

**COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE LA  
ESPECIE *Lippia alba* Y SU EFECTO ANTIGENOTÓXICO FRENTE AL  
DAÑO INDUCIDO POR LA BLEOMICINA EN EL SOS CHROMOTEST**

**MOLKARY ANDREA LÓPEZ DE LA TORRE**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
BUCARAMANGA  
2010**

**COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE LA  
ESPECIE *Lippia alba* Y SU EFECTO ANTIGENOTÓXICO FRENTE AL  
DAÑO INDUCIDO POR LA BLEOMICINA EN EL SOS CHROMOTEST**

**MOLKARY ANDREA LÓPEZ DE LA TORRE**

**Trabajo de Grado presentado como requisito  
para optar al título de Bióloga**

**Director:  
JORGE LUÍS FUENTES, MICROBIÓLOGO, Ph.D.**

**Co-directora:  
ELENA STASHENKO, QUÍMICA, Ph.D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
BUCARAMANGA  
2010**



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Doctor Jorge Luis Fuentes Lorenzo por la oportunidad de trabajar en este proyecto, por la confianza depositada y por el constante apoyo intelectual y personal. Por todas sus enseñanzas que indudablemente serán de invaluable valor en mi desempeño como profesional.

A la Doctora Elena Stashenko por su participación constante, apoyo y aporte intelectual en el desarrollo del proyecto.

A la Vicerrectoria de Investigación y Extensión y al CENIVAM por la financiación del proyecto.

A Mis padres Myriam E. De La Torre y Zoilo A. López por su confianza y respaldo constante en todas las decisiones importantes de mi vida, a mis hermanos y sobrinos por su apoyo y gran cariño.

A los miembros del laboratorio de Cromatografía y el CENIVAM, especialmente a William, Deyanira, Camilo, Andreita, Hans, Carlos y Ginna por sus asesorías técnicas y consejos.

A los miembros del laboratorio de Mutagénesis Ambiental y Microbiología por su compañerismo y apoyo en el desarrollo del presente trabajo, especialmente a Gloria Vicuña.

A los profesores de la escuela de Biología por sus enseñanzas.

A mi amiga de siempre en la carrera, Angélica Cogollo, por estar presente.

Y a todos aquellos que de una u otra forma, fueron apoyo y aporte en el desarrollo del presente trabajo, Muchas gracias.

## CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO	4
1.1 LOS ACEITES ESENCIALES	4
1.2 MERCADO DE LOS ACEITES ESENCIALES	5
1.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES	6
1.4 DETERMINACIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES	7
1.5 EL GÉNERO <i>Lippia</i>	9
1.6 EL SOS CHROMOTEST	13
1.9 BLEOMICINA	14
2. METODOLOGÍA	15
2.1 MATERIAL VEGETAL	15
2.2 EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE <i>Lippia alba</i>	16
2.3 PREPARACIÓN DE MUESTRAS	16
2.4 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE <i>Lippia alba</i>	17
2.5 IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE LOS ACEITES ESENCIALES DE <i>Lippia alba</i>	17

2.6	CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE LOS ACEITES ESENCIALES DE <i>Lippia alba</i>	19
2.7	CEPA DE ENSAYO Y CONDICIONES DE CULTIVO	19
2.8	ENSAYO DE GENOTOXICIDAD.	20
2.8.1	Ensayos enzimáticos.	21
2.8.1.1	<i>Ensayo enzimático <math>\beta</math>-galactosidasa (<math>\beta</math>g).</i>	21
2.8.1.2	<i>Ensayo enzimático fosfatasa alcalina (FA).</i>	21
2.8.2	Criterio de genotoxicidad.	22
2.9	ENSAYO DE ANTIGENOTOXICIDAD	23
2.9.1	Criterio de antigenotoxicidad	23
2.10	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	24
3.	RESULTADOS	25
3.1	EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE <i>Lippia alba</i>	25
3.2	COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE <i>Lippia alba</i>	25
3.3	EFFECTO GENOTÓXICO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE <i>Lippia alba</i>	30
3.4	EFFECTO ANTIGENOTÓXICO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE <i>Lippia alba</i>	31
3.5	EFFECTO GENOTÓXICO DE LOS COMPUESTOS MAYORITARIOS DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Lippia alba</i>	32

3.6	EFFECTO ANTIGENOTÓXICO DE LOS COMPUESTOS MAYORITARIOS DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Lippia alba</i>	34
4.	DISCUSIÓN	37
5.	CONCLUSIONES	41
6.	RECOMENDACIONES	42
7.	BIBLIOGRAFÍA	43

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estructuras químicas de los compuestos mayoritarios de aceites esenciales de *Lippia alba* (cultivadas en Colombia). Quimiotipo I: citral (geranial, neral); Quimiotipo III: (carvona y limoneno). 11
- Figura 2.** *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. 15
- Figura 3.** Espectrofotometro *Sensident Scan RS-232c*. 22
- Figura 4.** Perfiles cromatográficos de los aceites esenciales de *Lippia alba*. 29

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Tratamientos utilizados en la evaluación de la genotoxicidad de los aceites esenciales y sus compuestos mayoritarios.	20
<b>Tabla 2.</b> Composición química de los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> obtenidos por la técnica Hidrodestilación Asistida por Radiación Microondas.	26
<b>Tabla 3.</b> Clasificación de los compuestos por familias, presentes en los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> .	28
<b>Tabla 4.</b> Efecto genotóxico de los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> , medido en el ensayo SOS Chromotest.	30
<b>Tabla 5.</b> Efecto antígenotóxico de los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> , medido en el ensayo SOS Chromotest.	32
<b>Tabla 6.</b> Estudio de la genotoxicidad de los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> , mediante el ensayo SOS Chromotest.	33
<b>Tabla 7.</b> Efecto antígenotóxico del citral (compuesto mayoritario especimen COL512077) y Trolox, frente al daño inducido por la bleomicina, medido en el ensayo SOS Chromotest.	35
<b>Tabla 8.</b> Efecto antígenotóxico de la carvona y el limoneno (compuestos mayoritarios de especimen COL512078), frente al daño inducido por la bleomicina, medido en el ensayo SOS Chromotest.	36

## RESUMEN

**TITULO: COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE LA ESPECIE *Lippia alba* Y SU EFECTO ANTIGENOTÓXICO FRENTE AL DAÑO INDUCIDO POR LA BLEOMICINA EN EL SOS CHROMOTEST \***

**AUTOR: MOLKARY ANDREA LÓPEZ DE LA TORRE \*\***

**PALABRAS CLAVE:** *Lippia alba*, aceites esenciales, antigenotoxicidad, bleomicina, SOS Chromotest.

El presente trabajo evalúa la composición química y el efecto protector de los aceites esenciales (AE) de la especie *Lippia alba* contra la genotoxicidad inducida por la bleomicina en la enterobacteria *Escherichia coli* K12, cepa PQ-37. La extracción de los aceites esenciales fue realizada por medio de hidrodestilación asistida por radiación microondas y la composición de los aceites esenciales fue determinada por Cromatografía de gases/Espectrometría de masas (CG-EM). Los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Lippia alba* fueron citral (33 % geranial y 25 % neral), geraniol (7 %) y *trans*- $\beta$ -cariofileno (7 %) para el espécimen COL512077; y carvona (38 %), limoneno (33 %), biciclosesquifelandreno (8 %) para espécimen COL512078. La genotoxicidad y antigenotoxicidad de los aceites esenciales y sus compuestos mayoritarios (citral, carvona y limoneno) fueron ensayados usando el SOS Chromotest en *Escherichia coli* PQ-37. Los aceites esenciales fueron no genotóxicos en el SOS Chromotest. Sin embargo uno de sus compuestos mayoritarios (limoneno) muestra incrementos del factor de inducción SOS a dosis entre 91 y 1457 mM. Ambos aceites protegen las células bacterianas contra el efecto genotóxico inducido por la bleomicina. La antigenotoxicidad de los dos quimiotipos de *Lippia alba* fue relacionada con sus compuestos mayoritarios, citral y carvona, respectivamente; siendo el citral el compuesto con mayor potencial quimiopreventivo. Los resultados del trabajo fueron discutidos en relación al potencial quimiopreventivo de los aceites esenciales de *Lippia alba* y de sus compuestos mayoritarios, así como en relación a su mecanismo de acción antígenotóxico.

\* Proyecto de Grado.

\*\* Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Biología.  
Director: Jorge Luis Fuentes, Ph.D. y Co-Directora: Elena Stashenko, Ph.D.

## ABSTRACT

**TITLE: CHEMICAL COMPOSITION OF THE *Lippia alba* ESSENTIAL OILS AND ITS ANTIGENOTOXICITY AGAINST BLEOMYCIN-INDUCED DNA DAMAGE MEASURED BY SOS CHROMOTEST <sup>1</sup>**

**AUTHOR: MOLKARY ANDREA LÓPEZ DE LA TORRE <sup>2</sup>**

**KEYWORDS:** *Lippia alba*, essential oils, antigenotoxicity, bleomycin, SOS Chromotest.

The present work evaluated chemical composition and the DNA protective effect of the essential oils (EO) from *Lippia alba* against bleomycin-induced genotoxicity in *Escherichia coli* K12 cells, PQ-37 strain. The oils extraction was conducted by microwave assisted- distillation and their chemical composition was determined by Gas Chromatography / Mass Spectrometric (GC-MS) analysis. The major compounds of *L. alba* EO were citral (33 % geranial and 25 % neral), geraniol (7 %) and *trans*- $\beta$ -caryophyllene (7 %) for specimens COL512077; and carvone (38 %), limonene (33 %), *bis*-cyclohexylidene (8 %) for specimens COL512078. The genotoxicity and antigenotoxicity of the EO and its major compounds (citral, carvone and limonene) were assayed using the SOS Chromotest in *Escherichia coli* PQ-37 cells. The EO were not genotoxic in the SOS Chromotest, but one of the major compound (limonene) showed increased SOS induction values for dose between 91 y 1457 mM. Both EO protected bacterial cells against bleomycin-induced genotoxicity. The antigenotoxicity for the two *L. alba* chemotypes was related with its major compounds, citral and carvone, respectively, being the citral the compound with higher chemopreventive potential. The work results were discussed in relation to the chemopreventive potential of *L. alba* EO and its major compounds as well as their antigenotoxic mode of action.

<sup>1</sup> Thesis Project.

<sup>2</sup> Industrial University of Santander, Science Faculty, Biology School.

Tutor: Jorge Luis Fuentes, Ph.D. y Co-Tutor: Elena Stashenko, Ph.D.

## INTRODUCCIÓN

Hoy se acepta, que las plantas medicinales contienen valiosos compuestos terapéuticos con estructuras químicas muy efectivas, las cuales han sido seleccionadas por mecanismos evolutivos durante millones de años (Newman *et al.*, 2002; Boldi, 2004; Clardy y Walsh, 2004; Koehn y Carter, 2005).

Muchas de las drogas modernas tienen su origen en la medicina tradicional y existe gran expectativa sobre el futuro papel de la etnofarmacología en el desarrollo de medicamento (Cordell y Colvard, 2005). Se estima que entre el 25 y 30 % del total de las drogas terapéuticas disponibles en el mercado mundial son derivadas de productos naturales. El mercado de tales drogas, se ha incrementado grandemente durante los últimos 10 años, especialmente en países europeos como Alemania, Francia, Italia, Inglaterra, España; y más recientemente, en los Estados Unidos (Calixto, 2005; Gilani y Rahman, 2005; Patwardhan, 2005).

