopharmacological studies of *Lippia origanoides* Rev Bras Farmacogn 2014; 24: 206-214

OLIVERO-VERBEL, J., CABALLERO-GALLARDO, K., JARAMILLO-COLORADO, B., STASHENKO, E., Actividad repelente de los aceites esenciales de *Lippia origanoides*, *Citrus sinensis* y *Cymbopogon nardus* cultivadas en Colombia frente a *Tribolium castaneum*, Herbst. Salud UIS 2009; 41: 244-250.

PASCUAL, P., SLOWING, K., CARRETERO, S., MATA, S., VILLAR, A. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology. Journal of Ethnopharmacology 2001; 76: 201–214

QUILLARDET, P., HUISMAN, O., D'ARI, R., y HOFNUNG, M. SOS Chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. Proceedings of the National Academy of Sciences 1982, 79 (19): 5971-5975.

QUILLARDET, P., y HOFNUNG, M. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. Mutation Research 1985; 147 (3): 65-78.

QUILLARDET, P & HOFNUNG, M. Induction by UV Light of the SOS Function *sfia* in *Escherichia coli* Strains Deficient or Proficient in Excision Repair. Journal of Bacteriology 1984: 35-38

QUILLARDET, P., ROUFFAUD, M-A., BOUIGE, P. DNA array analysis of gene expression in response to UV irradiation in *Escherichia coli*. Research in Microbiology. 2003, 154: 559–572

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

RAPOSO, A., RAMOS, J., MACIEL, T., FREIRE, M., LOPES, A., DANTAS, A., BRESSAN, R. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. Experimental Parasitology 2012; 32: 123–128.

RAVANAT, J.L., DOUKI, T., CADET J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 2001; 63: 88-102.

RIBEIRO, A., ANDRADE, E., SALIMENA, F., MAIA, J. Circadian and seasonal study of the cinnamate chemotype from *Lippia organoides* Kunth. *Biochemical Systematics and Ecology* 2014; 55: 249-259

RODRÍGUEZ, D., SANABRIA, M. Efecto del extracto de tres plantas silvestres sobre la rizoctoniosis, la mancha sureña del maíz y los patógenos que las causan. *ISSN* 2005; 30 (12): 739-744.

ROSENBERG, M., ECHOLS, H.. Differential recognition of ultraviolet lesions by RecA protein. *The Journal of Biology Chemistry* 1990; 265: 20641-20645.

RUIZ, C., TUNAROSA, F., MARTINEZ, J., STACHENKO, E. Estudio comparativo por GC-MS de metabolitos secundarios volátiles de dos quimiotipos de *Lippia organoides* H.B.K., obtenidos por diferentes técnicas de extacción. *Scientia et Technica* 2007; 33: 325-328.

SANCAR, A., and RUPP, WD. A Novel Repair Enzyme: UVRABC Excision Nuclease of *Escherichia coli* Cuts a DNA Strand on Both Sides of the Damaged Region. *Cell*. May 1983, 33 (1): 249-260.

SATO T, CHIKASAWA K, YAMAMORI H, OSE Y, NAGASE H, KITO H: Evaluation of the SOS Chromotest for the detection of antimutagens. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1991, 17: 258-263.

STAMMATI, A., BONSI, P., ZUCCO, F., MOEZELAAR, R., ALAKOMI, H.L., WRIGHT, A. Toxicity of Selected Plant Volatiles in Microbial and Mammalian Short-term Assays. *Food and Chemical Toxicology*, 1999; 37: 813-823

STANOJEVIĆ, J., BERIĆ, T., OPAČIĆ, B., VUKOVIĆ-GAČIĆ, B., SIMIĆ, D., KNEŽEVIĆ-VUKČEVIĆ, J. The effect of essential oil of basil (*Ocimum basilicum* L.) on UV-induced mutagenesis in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *arch. Biol. Sci.*, 2008; 60 (1): 93-102.

STASHENKO, E., JARAMILLO B.E, MARTÍNEZ, J. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. Revista Academia Colombiana de Ciencias 2003, 27: 579 – 595.

STASHENKO, E., RUIZ, C., MUÑOZ., CASTAÑEDA, M., MARTÍNEZ, J. Composition and antioxidant activity of essential oils of *Lippia organoides* HBK grown in Colombia. Natural Product Communications 2008, 3: 563 – 566.

STASHENKO, E., MARTINEZ, J., RUIZ, C., ARIAS, G., DURAN, C., SALGAR, C., CALA, M. *Lippia organoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *J. Sep. Sci* 2010; 33: 93–103.

STASHENKO, E., MARTINEZ, J., CALA, M., DURAN, C., CABALLERO, D. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. *J. Sep. Sci.* 2013; 36: 192–202

TELES, S., PEREIRAB, A., MUNIZ, L., MALHEIROB, L., LUCHESEC, A., SILVAA, F. *Lippia organoides* H.B.K. essential oil production, composition, and antioxidant activity under organic and mineral fertilization: Effect of harvest moment. *Industrial Crops and Products* 2014; 60: 217–225

VICUÑA, G., STASHENKO, EE., y FUENTES, JL. Chemical composition of the *Lippia organoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin induced DNA damage. *Fitoterapia* 2010; 81 (5): 343-349.

VUKOVIC-GACIC, B., NIKCEVIC, C., BERIC-BJEDOV, T., KNEZEVIC-VUKCĀEVIC', J., SIMIC, D. Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia officinalis* L.) and its monoterpenes against UV-induced mutations in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food and Chemical Toxicology* 2006; 1730–1738

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

ZOGHBI, M., ANDRADE, E., SANTOS, A., SILVA, M., MAIA J. Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br growing wild in the Brazilian Amazon. Flavour and Fragrance 1998; 13: 47-48