Dentro de sus propiedades beneficiosas, las plantas contienen productos útiles como agentes quimiopreventivos (Scartezzini y Speroni, 2000; Park y Pezzuto, 2002; Balunas y Kinghorn, 2005; Issa *et al.*, 2006). El interés de los investigadores por desarrollar este tipo de productos es creciente, dado por las ventajas que supone la prevención como modalidad para disminuir la incidencia de cáncer. A diferencia de los agentes antitumorales de origen vegetal usados comúnmente para el tratamiento del cáncer (Pezzuto, 1997; Graham *et al.* 2000; Cragg y Newman, 2005; Shoemaker *et al.*, 2005), los agentes quimiopreventivos

inhiben el proceso tumoral en fases tempranas de su desarrollo; y se supone que éstos deben ser usados a dosis relativamente más bajas (De Flora y Ferguson, 2005).

La prevención en poblaciones sanas frente a enfermedades relacionadas con las mutaciones como es el caso del cáncer, implica tanto una revisión del estilo de vida, evitar su exposición a reconocidos carcinógenos en el lugar de trabajo y en el hogar; así como, una adecuada quimioprevención. Las medidas que progresivamente se han ido aplicando para evitar o disminuir la exposición a este tipo de agentes ambientales han sido muy útiles, sobre todo en el campo de la exposición ocupacional y, evidentemente, deben ampliarse promoviendo cambios en determinados hábitos y disminuyendo la contaminación ambiental. Junto a estas medidas a potenciar, la quimioprevención o inhibición de los procesos carcinogénicos por medio de agentes quimiopreventivos (Sporn y Suh, 2000), está cobrando cada vez un mayor relieve. Recientes trabajos, enfatizan el uso de aceites esenciales como fuente antitumoral, anti-carcinogénica y agentes quimiopreventivos (Bakkali *et al.*, 2008, Kaefer y Milner 2008).

El género *Lippia* perteneciente a la familia de las Verbenáceas, con más de 200 especies, cuenta con gran interés por la alta diversidad de compuestos en sus aceites esenciales, con aplicación en la industria medico-farmacéutica, textil, cosmética y alimenticia (Stashenko *et al.*, 2003). *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae) es un arbusto aromático, originario del bosque tropical y subtropical americano (Bandoni, 2000). En Colombia, *Lippia alba* es popularmente conocida como “Orégano de cerro”, “Pronto alivio” y “Curatodo” dependiendo de la ciudad (Stashenko *et al.*, 2003). La especie se caracteriza por la

variabilidad en la composición de sus aceites esenciales, dependiendo del origen del material vegetal, el estado de la planta y la parte de la planta seleccionada para destilar el aceite esencial (Zoghbi *et al.*, 1998). Esta especie ha sido usada en remedios tradicionales contra enfermedades digestivas y respiratorias pero también como analgésico, antiinflamatorio y antihipertensivo (Pascual *et al.*, 2001a; Hennebelle *et al.*, 2008a). Stashenko *et al.* (2004), demostraron su actividad antioxidante *in vitro*, lo cual sugiere su potencial como quimiopreventivo frente a agentes de tipo oxidativo.

En este estudio, se determinó la composición de los aceites esenciales de dos especímenes de *Lippia alba* por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y se evaluó la actividad antigenotóxica de estos aceites contra el mutágeno clastogénico bleomicina por medio del ensayo SOS Chromotest (Quillardet *et al.*, 1982). Las propiedades antigenotóxicas de los compuestos mayoritarios (cital, carvona y limoneno) fueron también estudiadas y su actividad se comparó con un compuesto estándar con efecto antioxidante (Trolox®). El presente proyecto, aporta nuevo conocimiento sobre la actividad biológica de los aceites esenciales de la especie aromática *Lippia alba*, en particular, sobre sus actividades genotóxica y antigenotóxica. Adicionalmente, el estudio permitió identificar los compuestos responsables de la bioactividad detectada, los cuales se muestran con potencial en la prevención de enfermedades relacionadas con la mutación, como el cáncer.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 LOS ACEITES ESENCIALES

Un aceite esencial o esencia se define como una mezcla de compuestos, que hacen parte del metabolismo de un vegetal, generalmente son terpenos, que están asociados o no a otros componentes, la mayoría de ellos volátiles, y generan en conjunto el olor de dicho vegetal (Bandoni, 2000). Son líquidos, liposolubles y solubles en solventes orgánicos, generalmente con una densidad menor que la del agua. Pueden ser sintetizados por todos los órganos de la planta: flores, hojas, tallo, semillas, frutos, raíz, y son almacenados en células secretoras, cavidades, canales, células epidérmicas o tricomas glandulares (Burt, 2004).

Los aceites esenciales tienen diferentes funciones en las plantas, entre ellas figuran: agentes antibacteriales, antivirales, antifúngicos, insecticidas, defensa contra herbívoros y, en algunas flores atraen polinizadores. Aproximadamente 3000 aceites esenciales son conocidos, de los cuales 300 son comercializados por la industria farmacéutica, agronómica, de alimentos, sanitaria, cosmética y de perfumería (Bakkali *et al.*, 2008).

Existen innumerables especies vegetales con propiedades aromáticas. Algunas familias botánicas son tradicionalmente fuente de productos aromáticos, como las Pináceas, Verbenáceas, Mirtáceas, Lamiáceas,

Rutáceas, Lauráceas, Piperáceas, Apiáceas y Asteráceas (Bandoni, 2000, Biocomercio sostenible, 2003).

## **1.2 MERCADO DE LOS ACEITES ESENCIALES**

El mercado internacional de los aceites esenciales es de alrededor de 1300 millones de dólares anuales; siendo los mayores exportadores los Estados Unidos, Francia, Reino Unido, Brasil, China y Argentina (Fundación ExportAr 2003).

En Colombia, los volúmenes de exportación de aceites esenciales son limitados; exportándose principalmente aceites de eucalipto, anís y de algunos cítricos a países andinos como Perú, Ecuador y Venezuela. El mayor volumen de importaciones en Colombia es realizada por las casas de sabores y por empresas de alimentos y bebidas, multinacionales que operan en el país y realizan la importación directamente de sus casas matrices en el exterior (Biocomercio Sostenible, 2003; Fundación ExportAr, 2003).

Los aceites esenciales son materias primas e insumos industriales, útiles en diferentes industrias, tales como:

**Industria de las fragancias** (perfumes, cosméticos, aseo y limpieza, plásticos, textiles, pinturas, papelería).

**Industria de sabores o aromas** (alimentos, licores, medicamentos, tabacos y cigarrillos).

**Industria de productos para medicamentos** (medicina alternativa, aromaterapia).

**Industria con otras actividades químicas** (biocida, disolvente, petroquímica).

### **1.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES**

Para la obtención de los aceites esenciales se conocen diferentes técnicas, entre ellas: la hidrodestilación, la hidrodestilación asistida por radiación microondas, la destilación mediante arrastre con vapor, entre otras (Bandoni 2000, Stashenko *et al.*, 2004). Estas técnicas serán descritas a continuación.

#### **1.3.1 Hidrodestilación**

La hidrodestilación consiste en llevar a estado de ebullición una suspensión acuosa de un material vegetal, de tal manera, que los vapores generados puedan ser condensados y colectados. El aceite que es inmiscible con agua, se separa posteriormente.

#### **1.3.2 Hidrodestilación asistida por radiación microondas**

Esta técnica fue patentada originalmente en Canadá por Paré *et al.*, (1989), y consiste en calentar el material vegetal inmerso en agua en un horno microondas. Al aumentar la temperatura del medio, se rompen las estructuras celulares que contienen a la esencia por efecto de su presión de vapor. El aceite esencial es arrastrado por el vapor de agua, condensado y colectado. La principal ventaja que presenta esta técnica es su velocidad, pues pueden lograrse extracciones en minutos.

#### **1.3.3 Destilación mediante arrastre con vapor**

Es una técnica en la cual se emplea dos líquidos inmiscibles y consiste en una vaporización a temperaturas inferiores a las de la ebulliciones de

cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua, el cual ejerce la doble función de calentar la mezcla hasta su punto de ebullición y disminuir la temperatura de ebullición por adicionar la tensión de vapor, del vapor que se inyecta, a la de los componentes volátiles de los aceites esenciales. Los vapores que salen del cuello de cisne se enfrían en un condensador donde regresan a la fase líquida, los dos productos inmiscibles, agua y aceite esencial, finalmente se separan en un decantador o vaso Florentino (Bandoni, 2000).

#### **1.4 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES**

En la actualidad se han desarrollado diferentes técnicas instrumentales de análisis para determinar la composición química de los aceites, entre ellas, las más utilizadas son la cromatografía de gases y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Estas técnicas serán brevemente explicadas a continuación.

##### **1.4.1 Cromatografía de gases**

La cromatografía de gases es una técnica de separación basada en fenómenos de partición entre dos fases: una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria constituida por un líquido muy viscoso retenido en el interior de una columna cromatográfica. El cromatógrafo cuenta con un sistema de inyección que permite introducir la muestra en la columna, y con un detector que registra las diferentes sustancias a medida que van eluyendo de la columna, una vez separadas. La columna se coloca en un horno con temperatura regulable y programable. Las columnas cromatográficas utilizadas actualmente son de tipo capilar: constituidas

por un tubo de cuarzo flexible (sílice fundido) de diámetro muy pequeño (normalmente 0,25mm) y muy largo (25 a 60 m, hasta 200m): estas proporcionan alta resolución y permiten separar las mezclas multicomponente con diversa polaridad o peso molecular de sus constituyentes.

En el proceso de separación la muestra es vaporizada y llevada por la fase móvil hacia la columna, basada en sus solubilidades a una temperatura dada. Los componentes de la muestra (llamados solutos o analitos) se separan con base en sus presiones de vapor relativo y afinidad con la columna estacionaria. Este tipo de proceso cromatográfico se llama elución (Bandoni, 2000; Grob, 1995).

Para la identificación de los componentes de los aceites esenciales en cromatografía de gases se utilizan los tiempos de retención, tiempos de retención relativos y los índices de retención. Los más usados son los índices de Kováts (Kováts, 1965), que se calculan respecto a una serie de *n*-alcanos. La definición de estos índices es de gran aporte para la identificación de los componentes de las mezclas. Sin embargo, la determinación no puede basarse solo en ellos, ya que diferentes compuestos tienen a veces índices muy similares. Por ello, se emplean en combinación con los índices de retención otras técnicas como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

#### **1.4.2 Espectrometría de masas**

La espectrometría de masas es una técnica instrumental que consiste en ionizar una molécula neutra con electrones (70 eV) o por ionización química. La identificación de los componentes de los aceites esenciales

se realiza con base en sus espectros de iones positivos separados teniendo en cuenta su relación masa/carga.

En un espectro de masas, se observan, en abscisas, la relación masa/carga de los iones formados al fragmentarse la molécula y, en ordenadas, la intensidad (abundancia) de cada uno de los iones formados. Varios analizadores másicos (magnético, cuadrupolar, de trampa iónica) se utilizan para obtener espectros de masas (Bandoni, 2000).

#### **1.4.3 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas**

Es una técnica de acoplamiento de la cromatografía de gases con la espectrometría de masas, que combina la separación de componentes con su selectiva y sensible detección (Grob, 1995; Mc Nair y Miller, 1998).

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas permite realizar en una sola operación, para muestras del orden de 1 µl, un análisis cualitativo junto con una indicación de las proporciones en las que se encuentran los componentes. Es un método muy adecuado para la identificación de los compuestos de los aceites esenciales, debido a que éstos son volátiles y de bajo peso molecular.

### **1.5 EL GÉNERO *Lippia***

El género *Lippia*, pertenece a la familia Verbenaceae e incluye aproximadamente 200 especies de hierbas, arbustos y pequeños arboles; distribuidos principalmente en zonas tropicales de África, Centro y Sur América. Las especies de este género se caracterizan por ser muy aromáticas, de hojas simples, posición opuesta o decusada, con margen entero o cerrado, flores zigomorfas, generalmente

hermafroditas y pequeñas, formando cabezuelas (Judd *et al.*, 1999; Bandoni, 2000).

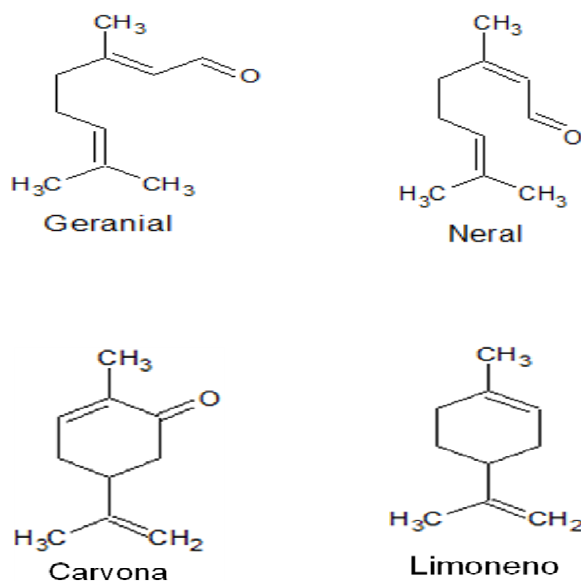
Diferentes especies del género *Lippia* han sido usados como remedios tradicionales, se les atribuye propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antiulcerativa, antimicrobiana, entre otras. Tradicionalmente se destaca su uso en desórdenes gastrointestinales y respiratorios, algunas especies se utilizan como condimento (Viana *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 2005; Pascual *et al.*, 2001b; Oliveira *et al.*, 2007).

Dentro de la diversidad del género *Lippia*, la especie *Lippia alba* es un arbusto originario del bosque tropical y subtropical americano. Es ampliamente distribuido en América, desde México, Centro América y América del Sur. Tiene hojas pequeñas, aserradas, opuestas, aromáticas y de color verde. Las flores se presentan en grupo, pequeñas y rosadas. Por su contenido en aceites esenciales, es de amplio uso en la medicina tradicional (Bandoni, 2000).

La especie *Lippia alba* se caracteriza por la variabilidad en la composición química de sus aceites esenciales. Con base en esa variabilidad, se han propuesto diferentes quimiotipos (Pascual *et al.*, 2001a; Hennebelle *et al.*, 2006, 2007, 2008; Oliveira *et al.*, 2006). Los quimiotipos son definidos como individuos de una misma especie, que se diferencian entre sí por la composición de sus metabolitos secundarios debido a condiciones geobotánicas, fisiológicas y genéticas de la plantas (Bandoni, 2000).

Hennebelle *et al.* (2006), define un sistema de clasificación de *Lippia alba* en siete quimiotipos con base en la composición y las rutas

biosintéticas comunes para los diferentes compuestos. Así, el Quimiotipo I tiene citral, linalool y  $\beta$ -cariofileno como mayores constituyentes (cuatro subtipos). En el quimiotipo II el compuesto mayoritario es la tagetenona. El quimiotipo III contiene como compuestos mayoritarios el limoneno y la carvona o cetonas monoterpénicas biosintéticamente relacionadas, siendo este quimiotipo el más común. El quimiotipo IV contiene mirceno, el quimiotipo V,  $\gamma$ -terpineno, el quimiotipo VI, alcanfor y 1,8-cineol, y el quimiotipo VII, estragol. En Colombia, se han identificado los quimiotipos I y III, y un quimiotipo raro, que es la combinación de estos dos últimos (Stashenko *et al.*, 2010).



**Figura 1.** Estructuras químicas de los compuestos mayoritarios de aceites esenciales de *Lippia alba*, (cultivada en Colombia). Quimiotipo I: citral (geranial y neral); Quimiotipo III: carvona y limoneno.

El aceite esencial, extractos o compuestos mayoritarios de *Lippia alba* muestran actividad antiviral, antibacterial, antifúngico y antiparasitico (Pino *et al.*, 1996, Abad *et al.*, 1997, Andrighetti-Frohner *et al.*, 2005, Teixeira-Duarte *et al.*, 2005, de Carvalho y da Fonseca 2006, Oliveira *et al.*, 2006, Sena-Filho *et al.*, 2006, Paduch *et al.*, 2007, Ara *et al.*, 2009, Arruda *et al.*, 2009), soportando su uso en el tratamiento de enfermedades de origen microbiano. Adicionalmente a las propiedades antimicrobianas, los aceites esenciales de *Lippia alba* muestran efectos como analgésico, antiinflamatorio y sedativo en modelos de mamíferos; propiedades que están relacionadas con los compuestos mayoritarios del aceite esencial, citral, mirceno y limoneno (Viana *et al.*, 1998, 2000, Vale *et al.*, 1999, 2002). Así mismo, los extractos etanólicos de *Lippia alba* muestran efecto sedativo (Zètola *et al.*, 2002, Hennebelle *et al.*, 2007, 2008b) y los extractos acuosos reducen la tasa cardiaca y la ulceración gástrica inducida por indomethacin en ratas (Pascual *et al.*, 2001b, Gazola *et al.*, 2004).

Trabajos recientes enfatizan el uso de aceites esenciales como fuente de agentes antitumorales, anti-carcinogénico (Bakkali *et al.*, 2008, Kaefer y Milner, 2008). *Lippia alba* cuenta con demostrado efecto antioxidante *in vitro* (Stashenko *et al.*, 2004), que soporta su potencial uso como quimiopreventivo. En tal sentido, las propiedades quimiopreventivas de terpenoides de *Lippia alba* como limoneno, carvona y alcohol perílico están bien documentadas (de Carvalho y da Fonseca, 2006, Paduch *et al.*, 2007, Rabi y Bishayee, 2009), pero poco es conocido sobre la actividad quimiopreventiva de otros constituyentes del aceite esencial de *Lippia alba*, como citral (Nakamura *et al.*, 2003, Seo *et al.*, 2008). Todos estos estudios, y otros no referenciados, validan las propiedades biológicas de los aceites esenciales de la

especie *Lippia alba* y evidencian la necesidad de profundizar en el conocimiento sobre las propiedades quimiopreventivas y genotóxicas de sus aceites esenciales y compuestos mayoritarios.

## 1.6 SOS CHROMOTEST

El SOS Chromotest es un ensayo colorimétrico desarrollado para la detección de carcinógenos descrito por Quillardet *et al.* (1982). El ensayo utiliza la enterobacteria *Escherichia coli* PQ37 para monitorear de la expresión del gen *sfiA* (un gen regulado por la respuesta SOS) por medio de una fusión transcripcional con el gen *lac Z*, el gen estructural de la  $\beta$ -galactosidasa. Esta cepa cuenta con otras características relevantes relacionadas a continuación. Una delección en operón *lac* que la hace deficiente en la síntesis de  $\beta$ -galactosidasa; de tal manera, que la síntesis de esta enzima está totalmente supeditada a la inducción del gen *sfiA* producto de la exposición a agentes que dañan el ADN bacteriano. La cepa cuenta además, con una mutación en el gen *uvrA* que la hace deficiente en la reparación por excisión de nucleótidos, una mutación en el gen *rfa* que la hace más permeable a los compuestos químicos por una deficiencia en los polisacáridos de membrana, y una mutación que la hace constitutiva para la actividad Fosfatasa alcalina, lo que permite evaluar la toxicidad de los agentes evaluados mediante la inhibición de síntesis de proteínas (Quillardet *et al.*, 1982, 1985, 1989).

El SOS Chromotest presenta ventajas frente a otros ensayos, dado que los resultados se obtienen en apenas unas horas, no requiere un laboratorio especializado ni esterilidad de la muestra. La sensibilidad y reproducibilidad del ensayo es comparable con las de otros ensayos de

amplio uso como el ensayo de reversión génica en *Salmonella typhimurium*; por lo que ha sido ampliamente utilizado para la evaluación de agentes mutagénicos y carcinogénicos (Quillardet *et al.*, 1985; Ohta *et al.*, 1984; Von der Hude *et al.* 1988; Miertus *et al.* 1987; Mersch-Sundermann *et al.* 1994).

### **1.7 BLEOMICINA**

La bleomicina es una familia de antibióticos glicopéptidos aislados de *Streptomyces verticillus* (Umezawa *et al.* 1966). Tiene una potente actividad antitumoral contra diferentes tipos de linfomas, cáncer de cabeza, cuello y tumores en células germinales (Chen y Stubbe, 2005; Hecht S., 2000). Los efectos mutagénicos y citotóxicos de la bleomicina revelan su habilidad para causar daño en el ADN produciendo roturas de simple y doble cadena del enlace fosfodiéster azúcar-fosfato, además de producir oxidación de lípidos, hidrolizar puentes amino de proteínas y promover eventos de clivaje en el RNA. El daño ocasionado es similar al de las radiaciones ionizantes, por lo cual se le considera como un radiomimético (Claussen y Long, 1999).

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 MATERIAL VEGETAL

Las plantas de *Lippia alba* fueron colectadas en los canteros experimentales del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), localizado en el campus de la Universidad Industrial de Santander. La identificación taxonómica de la especie fue realizada por el Dr. José Luis Fernández Alonso, en el Herbario Nacional Colombiano del Instituto de Ciencias Naturales (Universidad Nacional de Colombia, Bogotá). Se utilizaron dos especímenes de *Lippia alba*, identificados con los *vouchers* COL512077 y COL512078.



**Figura 2. *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown.**

## 2.2 EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE *Lippia alba*

Los aceites esenciales fueron extraídos de hojas e inflorescencias de la especie *Lippia alba*, especímenes COL512077 y COL512078. El método utilizado fue hidrodestilación asistida por radiación microondas (MWHD), según el procedimiento descrito por Stashenko *et al.* (2004). El equipo de destilación fue de tipo *Clevenger* con reservorio de destilación *Dean-Stark* y con una adaptación al calentamiento por radiación microondas en un horno doméstico marca *LG- Intelowave*. Para cada extracción, se pesaron 300 g de material vegetal. El tiempo total de cada extracción fue de 60 min, subdividido en cuatro periodos de 15 min, con intervalos de 5 min, entre ellos. La potencia se fijó a 720W.

## 2.3 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación asistida por radiación de microondas se separaron por decantación en la trampa *Clevenger*. El agua residual fue secada con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. Luego, se prepararon las muestras para el análisis cromatográfico tomando 25  $\mu\text{L}$  de aceite esencial, 1  $\mu\text{L}$  de *n*-tetradecano (*Istd*) y aforando con diclorometano a un volumen final de 1mL. Los aceites esenciales obtenidos en las extracciones se almacenaron a 4 °C, para su posterior estudio.

## **2.4 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Lippia alba***

Para la identificación de los compuestos presentes en los aceites esenciales de la especie *Lippia alba*, se usó la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se utilizó un cromatógrafo de gases (equipo *Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5973 Network*), equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250°C, relación de *split* 30:1) y un inyector automático *Agilent 7863*. Se empleó una columna apolar DB5-MS (*J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.*) de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 µm, d<sub>f</sub>, con fase estacionaria de 5% fenil poli (metilsiloxano). El gas de arrastre utilizado fue helio, con una presión de entrada a la cabeza de la columna de 16.47 psi y un flujo constante de 1 mL/min. La temperatura del horno se programó de manera escalonada con una temperatura inicial de 45 °C (5 min), hasta 150 °C (2 min) a 4 °C/min, luego, se aumentó la temperatura hasta 250 °C (5 min) a 5 °C/min, finalmente, se llevó hasta 275 °C (15 min) a 10 °C/min. La temperatura del inyector y del detector fueron 250 y 285 °C, respectivamente.

Los datos cromatográficos y espectrométricos se recopilieron y procesaron con el programa *Hewlett-Packard ChemStation G17001DA* (Versión 00.01.27, 2002).

## **2.5 IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS EN LOS ACEITES ESENCIALES DE *Lippia alba***

La identificación de los compuestos presentes en el aceite esencial se realizó comparando los índices de retención lineales y patrones de

fragmentación obtenidos a partir de los espectros de masas experimentales y comparados con los existentes en las librerías de espectros ADAMS, WILEY 138K, NBS 75K y NIST 02.

Los índices de retención se calcularon teniendo en cuenta los tiempos de retención de una serie homóloga de patrones de hidrocarburos desde C<sub>8</sub> hasta C<sub>25</sub>; los cuales se corrieron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas bajo las mismas condiciones operacionales que los aceites esenciales analizados. Para su cálculo se utilizó la siguiente ecuación:

$$I_K = 100 \cdot n + 100 \left[ \frac{t_{RX} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right] \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

**I<sub>k</sub>** es el índice de retención del compuesto de interés,

**n** es el número de átomos de carbono del *n*-alcano que eluye antes del compuesto de interés,

**t<sub>RX</sub>** es el tiempo de retención del compuesto de interés,

**t<sub>Rn</sub>** es el tiempo de retención de *n*-alcano que eluye antes del compuesto de interés,

**t<sub>RN</sub>** es el tiempo de retención de *n*-alcano que eluye después del compuesto de interés.

## 2.6 CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Lippia alba*

Para la cuantificación de los compuestos presentes en los aceites esenciales se calcularon dos parámetros: la concentración relativa y el porcentaje relativo; los cuales fueron determinados, según las ecuaciones:

$$[ ]_{relativa} = \left[ \frac{A_x \cdot M_A}{A_T \cdot V_A} \right] \quad \text{Ecuación 2}$$

$$\% \text{ relativo} = \frac{A_x \cdot 100}{A_T} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

$A_x$  es el área bajo la curva del pico correspondiente al compuesto de interés,

$M_A$  es la masa del aceite incorporada a la muestra cromatográfica,

$A_T$  es el área bajo la curva de todos los picos cromatográficos,

$V_A$  es el volumen del aceite incorporado a la muestra cromatográfica.

## 2.7 CEPA DE ENSAYO Y CONDICIONES DE CULTIVO

El estudio de la antigenotoxicidad fue realizado con la enterobacteria *Escherichia coli* PQ37 de genotipo *F thr leu his-4 pyrD thi galE or galT lac ΔU169 srl300:: Tn10 rpoB rpsL rfa trp::Muc<sup>+</sup> SfiA::Mud(Ap, lac)cts.*; la cual fue crecida en 20 mL de medio Luria Bertani (Tryptona 10 g, Extracto de levadura 5 g, cloruro de sodio 10 g), suplementado con 50

µg/mL de ampicilina y 17 µg/mL de tetraciclina, e incubada a 37° C con agitación permanente durante toda la noche.

Al día siguiente el cultivo fue diluido, mezclando 2 mL del medio crecido con 20 mL de medio fresco debidamente suplementado, y se incubó a 37°C con agitación permanente (durante aproximadamente dos horas) hasta obtener una densidad óptica de 0.4 a 600 nm.

## 2.8 ENSAYO DE GENOTOXICIDAD

La genotoxicidad de los aceites esenciales y de sus compuestos mayoritarios fue evaluada usando el ensayo SOS Chromotest (Quillardet *et al.*, 1982), como se describe en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Tratamientos utilizados en la evaluación de la genotoxicidad de los aceites esenciales y sus compuestos mayoritarios.

Tratamiento	Células, (µL)	Aceite esencial, (µL)	Agua, (µL)	Bleomicina (2 µg/mL)
Control (+)	500	-	-	500
Control (-)	500	-	500	-
Concen. 1	500	500	-	-
Concen. 2	500	500	-	-
Concen. 3	500	500	-	-
Concen. 4	500	500	-	-
Concen. 5	500	500	-	-
Concen. 6	500	500	-	-

Para cada tratamiento, se desarrollaron un mínimo de tres experimentos independientes y siempre se incluyeron en cada experimento controles positivos (bleomicina, 1 µg/mL) y negativo (agua destilada estéril). Los ensayos enzimáticos fueron realizados por

triplicado para cada tratamiento y en paralelo para la  $\beta$ -galactosidasa y la fosfatasa alcalina.

## **2.8.1 ENSAYOS ENZIMÁTICOS**

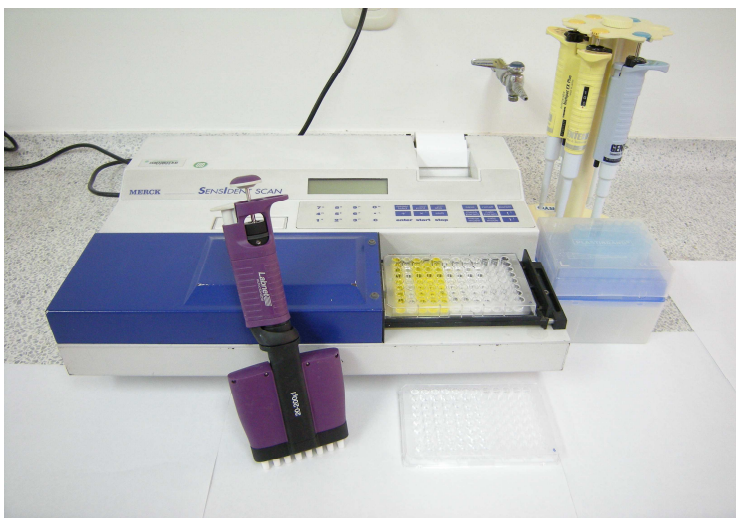
### **2.8.1.1 Ensayo de la $\beta$ -galactosidasa**

Se dispensaron en tubos de ensayo 1400  $\mu$ L de Buffer Z ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2.97 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  1.1 g, KCl 0.15 g,  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  0.049 g, SDS 0.2 g,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.54 mL) y 150  $\mu$ L de células, la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 min, para promover la lisis celular. Luego, se adicionaron 300  $\mu$ L de sustrato 2-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopyranosido y se incubó durante 40 min para desarrollo de color. La reacción se detuvo con 500  $\mu$ L de carbonato de calcio ( $\text{NaCO}_3$ ) 1M y se restauró el color con 500  $\mu$ L de Tris 2 M.

### **2.8.1.2 Ensayo de la fosfatasa alcalina**

Se dispensaron en tubos de ensayo 1300  $\mu$ L de buffer T, 70  $\mu$ L de cloroformo, 50  $\mu$ L de SDS 0.1 % y 150  $\mu$ L de células; la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 min para promover la lisis celular. Luego, se adicionaron 300  $\mu$ L de sustrato p-nitrofenilfosfato y se incubó durante 40 min para desarrollo de color. La reacción se detuvo con 500  $\mu$ L de HCL 2 M y se restauró el color con 500  $\mu$ L de Tris 2 M.

Para ambos ensayos, el desarrollo de color se cuantificó a 420 nm usando un espectrofotómetro *Sensident Scan RS-232c* (Merck, Darmstadt, Alemania).



**Figura 3.** Espectrofotómetro *Sensident Scan RS-232c*.

### 2.8.2 Criterio de genotoxicidad

Como criterio de genotoxicidad se utilizó el Factor de Inducción SOS (IF), según lo indicado por Quillardet *et al.* (1989):

$$IF = \frac{\left[ \frac{\beta G (tto)}{\beta G (C-)} \right]}{\left[ \frac{FA (tto)}{FA (C-)} \right]} \quad \text{Ecuación 4.}$$

Donde:

**$\beta G$**  es la actividad enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa,  
 **$FA$**  es la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina,  
 **$tto$**  son los tratamientos con el compuesto evaluado,  
 **$C-$**  es el control negativo del experimento.

Se consideró lo siguiente: *i)* Valores del IF menores de 1.5 son “no genotóxicos”, *ii)* Valores entre 1.5 – 2.0 son “inconclusos”, y *iii)* Valores mayores de 2.0, y una clara relación dosis-actividad, son “genotóxicos”.

## **2.9 ENSAYO DE ANTIGENOTOXICIDAD**

La actividad antígenotóxica de los aceites esenciales y de sus compuestos mayoritarios frente al mutágeno bleomicina, se estudió mediante el ensayo SOS Chromotest y usando experimentos de co-incubación. Para ello, 8 mL de las células crecidas hasta densidad óptica de 0.4 a 600 nm, se centrifugaron durante 15 min a 12000 rpm. El *pellet* celular fue suspendido en 8 mL de LB (2X), suplementado con 2 µg/mL de bleomicina, dispensado a razón de 500 µL en tubos Eppendoff que contenían igual volumen del aceite esencial o compuesto a evaluar. Las muestras se incubaron a 8 °C durante 30 min y, luego, a 37 °C durante 2 h. Los ensayos enzimáticos se desarrollaron como fue descrito en el acápite 2.8.1. Para cada tratamiento, se realizaron al menos tres experimentos independientes con 4 réplicas cada uno.

### **2.9.1 Criterio de antígenotoxicidad**

Como criterio de antígenotoxicidad se usó el porcentaje de inhibición de genotoxicidad (%IG), el cual representa la capacidad de protección del ADN por la sustancia probada y se calcula para cada tratamiento según la siguiente ecuación:

$$\%IG = 1 - \frac{IF_{CO} - IF_{BASAL}}{IF_{BLEO} - IF_{BASAL}} \times 100 \quad \text{Ecuación 5.}$$

Donde:

$IF_{CO}$  es el factor de inducción SOS en las células co-tratadas (sustancia + Bleomicina),

$IF_{BASAL}$  es el factor de inducción SOS basal,

$IF_{BLEO}$  es el factor de inducción SOS en las células tratadas con Bleomicina.

## 2.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Para los tratamientos se calcularon los valores medios de **BG**, **FA** y **FI**, y sus correspondientes errores estándar. La normalidad de los datos se comprobó mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza de los datos por medio de una prueba de F-máxima. Los valores medios fueron comparados usando una prueba *t*-student. La relación dosis respuesta en el análisis de genotoxicidad se comprobó por medio de un análisis de correlación producto-momento (correlación de Pearson). En todos los análisis se usó el paquete estadístico STATISTICA V.6 (STATSOFT Inc, 2003) y una significación,  $p < 0.05$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Lippia alba*

Los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba* vouchers COL512077 y COL512078, por la técnica de hidrodestilación asistida por radiación microondas, mostraron rendimientos de 0,58% y 1,34% respectivamente; los cuales fueron calculados como el porcentaje de la relación entre el peso en gramos del aceite esencial y del material vegetal de partida. La densidad de los aceites esenciales fue de 0,894 g/mL para espécimen COL512077 y de 0,906g/mL para espécimen COL512078. Las densidades fueron estimadas con picnómetro de 9,814 mL (BRAND, Wertheim, Alemania) calibrado a una temperatura de 20°C.

#### 3.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Lippia alba*

Los compuestos de *Lippia alba* identificados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de gases, se muestran en la **Tabla 2**, en su orden de elución en la columna DB-5MS. Se reportan dos parámetros: la cantidad relativa y la concentración de cada compuesto, esta última calculada con base en la densidad del aceite y el área relativa de cada compuesto en el cromatograma.

**Tabla 2.** Composición química de los aceites esenciales de *Lippia alba*, obtenidos por hidrodestilación asistida por radiación microondas.

Nº	Compuestos	Ik	COL512077		COL512078	
			%	C(mg/mL)	%	C(mg/mL)
1	$\alpha$ -Pinoeno	937	0,1	0,9	0,1	1,2
2	Canfeno	954	-	-	0,4	3,4
3	Verbeneno	967	-	-	0,2	1,4
4	1-Octen-3-ol	981	0,3	2,7	-	-
5	$\beta$ -Pinoeno+1-Octen-3-ol	982	-	-	0,1	1,1
6	6-Metil-5-hepten-2-ona	986	2,2	19,8	-	-
7	$\beta$ -Mirceno	990	0,2	1,6	1	9,0
8	$\alpha$ -Felandreno	1010	0,2	2,0	-	-
9	<i>p</i> -Cimeno	1028	0,2	1,7	-	-
10	Limoneno	1035	2,5	22,4	33,2	300,8
11	<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimeno	1048	0,4	3,3	1	9,3
12	Linalool	1101	1,8	16,2	0,7	6,3
13	<i>trans-p</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol	1127	-	-	0,3	2,6
14	<i>cis</i> - Óxido de Limoneno	1138	-	-	0,1	1,3
15	Isobutanoato de <i>cis</i> hexen-3-ilo	1140	0,1	0,8	-	-
16	<i>cis-p</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol	1141	-	-	0,2	1,5
17	Citronelal	1153	1	8,9	-	-
18	Epóxido de Rosafurano	1171	0,1	0,9	-	-
19	Borneol	1180	-	-	0,6	5,8
20	<i>cis</i> -Dihidrocarvona	1203	-	-	0,3	2,4
21	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	1210	-	-	0,2	2,2
22	<i>trans</i> -Carveol	1227	-	-	0,3	2,3
23	Nerol	1228	2	18,2	-	-
24	Neral	1246	25,4	231,2	-	-
25	Geraniol	1254	7,1	64,8	-	-
26	Carvona	1257	-	-	38,1	344,8
27	Piperitona	1263	-	-	4,4	40,0
28	Geranial	1276	33,1	302,0	-	-
29	Piperitenona	1349	-	-	4,3	38,9
30	Acetato de nerilo	1357	0,2	1,9	-	-
31	Acetato de geraniol	1376	2,7	24,8	-	-
32	$\alpha$ -Copaeno	1384	-	-	0,1	0,9
33	$\beta$ -Burboneno + $\beta$ -Elemeno	1394	-	-	2,2	20,0

34	$\beta$ -Elemeno	1397	1,9	17,1	1,2	11,0
35	$\beta$ -Ilangeno	1429	-	-	0,3	2,7
36	<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno	1432	6,6	58,8	0,2	1,5
37	$\beta$ -Gurjuneno	1441	-	-	0,3	2,3
38	$\alpha$ -Guaieno	1444	1,2	10,6	-	-
39	<i>trans</i> - $\beta$ -Farneseno	1456	0,2	1,6	0,8	7,4
40	$\alpha$ -Humuleno	1469	1,3	11,3	-	-
41	<i>epi</i> -(E)-9-Cariofileno	1473	0,1	1,1	0,3	2,9
42	Biciclosesquifelandreno	1493	1,2	11,2	7,7	70,1
43	Biciclogermacreno	1507	-	-	0,5	4,6
44	$\alpha$ -Bulneseno	1511	0,6	5,1	-	-
45	<i>cis</i> - $\alpha$ -Bisaboleno	1547	0,6	5,4	-	-
46	Óxido de cariofileno	1599	0,5	4,2	-	-

**Nº** Orden de elución en la columna DB-5MS. **Ik**, Índice de retención (Kovats, 1965), calculado para un mínimo de tres cromatogramas independientes. **%**, Porcentaje del compuesto basado en el área del pico en el cromatograma. **C(mg/mL)**: Concentración de cada compuesto estimada a partir de la densidad de cada aceite esencial y del área relativa del pico de cada compuesto en el cromatograma.

Para cada espécimen, fueron identificados 28 compuestos que representan el 94% para el espécimen COL512077 y el 99% para el espécimen COL512078 de los compuestos totales presentes en cada espécimen. No se pudo identificar los compuestos con índices de Kováts calculados (IK): 1112, 1145, 1162, 1197, 1235, 1269, 1281, 1297, 1388, 2117.

El análisis de los aceites esenciales de *Lippia alba*, mostró marcadas diferencias en la composición de los dos especímenes. Los dos especímenes COL512077 y COL512078 presentaron un mayor contenido de monoterpenos oxigenados, 73,5% y 49,4%, respectivamente, seguido de hidrocarburos monoterpénicos, espécimen COL512078 (36%) y espécimen COL512077 (3,5%); mientras que los sesquiterpenos oxigenados se detectaron en porcentajes muy bajos

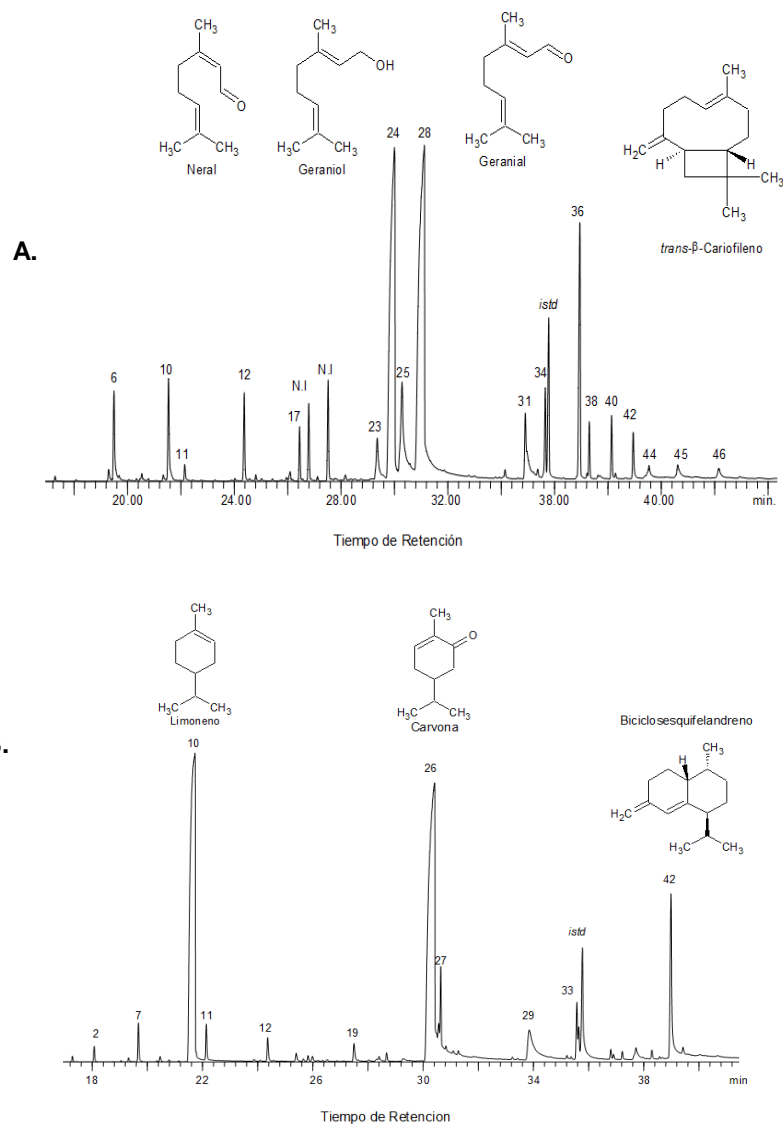
(0,5 %) en el espécimen COL512077 o no se detectaron en espécimen COL512078 (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Clasificación de los compuestos por familias, presentes en los aceites esenciales de *Lippia alba*.

Clase de compuesto	COL512077 (%)	COL512078 (%)
Hidrocarburos monoterpénicos	3,5	36
Monoterpenos oxigenados	73,5	49,4
Hidrocarburos sesquiterpénicos	13,6	13,6
Sesquiterpenos oxigenados	0,5	0,0
Otros no identificados	5,4	1,0
Total	<b>96,5</b>	<b>100</b>

En el caso del espécimen COL512077, los compuestos mayoritarios fueron los monoterpenos oxigenados geranial (33 %), neral (25 %), geraniol (7 %) y *trans*- $\beta$ -cariofileno (7 %) con concentraciones relativas de 302, 231, 65 y 59 mg/mL, respectivamente. Para el espécimen COL512078, los compuestos mayoritarios fueron el monoterpeno oxigenado carvona (38 %), el limoneno (33 %) y biciclosesquifelandreno (8 %), con concentraciones de 345, 301 y 70 mg/mL, respectivamente.

De acuerdo con la caracterización química de los aceites esenciales de *Lippia alba*, se comprobó que los especímenes COL512077 y COL512078, corresponden a los quimiotipos I (citral: isómeros geranial y neral) y III (carvona/limoneno), según la clasificación indicada por Hennebelle *et al.*, (2006). En la **Figura 3**, se muestran los perfiles cromatográficos de cada aceite esencial.



**Figura 3.** Perfiles cromatográficos de la especie *Lippia alba*. A: Espécimen COL512077. B: Espécimen COL512078. Los compuestos son enumerados según el orden de elución en la columna DB-5MS según se indica la **Tabla 2**. Se presentan además, las estructuras químicas de los compuestos mayoritarios. **Istd**: Patrón interno (*n*-tetradecano). **NI**: Compuestos no identificados.

### 3.3 EFECTO GENOTÓXICO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Lippia alba*

La genotoxicidad de los aceites esenciales de *Lippia alba* fue evaluada en la cepa *Escherichia coli* PQ37 usando el ensayo SOS Chromotest. Se consideraron diez concentraciones entre 0,9 y 450 mg/mL del aceite esencial (Tabla 4).

**Tabla 4.** Efecto genotóxico de los aceites esenciales de *Lippia alba*, medido con el ensayo SOS Chromotest.

Tratamientos	COL512077 (n=3)		COL512078 (n=3)	
	FA <sup>†</sup>	IF <sup>†</sup>	FA <sup>†</sup>	IF <sup>†</sup>
Control -	0.015 ± 0.006	1.0 ± 0.3	0.032 ± 0.008	0.9 ± 0.6
Control +	0.011 ± 0.004 n.s	6 ± 2.7 *	0.028 ± 0.012 n.s	8 ± 0.4 *
AE (0.9 mg/ml)	0.015 ± 0.005 n.s	0.8 ± 0.6 n.s	0.022 ± 0.009 n.s	0.7 ± 0.5 n.s
AE (1.7 mg/ml)	0.053 ± 0.016 *	0.4 ± 0.3 n.s	0.052 ± 0.013 *	0.3 ± 0.2 n.s
AE (3.5 mg/ml)	0.160 ± 0.039 *	0.2 ± 0.1 n.s	0.105 ± 0.043 *	0.4 ± 0.2 n.s
AE (7.0 mg/ml)	0.171 ± 0.052 *	0.3 ± 0.1 n.s	0.221 ± 0.080 *	0.5 ± 0.3 n.s
AE (14.1 mg/ml)	0.138 ± 0.023 *	0.4 ± 0.1 n.s	0.332 ± 0.059 *	0.7 ± 0.3 n.s
AE (28.1 mg/ml)	0.141 ± 0.034 *	0.6 ± 0.2 n.s	0.290 ± 0.055 *	0.7 ± 0.2 n.s
AE (56.2 mg/ml)	0.224 ± 0.052 *	0.3 ± 0.1 n.s	0.251 ± 0.073 *	0.6 ± 0.2 n.s
AE (112.5 mg/ml)	0.272 ± 0.061 *	0.2 ± 0.1 n.s	0.183 ± 0.062 *	0.6 ± 0.3 n.s
AE (225.0 mg/ml)	0.228 ± 0.073 *	0.5 ± 0.3 n.s	0.096 ± 0.043 *	1.0 ± 0.7 n.s
AE (450.0 mg/ml)	0.141 ± 0.030 *	0.5 ± 0.1 n.s	0.074 ± 0.027 *	0.7 ± 0.3 n.s

<sup>†</sup>, Valores promedios de la actividad fosfatasa alcalina (FA) y del factor de inducción SOS (FI) de un mínimo de tres experimentos independientes con tres réplicas cada uno y con sus correspondientes errores estándar. \*, Incremento significativo ( $p < 0,05$ ) respecto al control negativo encontrados usando el test Student's. **n.s**, valores no significativos respecto al control negativo.

Durante el estudio de estos aceites, se observó un efecto estimulante significativo de la síntesis de proteínas (medida mediante la actividad de la fosfatasa alcalina), lo cual se sugiere que estos aceites estimulan el crecimiento celular en la cepa de ensayo. Estos datos demuestran, que

los aceites no resultaron tóxicos para las células bacterianas en el rango de concentraciones evaluadas.

Adicionalmente, los aceites esenciales estudiados no indujeron la respuesta SOS en la cepa *Escherichia coli* PQ37, según indican los valores del factor de inducción SOS (IF). Por el contrario, este indicador mostró valores menores a la unidad sugiriendo un potencial efecto antígenotóxico para los aceites.

### **3.4 EFECTO ANTIGENOTÓXICO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Lippia alba***

El efecto antígenotóxico de los aceites esenciales de *Lippia alba* frente al daño producido por la bleomicina en el ADN de la cepa *Escherichia coli* PQ37 fue evaluado para un rango de dosis de los aceites entre 1,7 y 450 mg/mL (**Tabla 5**). A tales fines, se usó durante los co-tratamientos una dosis de 1 µg/mL de bleomicina, según lo indicado por Vicuña *et al.*, (2009).

Ambos especímenes de *Lippia alba* (COL512077 y COL512078), mostraron un claro efecto antígenotóxico frente a la bleomicina para el rango de dosis comprendido 28,1 y 450 mg/mL. El porcentaje de inhibición de la genotoxicidad incrementó con la dosis del aceite ensayada, sugiriendo que uno o varios componentes antígenotóxicos en los aceites tienen un mecanismo directo de acción.

**Tabla 5.** Efecto antigenotóxico de los aceites esenciales de *Lippia alba*, frente al daño inducido por la bleomicina, medido con el ensayo SOS Chromotest.

Tratamientos	FI <sup>†</sup> (% IG) (n=3)	
	COL512077	COL512078
Control -	1 ± 0.1	1 ± 0.0
Control +	6 ± 1.2	5 ± 1.4
AE (450.0 mg/ml)	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.3
AE (450.0 mg/ml) + Bleo	0.4 ± 0.1 (100 %) *	0.4 ± 0.1 (100 %) *
AE (225.0 mg/ml) + Bleo	0.5 ± 0.1 (100 %) *	0.6 ± 0.2 (100 %) *
AE (112.5 mg/ml) + Bleo	0.9 ± 0.3 (100 %) *	0.5 ± 0.2 (100 %) *
AE (56.2 mg/ml) + Bleo	0.9 ± 0.5 (100 %) *	0.9 ± 0.6 (100 %) *
AE (28.1 mg/ml) + Bleo	1.9 ± 0.5 (81 %) *	2 ± 1.6 (68 %) *
AE (14.1 mg/ml) + Bleo	5 ± 1.2 (17 %) n.s	5 ± 2.3 (9 %) n.s
AE (7.0 mg/ml) + Bleo	5 ± 1.2 (17 %) n.s	7 ± 2.2 (0 %) n.s
AE (3.5 mg/ml) + Bleo	5 ± 1.2 (15 %) n.s	7 ± 1.1 (0 %) n.s
AE (1.7 mg/ml) + Bleo	6 ± 2.1 (6 %) n.s	6 ± 0.8 (0 %) n.s

†, Valores promedios del factor de inducción SOS (FI) de un mínimo de tres experimentos independientes con tres réplicas cada uno y sus correspondientes errores estándar. (% IG), Porcentaje de inhibición de la genotoxicidad. \*, Reducción significativa (p<0,05) respecto al control positivo, encontrada usando el test de Student's. **n.s.**, valores no significativos respecto al control positivo.

### 3.5 EFECTO GENOTÓXICO DE LOS COMPUESTOS MAYORITARIOS DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia alba*

Previa a la evaluación del efecto antigenotóxico de los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales, se estudió si estos resultaban genotóxicos en el modelo experimental usado (**Tabla 6**).

**Tabla 6.** Estudio de la genotoxicidad de los compuestos mayoritarios de los aceites de la especie *Lippia alba* mediante el ensayo SOS Chromotest.

<b>citral</b>	<b>FI<sup>†</sup> (n=3)</b>	<b>S(+)<i>carvona</i></b>	<b>FI<sup>†</sup> (n=3)</b>	<b>R(+)<i>limoneno</i></b>	<b>FI<sup>†</sup> (n=3)</b>
Control -	1 ± 0.1	Control -	1 ± 0.1	Control -	1 ± 0.1
Control +	8 ± 1.6*	Control +	6 ± 0.9*	Control +	9 ± 1.1*
2915 mM	0.6 ± 0.1 n.s	2915 mM	1.2 ± 0.3 n.s	2915 mM	0.9 ± 0.3 n.s
1457 mM	0.6 ± 0.1 n.s	1457 mM	1.0 ± 0.2 n.s	1457 mM	2.0 ± 0.9*
729 mM	0.8 ± 0.2 n.s	729 mM	1.3 ± 0.4 n.s	729 mM	6 ± 1.2*
364 mM	1.3 ± 0.2 n.s	364 mM	1.4 ± 0.3 n.s	364 mM	5 ± 1.0*
182 mM	1.2 ± 0.2 n.s	182 mM	1.3 ± 0.1 n.s	182 mM	2 ± 0.3*
91 mM	1.2 ± 0.2 n.s	91 mM	1.2 ± 0.2 n.s	91 mM	1.6 ± 0.2*
45 mM	1.2 ± 0.2 n.s	45 mM	1.3 ± 0.3 n.s	45 mM	1.4 ± 0.3 n.s
23 mM	1.2 ± 0.2 n.s	23 mM	1.1 ± 0.2 n.s	23 mM	1.4 ± 0.2 n.s
12 mM	1.0 ± 0.3 n.s	12 mM	0.9 ± 0.2 n.s	12 mM	1.3 ± 0.3 n.s

<sup>†</sup>, Genotoxicidad. Valores promedios del factor de inducción SOS (FI) de un mínimo de tres experimentos independientes con tres replicas cada uno y con sus correspondientes errores estándar. \*, Incremento significativo ( $p < 0,05$ ) respecto al control negativo (Agua destilada), encontrada usando el test de Student's. **n.s.**, valores no significativos respecto al control negativo.

Los compuestos citral y carvona no mostraron efecto genotóxico para los rangos de concentraciones ensayadas. Por el contrario, el limoneno mostró un incremento significativo del factor de inducción SOS respecto al control negativo para el rango de dosis comprendido entre 91 a 1457 mM. Sin embargo, un análisis de correlación producto-momento (Pearson) no mostró una clara relación dosis-respuesta ( $R = - 0,06$ , n.s); por lo que los resultados no se consideraron conclusivos.

### 3.6 EFECTO ANTIGENOTÓXICO DE LOS COMPUESTOS MAYORITARIOS DE *Lippia alba*

El efecto antígenotóxico de los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales, fue estudiado con el fin de relacionar el efecto detectado en los aceites con dichos compuestos (**Tablas 7 y 8**).

El citral mostró una reducción significativa de la genotoxicidad inducida por la bleomicina a partir de una dosis de 182 mM (**Tabla 7**), lo que sugiere que este compuesto es responsable del efecto detectado en el aceite del espécimen COL512077. El porcentaje de inhibición de la genotoxicidad (%IG) del citral incrementó con su concentración, sugiriendo un modo de acción directa para este compuesto y soportando los resultados observados con el aceite esencial.

De igual manera, los compuestos carvona y limoneno resultaron antígenotóxicos frente a la bleomicina (**Tabla 8**). La S(+)-carvona fue significativamente activa solo a partir de la concentración 798 mM. Similar resultado fue obtenido con su isómero R(-)-carvona (datos no mostrados). El limoneno, en cambio, fue antígenotóxico a partir de una concentración relativamente más baja (97 mM) que el citral y la carvona; pero los niveles de inhibición de la genotoxicidad fueron siempre más bajos que aquellos observados para el citral. Todos estos datos sugieren, que entre estos compuestos mayoritarios el de mayor potencial quimiopreventivo es el citral.

**Tabla 7.** Efecto antigenotóxico del citral (compuesto mayoritario del espécimen COL512077) y el Trolox® (compuesto estándar), frente al daño inducido por la bleomicina, medido con el ensayo SOS Chromotest.

Citral	FI <sup>††</sup> (%IG) (n=3)	Trolox®	FI <sup>††</sup> (%IG) (n=3)
Control -	1 ± 0.3 **	Control -	1.1 ± 0.1 **
Control +	13 ± 4.4	Control +	10 ± 2.1
2915Mm + bleo	0.5 ± 0.1 (100%) **	4687 µM + bleo	0.9 ± 0.3 (100%) **
1457mM + bleo	0.6 ± 0.2 (100%) **	2344 µM + bleo	1.1 ± 0.3 (100%) **
729mM + bleo	1 ± 0.2 (100%) **	1172 µM + bleo	0.8 ± 0.4 (100%) **
364mM + bleo	1.5 ± 0.3 (96%) **	586 µM + bleo	2 ± 1.0 (90%) **
182mM + bleo	1.5 ± 0.3 (96%) **	293 µM + bleo	8 ± 2.1 (25%) n.s
91mM + bleo	7 ± 2.4 (49%) n.s	146 µM + bleo	13 ± 2.9 (0%) n.s
45mM + bleo	17 ± 5.6 (0%) n.s	73 µM + bleo	14 ± 3.0 (0%) n.s
23mM + bleo	17 ± 6.8 (0%) n.s	37 µM + bleo	11 ± 2.6 (0%) n.s
12mM + bleo	17 ± 6.0 (0%) n.s	18 µM + bleo	11 ± 2.1 (0%) n.s

<sup>††</sup>, Antigenotoxicidad. Valores promedio del factor de inducción SOS (FI) de un mínimo de tres experimentos. (%IG), Porcentaje de inhibición de la genotoxicidad. \*\*, Reducción significativa ( $p < 0,05$ ) respecto al control positivo, encontrada usando el test de Student's. n.s, valores no significativos, respecto al control positivo.

La bioactividad de los compuestos mayoritarios estudiados se comparó con la de un antioxidante estándar, el Trolox. Este compuesto, produce una significativa reducción de la genotoxicidad inducida por la bleomicina a partir de una concentración de 586 µM. Esta concentración fue, 170, 311 y 1362 veces más bajas que aquellas que muestran efecto antigenotóxico para los compuestos limoneno, citral y carvona, respectivamente.

**Tabla 8.** Efecto antigenotóxico de la carvona y el limoneno (compuestos mayoritarios del espécimen COL512078) frente al daño inducido por la bleomicina, medido con el ensayo SOS Chromotest.

S(+)-carvona	FI <sup>††</sup> (%IG) (n=3)	R(+)-limoneno	FI <sup>††</sup> (%IG) (n=3)
Control -	0.9 ± 0.1 **	Control -	0.9 ± 0.2**
Control +	9.5 ± 2.8	Control +	7.2 ± 1.4
3192mM + bleo	2.2 ± 0.5 (85%) **	3192mM + bleo	2 ± 0.9 (82%) **
1596mM + bleo	1.7 ± 0.6 (84%) **	1596mM + bleo	2 ± 0.6 (82%) **
798mM + bleo	5.2 ± 1.5 (50%) **	798mM + bleo	4.6 ± 1.5 (41%) **
399mM + bleo	7.6 ± 3.1 (50%) n.s	399mM + bleo	4.6 ± 1.5 (41%) **
199mM + bleo	11.4 ± 2.5 (22%) n.s	199mM + bleo	4.7 ± 1.6 (40%) **
100mM + bleo	11 ± 4.3 (0%) n.s	100mM + bleo	4.8 ± 1.5 (38%) **
50mM + bleo	9.6 ± 1.8 (0%) n.s	50mM + bleo	5 ± 1.6 (35%) n.s
25mM + bleo	9.7 ± 2.9 (0%) n.s	25mM + bleo	5.6 ± 1.4 (25%) n.s
12mM + bleo	9.8 ± 3.6 (0%) n.s	12mM + bleo	6.5 ± 1.2 (11%) n.s

<sup>††</sup>, Antigenotoxicidad. Valores promedio del factor de inducción SOS (FI) de un mínimo de tres experimentos. (%IG), Porcentaje de inhibición de la genotoxicidad. \*\*, Reducción significativa ( $p < 0,05$ ) respecto al control positivo, encontrada usando el test de Student's. n.s, valores no significativos, respecto al control positivo.

#### 4. DISCUSION

Este estudio se enfocó en la determinación de la composición química y de las propiedades genotóxicas/antigenotóxicas de los aceites esenciales de la especie *Lippia alba*, obtenidos por la técnica de hidrodestilación asistida por radiación microondas.

Citral, geraniol, *trans*- $\beta$ -cariofileno, carvona, limoneno y biciclosesquifelandreno, fueron identificados como los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales. Los especímenes estudiados de *Lippia alba* (COL512077 y COL512078), fueron clasificados como los quimiotipos citral y quimiotipo carvona/limoneno, respectivamente; los cuales corresponden a quimiotipos I y III, según la clasificación sugerida por Hennebelle *et al.*, (2006).

Hasta donde sabemos, este trabajo es el primer reporte sobre las propiedades genotóxicas y antigenotóxicas de los aceites esenciales de la especie *Lippia alba*. Bajo las condiciones experimentales, aquí ensayadas (ausencia de activación metabólica exógena), los quimiotipos de *Lippia alba*, citral y carvona/limoneno no inducen daño primario en el ADN. Adicionalmente, los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales como citral y carvona no fueron genotóxicos en el ensayo SOS Chromotest en concordancia con estudios previos con los ensayos SOS Chromotest, de Ames y SMART en *Drosophila melanogaster* (Franzios *et al.*, 1997, Gomes-Carneiro *et al.*, 1998, Stamatii *et al.*, 1999). El limoneno, a dosis entre 91 y 1457 mM, mostró incremento del factor de inducción SOS, lo que contrasta con los resultados obtenidos con el aceite esencial del quimiotipo carvona/limoneno. Este efecto del limoneno, fue posiblemente

enmascarado en el aceite esencial por la interacción con otros constituyentes del aceite, probablemente la carvona; hipótesis que debe ser demostrada. Los resultados sobre la genotoxicidad del limoneno se consideraron no conclusivos, dado que no se observó una relación dosis-respuesta durante un análisis de correlación de Pearson. Un previo estudio que usó el ensayo de Ames, no mostró efecto mutagénico para el limoneno (Vukovic-Gaciv *et al.*, 2006). Se requerirán posteriores estudios para clarificar la inocuidad del limoneno, en especial estudios con células de mamíferos.

Este trabajo, nos muestra el potencial antígenotóxico de los aceites esenciales de la especie *Lippia alba*. Ambos quimiotipos citral y carvona/limoneno, fueron antígenotóxicos contra el clastógeno bleomicina, lo cual fue soportado por la actividad antígenotóxica de sus compuestos mayoritarios (**Tablas 7 y 8**). El siguiente fue el orden de actividad antígenotóxica de los compuestos mayoritarios de los aceites: citral > carvona > limoneno, indicando que el citral es el compuesto con mayor potencial quimiopreventivo.

Revisiones previas (Crowel 1999, de Carvalho y da Fonseca 2006, Paduch *et al.*, 2007, Rabi y Bishayee, 2009) tienen bien documentado las propiedades quimiopreventivas de terpenoides de *Lippia alba* como carvona, geraniol, limoneno y alcohol perílico. Por el contrario, poco se conoce sobre el potencial quimiopreventivo de citral. Connor (1991) indicó que citral tenía propiedades antitumorales contra carcinógenos en la piel de ratones. Adicionalmente, otra evidencia experimental indica que el citral tiene habilidad para suprimir el estrés oxidativo posiblemente por la inducción de proteínas antioxidantes endógenas como la glutatión S-transferasa, una enzima de la fase II que metaboliza

xenobióticos en mamíferos (Nakamura *et al.*, 2003). Recientemente se ha demostrado, que el citral inhibe la actividad hidrolasa de la citocromo P450 CYP2B60 (Seo *et al.*, 2008), involucrada en la activación mutagénica de una amplia variedad de pro-mutágenos y en la inhibición de la síntesis de la micotoxina Aflatoxin B1 (Shukla *et al.*, 2009). En tal sentido, el presente trabajo aporta nuevo conocimiento sobre la actividad quimiopreventiva de citral y sus potenciales mecanismos de actuación.

Dado que la genotoxicidad de la bleomicina involucra la generación de radicales sobre la molécula de ADN que derivan en roturas de simple y doble cadena en el ADN (Claussen y Long 1999), se puede sugerir que el efecto antígenotóxico del citral, carvona y el limoneno contra la bleomicina debe ocurrir mediante un mecanismo antioxidante frente a tales radicales. De hecho, se han demostrado propiedades antioxidantes para los aceites esenciales del quimiotipo carvona/limoneno (Stashenko *et al.*, 2004).

Considerando la importancia del daño oxidativo en los eventos carcinogénicos, el efecto antioxidante de citral y carvona puede ser usado contra la carcinogénesis relacionada con inflamación, como los cáncer de piel y de colon. Como la carvona y el limoneno se usan comúnmente para aumentar la penetración de drogas a través de la piel mediante un incremento de la permeabilización cutánea (Aqil *et al.*, 2007, Sapra *et al.*, 2008); el empleo simultáneo del citral y algunos de estos compuestos en preparación de geles, puede ser un método efectivo para la quimioprotección en cáncer de piel. En tal sentido, serán requeridos estudios de sensibilización y fotosensibilización en la piel para las mencionadas formulaciones. Se han indicado que el citral

es citotóxico en células de fibroblastos humanos a partir de una concentración del 1% (Hayes y Marcovic, 2002). Adicionalmente, los aceites esenciales de la especie *Cymbopogon citratus*, los cuales tienen alta proporción de citral (70-90%), muestran ligera fototoxicidad en la línea celular fibroblástica 3T3 de ratones y en la línea SIRC de cornea de conejos (Dejoux *et al.*, 2006).

Basados en datos de literatura (Pino *et al.*, 1996, Abad *et al.*, 1997, Viana *et al.*, 1998, Vale *et al.*, 1999, Viana *et al.*, 2000, Pascual *et al.*, 2001b, Vale *et al.*, 2002, Zetola *et al.*, 2002, Gazola *et al.*, 2004, Andrighetti-Frohner *et al.*, 2005, Teixeira- Duarte *et al.*, 2005, de Carvalho y da Fonseca 2006, Oliveira *et al.*, 2006, Sena-Filho *et al.*, 2006, Paduch *et al.*, 2007, Hennebelle *et al.*, 2008a, Ara *et al.*, 2009, Arruda *et al.*, 2009, Mesa-Arango *et al.*, 2009, Shukla *et al.*, 2009), *Lippia alba* tiene un amplio potencial terapéutico. Las propiedades antígeno-tóxicas contra la bleomicina amplían su potencial como fuente de compuestos quimiopreventivos. Como se indica en este trabajo, el citral, la carvona y el limoneno exhiben propiedades protectoras tanto *in vitro* como *in vivo* (Connor 1991, Crowell 1999, Nakamura *et al.*, 2003, de Carvalho y da Fonseca 2006, Paduch *et al.*, 2007, Seo *et al.*, 2008, Rabi y Bishayee 2009, Shukla *et al.*, 2009). Todos estos trabajos sustentan el potencial de los aceites esenciales de *Lippia alba*, y de sus compuestos mayoritarios citral, carvona y limoneno, como suplementos dietéticos con propiedades quimiopreventivas y/o antioxidantes.

## 5. CONCLUSIONES

La caracterización química de la composición de los aceites esenciales de *Lippia alba*, mostró compuestos mayoritarios como: citral (geranial y neral), geraniol y *trans*- $\beta$ -cariofileno, en el espécimen COL512077; y carvona, limoneno y biciclosesquifelandreno, en el espécimen COL512078. Estos especímenes corresponden a los quimiotipos I y III, previamente reportados por Hennebelle *et al.* (2006).

Los aceites esenciales de *Lippia alba* y los compuestos mayoritarios, citral y carvona, no inducen daño primario en la cepa *Escherichia coli* PQ37, para los rangos de concentraciones evaluadas en cada caso. Por el contrario, el compuesto mayoritario limoneno mostro resultados no conclusivos y requiere un estudio posterior.

Los aceites esenciales de *Lippia alba* estudiados, muestran propiedades antígenotóxicas frente al clastógeno bleomicina; efecto que está directamente relacionado con sus compuestos mayoritarios.

Dentro de los compuestos mayoritarios estudiados, el citral muestra el mayor potencial como compuesto quimiopreventivo.

## **6. RECOMENDACIONES**

Estudios de genotoxicidad en modelos procariotas y eucariotas que evalúen el daño genotóxico a diferentes niveles de expresión; y por tanto, permitan dar conclusiones sobre la genotoxicidad de los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales estudiados. Estos estudios son requeridos para el potencial uso de los mencionados compuestos como agentes quimiopreventivos.

Profundizar en los mecanismos de acción antígenotóxica del citral, usando distintos procedimientos experimentales (Ej: pre- y post-incubación), y otros ensayos diferentes al SOS Chromotest.

## 7. BIBLIOGRAFIA

Abad M.J., Bermejo P., Villar A., Sanchez-Palomino S., Carrasco L., 1997. Antiviral activity of medicinal plant extracts. *Phytotherapy Research* 11:198-202.

Adams R., 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry. 4<sup>th</sup> Ed. Allured Publishing, Carol Stream, Illinois, USA, 804p.

Andrighetti-Fröhner C.R., Sincero T.C.M., da Silva A.C., Savi L.A., Gaido C.M., Bettega J.M.R., Mancini M., de Almeida M.T.R., Barbosa R.A., Farias M.R., Barardi C.R.M., Simões C.M.O., 2005. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. *Fitoterapia* 76:374-378.

Aqil M., Ahad A., Sultana Y., Ali A., 2007. Status of terpenes as skin penetration enhancers. *Drug Discovery Today* 12:1061-1067.

Ara N., Nur M.H., Amran M.S., Wahid M.I.I., Ahmed M., 2009. In vitro antimicrobial and cytotoxic activities of leaves and flowers extracts from *Lippia alba*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 12:87-90.

Arruda D.C., Miguel D.C., Yokoyama-Yusunaka J.K.U., Katzin A.M., Uliana S.R.B., 2009. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites *in vitro* and *in vivo*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. DOI:10.1016/j.biopha.2009.02.004.

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., 2008. Biological effects of essential oils. A review. *Food and Chemical Toxicology* 46:446-475.

Balunas M.J.; Kinghorn A.D., 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences* 78:431-441.

Bandoni A. (Editor), 2000. Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica: Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Universidad Nacional de La Plata (Editorial), Primera Edición, La Plata, Argentina, 410p.

Biocomercio Sostenible, 2003. Estudio del Mercado Colombiano de Aceites Esenciales. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia. 109 p.

Boldi A.M., 2004. Libraries from natural products-like scaffolds. *Current Opinion in Chemical Biology* 8:281-286.

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

Calixto J.B., 2005. Twenty-five years of research on medical plant in Latin America. A personal view. *Journal of Ethnopharmacology* 100:131-134.

Chen J. and Stubbe J., 2005. Bleomycins: Towards better therapeutics. *Nature Reviews/Cancer* 5:102-112.

Clardy J. and Walsh C., 2004. Lessons from natural molecules. *Nature* 432:829-837.

Claussen C.A. and Long E.C., 1999. Nucleic Acid Recognition by Metal Complexes of Bleomycin. *Chemical Reviews* 99:2797–2816.

Connor M.J., 1991. Modulation of tumor promotion in mouse skin by the food additive Citral (3, 7-dimethyl-2, 6-octadienal). *Cancer Letters* 56:25-28.

Cordell G.; Colvard M., 2005. Some thoughts on the future of ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 100:5-14.

Cragg G.M.; Newman D.J., 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology* 100:72-79.

Crowell P.L., 1999. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *The Journal of Nutrition* 129:775S-778S.

de Carvalho C.C.C.R., da Fonseca MMR. 2006. Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. *Food Chemistry* 95:413-422.

De Flora S.; Ferguson L.R., 2005. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutation Research* 591:8-15.

Dejoux N., Guingand Y., Bourgeois C., Durand S., Fromageot C., Combe C., Ferret P.J., 2006. Assessment of the phototoxic hazard of some essential oils using modified 3T3 neutral red uptake assay. *Toxicology in Vitro* 20:480-489.

Franzios G., Mirotsou M., Hatziapostolou E., Kral J., Scouras Z.G., Mavragani-Tsipidou P., 1997. Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 45:2690-2694.

Fundación ExportAr, 2003. Análisis de la tendencia del mercado internacional de aceites esenciales. Informe mensual No. 9 de la Fundación EXPORT-AR, Secretaria de Comercio y Relaciones Económicas Internacionales, Argentina, 24p.

Gazola R., Machado D., Ruggiero C., Singi G., Alexandre M.M. 2004. *Lippia alba*, *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus*: effects of the aqueous extracts on the isolated hearts of rats. *Pharmacological Research* 50:477-480.

Gilani A., Rahman A., 2005. Trends in ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 100:43-49.

Gomes-Carneiro M.R., Viana M.E.S., Felzenszwalb I., Paumgarten F.J.R., 1998. Mutagenicity testing of (±)-camphor, 1,8-cineole, citral, citronellal, (-)-menthol and terpineol with the Salmonella/microsome assay. *Mutation Research* 416:129-136.

Graham J.G.; Quinn M.L.; Fabricant D.S.; Farnsworth N.R., 2000. Plants used against cancer - an extension of the work of Jonathan Hartwell. *Journal of Ethnopharmacology* 73:347-377.

Grob R., 1995. Modern practice of gas chromatography. John Wiley & Sons (Editorial), Tercera Edición, New York, Estados Unidos, 867p.

Hayes A.J., Marcovic B., 2002. Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. *Food and Chemical Toxicology* 40:535-543.

Hecht S., 2000. Bleomycin: New perspectives on the mechanism of action. *Journal of Natural Products* 63:158-168.

Hennebelle T., Sahpaz S., Dermont C., Joseph H., Bailleul F., 2006. The essential oil of *Lippia alba*: Analysis of samples from French overseas departments and review of previous works. *Chemical & Biodiversity* 3:1116-1125.

Hennebelle T., Sahpaz S., Joseph H., Bailleul F., 2008a. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *Journal of Ethnopharmacology* 116:211-222.

Hennebelle T., Sahpaz S., Gressier B., Joseph H. and Bailleul F., 2008b. Antioxidant and Neurosedative Properties of Polyphenols and Iridoids from *Lippia alba*. *Phytotherapy Research* 22:256-258.

Hennebelle T., Sahpaz, S., Joseph, H., Bailleul, F., Ethnopharmacology of *Lippia alba*, *Journal of Ethnopharmacology* (2007), doi:10.1016/j.jep.2007.11.044

Issa A. Y., Volate S.R., Wargovich M.J., 2006. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: New directions and perspectives. *Journal of Food Composition and Analysis* 19:405-419.

Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P.F., (Eds) 1999. Plant Systematics: A Phylogenetic Approach. Sinauer Associates Inc, Sunderland, USA, 464p.

Kaefer C.M., Milner J.A., 2008. The role of herbs and spices in cancer prevention. *Journal of Nutritional Biochemistry* 19:347-361.

Koehn F.E. and Carter G.T., 2005. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 4:206-220.

Kovats E., 1965. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Advance in Chromatography* 1:229-247.

Mc Nair H.M. & Miller J.M., 1998. Basic Gas Chromatography. John Wiley & Sons (Editorial). New York, Estados Unidos, 193 p.

Mersch-Sundermann V., Schneider U., Klopman G., Rosenkranz H. S., 1994. SOS Induction in *Escherichia coli* and Salmonella mutagenicity: a comparison using 330 compounds. *Mutagenesis*, 9:205-224.

Mesa-Arango A.C., Montiel-Ramos J., Zapata B., Duran C, Betancur-Galvis L., Stashenko E., 2009. Citral and Carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 104:878-884.

Miertus S., Svorc J., Sturdjk E., Vojtekovii H., 1987. Use of Specific Bacteria for the Determination of Mutagenic and Carcinogenic Compounds. *Analytical Chemistry*, 59:504-508.

Nakamura Y., Miyamoto M., Murakami A., Ohigashi H., Osawa T., Uchida K., 2003. A phase II detoxification enzymes inducer from lemongrass: identification of Citral and involvement of electrophilic reaction in the enzyme induction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 302:593-600.

Newman D.J., Cragg G.M., Holbeck S. and Sauusville E.A., 2002. Natural products and derivatives as leads to cell cycle pathway targets in cancer chemotherapy. *Current Cancer Drug Targets* 2:279-308.

Ohta T., Nakamura N., Moriya M., Shirasu Y., Kada T., 1984. The SOS-function-Inducing Activity of Chemical Mutagens in *Escherichia coli*. *Mutation Research*, 131:101-109.

Oliveira D.R., Leitao G.G., Bizzo H.R., Lopes D., Alviano D.S., Alviano C.S., Leitao S.G., 2007. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. *Food Chemistry* 101:236–240.

Oliveira D.R., Leitão G.G., Santos S.S., Bizzo H.R., Lopes D., Alviano C.S., Alvino D.S., Leitão S.G., 2006. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 108:103-108.

Paduch R., Kandefer-Szerszen M., Trytek M., Fiedurek J., 2007. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae Therapiae Experimentalis* 55:315-327.

Park E.J. and Pezzutto J.M., 2002. Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer and Metastasis Reviews* 21:231-255.

Pascual M.E., Slowing K., Carretero M.E., Sánchez-Mata D., Villar A., 2001a. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology* 76:201-214.

Pascual M.E., Slowing K., Carretero M.E., Villar A., 2001b. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). *II Farmaco* 56:501-504.

Patwardhan B., 2005. Ethnopharmacology and drug discovery. *Journal of Ethnopharmacology* 100:50-52.

Pérez S., Meckes M., Pérez C., Susunaga A., Zavala M.A., 2005. Anti-inflammatory activity of *Lippia dulcis*. *Journal of Ethnopharmacology* 102:1-4.

Pezzuto J.M., 1997. Plant-derived anticancer agents. *Biochemical Pharmacology* 53:121-133.

Pino-Alea J.A., Ortega-Luis A.G., Rosado-Pérez A., Rodríguez-Jorge M., Baluja R., 1996. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Revista Cubana de Farmacia* 30:29-35.

Quillardet P., Huisman O., D'Ari R., Hofnung M., 1982. SOS Chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proceedings of the National Academic of Science USA* 79: 5971-5975.

Quillardet P., Bellecombe C., Hofnung M., 1985. The SOS Chromotest, a Colorimetric Bacterial Assay for Genotoxins: Validation Study with 83 Compounds. *Mutation Research*, 147:79-95.

Quillardet P., Frelat G., Nguyen V.D., Hofnung M., 1989. Detection of ionizing radiations with the SOS Chromotest, a bacterial short-term test for genotoxic agents. *Mutation Research*, 216:251-257.

Rabi T., Bishayee A., 2009. Terpenoids and breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Research and Treatment* 115:223-239.

Sapra B, Jain S, Tiwary AK. 2008. Percutaneous permeation enhancement by terpenes: Mechanistic view. *The AAPS Journal* 10:120-132.

Scartezzini P. and Speroni E., 2000. Review on some plant of Indian traditional medicine with antioxidant activity. *Journal of Ethnopharmacology* 71:23-43.

Sena-Filho J.G., Melo J.G.S., Saraiva A.M., Goncalves A.M., Caetano-Psiottano M.N., Xavier H.S., 2006. Antimicrobial activity and phytochemical profile from the roots of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16:506-509.

Seo K.A., Kim H., Ku H.Y., Ahn H.J., Park S.J., Bae S.K., Shin J.G., Liu K.H., 2008. The monoterpenoids citral and geraniol are moderate inhibitors of CYP2B6 hydroxylase activity. *Chemico-Biological Interactions* 174:141-146.

Shoemaker M., Hamilton B., Dairkee S.H., Cohen I., Campbell M.J., 2005. In vitro anticancer activity of twelve chinese medicinal herbs. *Phytotherapy Research* 19:649-651.

Shukla R., Kumar A., Singh P., Dubey N.K., 2009. Efficacy of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil and its monoterpenes aldehyde constituents against fungi isolated from some edible legume seeds and aflatoxin B<sub>1</sub> production. *International Journal of Food Microbiology*. 135:165-170.

Sporn M. and Suh N., 2000. Chemoprevention of cancer. *Carcinogenesis*. 21: 525-530.

Stammati A., Bonsi P., Zucco F., Moezelaar R., Alakomi H.L, von Wright A. ,1999. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. *Food and Chemical Toxicology* 37:813-823.

Stashenko E.E, Jaramillo B.E, Martínez J.R., 2004. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. *Journal Chromatography A* 1025:93-103.

Stashenko E.E., Durán D.C., Monsalve L.A., Martínez J.R., Olivero J., Fernández J.L., 2010. Comparative study of composition and biological activity of essential oils of *Lippia alba* grown in different regions of Colombia (en prensa).

Stashenko E.E., Jaramillo B.E., Martínez J.R., 2003. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias* 27:579-597.

STATSOFT Inc (2003) STATISTICA. Data Analysis Software System, Version 6, ([www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)).

Teixeira-Duarte M.C., Figueira G.M., Sartoratto A., García-Rehder V.L., Delarmelina C., 2005. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 97:305-311.

Vale T.G., Furtado E.C., Santos J.G., Viana G.S.B., 2002. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Phytomedicine* 9:709-714.

Vale T.G., Matos F.J.A., de Lima T.C.M., Viana G.S.B., 1999. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. *Journal of Ethnopharmacology* 167:127-133.

Viana G.S.B., Vale T.G. do, Rao V.S.N. and Matos F. J. A., 1998. Analgesic and Antiinflammatory Effects of Two Chemotypes of *Lippia alba*: A Comparative Study. *Pharmaceutical Biology* 36:347–351.

Viana G.S.B., Vale T.G., Silva C.M.M., Matos F.J.A., 2000. Anticonvulsant activity of essential oils and active principles from chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 23:1314-1317.

Vicuña G.C., Stashenko E.E., Fuentes J.L., 2009. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. *Fitoterapia*, DOI: 10.1016/j.fitote.2009.10.008.

Von der Hude W., Behm C., Girtler R., Basler A., 1988. Evaluation of the SOS Chromotest. *Mutation Research*, 203:81-94.

Vuković-Gačić B, Nikčević S, Berić-Bjedov T, Knežević-Vukčević J, Simić D. 2006. Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia officinalis* L.) and its monoterpenes against UV-induced mutations in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food and Chemical Toxicology* 44:1730-1738.

Zétola M., de Lima T.C.M., Sonaglio D., González-Ortega G., Limberger R.P., Petrovick P.R., Bassani V.L., 2002. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* - Verbenaceae (Brazilian *false melissa*). *Journal of Ethnopharmacology* 82:207-215.

Zoghbi M.G.B., Andrade E.H.A., Santos A.S., Silva M.H.L., Maia J.G.S., 1998. Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown growing wild in Brazilian Amazon. *Flavour and Fragrance Journal* 14:411-414.