

**ESTUDIO DEL EFECTO GENOTÓXICO Y POTENCIAL ANTIGENOTÓXICO DE  
EXTRACTOS SUPERCRÍTICOS DE ESPECIES VEGETALES DE LAS  
FAMILIAS MALVACEAE, MYRTACEAE, PASSIFLORACEAE Y LAMIACEAE  
FRENTE A RADIACIÓN ULTRAVIOLETA TIPO C.**

**LADY JOHANNA CELY CORONADO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
2014**

**ESTUDIO DEL EFECTO GENOTÓXICO Y POTENCIAL ANTIGENOTÓXICO DE  
EXTRACTOS SUPERCRÍTICOS DE ESPECIES VEGETALES DE LAS  
FAMILIAS MALVACEAE, MYRTACEAE Y PASSIFLORACEAE FRENTE A  
RADIACIÓN ULTRAVIOLETA TIPO C.**

**LADY JOHANNA CELY CORONADO**

**Trabajo de grado para optar al título de Bióloga**

**Tutor**

**JORGE LUIS FUENTES LORENZO**

**MICROBIÓLOGO, PH.D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
2014**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Doctor Jorge Luis Fuentes Lorenzo por la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental, por su confianza y orientación en la realización del trabajo de pasantía.

A mis compañeros del laboratorio por su amistad y cooperación, en especial a Nathalia Quintero Ruiz por su apoyo y colaboración incondicional.

A mi familia en especial a mis padres por estar a mi lado y darme su apoyo en cada momento de mi vida.

## CONTENIDO

	pág.
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>10</b>
<b>1. COMPETENCIAS DE LA PASANTÍA DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>13</b>
<b>2.MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>14</b>
2.1 Extractos vegetales	14
2.2 Principio del ensayo SOS Chromotest	14
2.3 Cepa de ensayo y condiciones del cultivo de trabajo	14
2.4 Ensayo de genotoxicidad	15
2.5 Ensayos enzimáticos	15
2.5.1 Ensayo enzimático de $\beta$ -galactosidasa (BG)	15
2.5.2 Ensayo enzimático de fosfatasa alcalina (FA)	16
2.6 Criterio de genotoxicidad	16
2.7 Ensayo de antigenotoxicidad	17
2.8 Criterio de antigenotoxicidad	18
2.9 Análisis estadístico de los datos	18
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>19</b>
<b>6.CONCLUSIONES</b>	<b>27</b>
<b>7.RECOMENDACIONES</b>	<b>28</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>29</b>

## LISTA DE TABLAS

	pág.
<b>Tabla 1.</b> Efecto genotóxico de los extractos súper críticos, medido en el ensayo SOS Chromotest.	21
<b>Tabla 2.</b> Efecto antigenotóxico de los extractos súper críticos frente a R-UVC, medido en el ensayo SOS chromotest.	23

## RESUMEN

**TITULO:** ESTUDIO DEL EFECTO GENOTÓXICO Y POTENCIAL ANTIGENOTÓXICO DE EXTRACTOS SUPERCRÍTICOS DE ESPECIES DE LAS FAMILIAS Malvaceae, Myrtaceae, Passifloraceae y Lamiaceae

**Autores:** LADY JOHANNA CELY CORONADO\*\*

**Palabras clave:** Extractos súper críticos, Radiación ultravioleta, genotoxicidad, antigenotoxicidad, SOS Chromotest, *Calycolpus moritzianus*, *Eugenia puniceifolia*, *Minthostachys septentrionalis*, *Sida aggregata* y *Turnera diffusa*.

En el presente trabajo se evaluó el potencial genotóxico y antigenotóxico de extractos obtenidos mediante extracción con fluido supercrítico a partir de las especies *Calycolpus moritzianus*, *Eugenia puniceifolia*, *Minthostachys septentrionalis*, *Sida aggregata* y *Turnera diffusa* frente al daño inducido por la radiación ultravioleta tipo C (R-UVC). La genotoxicidad y antigenotoxicidad de estos extractos supercríticos fue determinada empleando diseños experimentales de co-tratamiento utilizando el ensayo bacteriano SOS chromotest, el cual permite medir de manera indirecta el daño causado en el ADN por diferentes mutágenos. Se encontró que ninguno de los extractos evaluados fue genotóxico en el modelo de estudio usado. En cuanto al potencial antigenotóxico se encontró que los extractos de *Turnera diffusa*, *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys septentrionalis* presentaron disminución del daño generado por R-UVC con dependencia de la concentración ensayada, y por tanto son promisorios como fuente de compuestos con actividad fotoprotectora, siendo los extractos de *Turnera diffusa* y *Calycolpus moritzianus* los que mostraron mayor actividad. Los resultados son discutidos teniendo en cuenta el potencial quimiopreventivo de los extractos de plantas estudiados. Se recomienda ampliar los estudios de antigenotoxicidad de los SFE de las especies vegetales que resultaron promisorias en el modelo de estudio empleado. También sería importante determinar el contenido de sus componentes, esto con el fin de conocer cuál o cuáles compuestos son los responsables del potencial fotoprotector.

\*Trabajo de grado modalidad Pasantía de investigación

\*\*Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Tutor: Jorge Luis Fuente Lorenzo

## ABSTRACT

**TITLE: STUDY OF THE GENOTOXIC AND ANTIGENOTOXIC EFFECT OF SUPERCRITICAL EXTRACTS FROM SPECIES OF THE FAMILIES Malvaceae, Myrtaceae, Passifloraceae & Lamiaceae.**

**Authors :** LADY JOHANNA CELY CORONADO \*\*

**Key words:** Supercritical Extracts, Ultraviolet radiation, genotoxicity, antigenotoxicity, SOS Chromotest, *Calycolpus moritzianus*, *Eugenia puniceifolia*, *Minthostachys septentrionalis*, *Sida aggregate* and *Turnera diffusa*.

The present work evaluated the genotoxicity and the antigenotoxic effect against induced DNA damage by ultraviolet radiation type C (UVC-R ) of supercritical fluid plant extracts from species *Calycolpus moritzianus*, *Eugenia puniceifolia*, *Minthostachys septentrionalis*, *Sida aggregata* y *Turnera diffusa*. Genotoxicity and antigenotoxicity of these extracts were determined using a co-treatment experimental design in the SOS Chromotest , a bacterial assay that measure indirectly DNA damage. We showed that none of the extracts was genotoxic. Extracts from *Turnera diffusa*, *Calycolpus moritzianus* and *Minthostachys septentrionalis* showed antigenotoxic activity with dependency on the concentration evaluated; being these promising as sources of compounds potentially fotoprotectors. *Turnera diffusa* and *Calycolpus moritzianus* extracts showed the highest antigenotoxicity. The other extracts tested, showing no activity against DNA damage induced by ultraviolet radiation type C in the model used. The results are discussed in relation to the chemopreventive potential of the studied plant species. Based on the results, we recommend amplify the antigenotoxic studies of promissory oils. Would also be important to determine the content of components, this in order to know which compounds are responsible for the photoprotective potential.

\*Degree work, Research internship

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

## INTRODUCCIÓN

La piel reacciona de diversas formas frente a la radiación ultravioleta solar (R-UV). Algunas reacciones pueden ser agudas y fugaces, como el eritema retardado o “la quemadura solar”, mientras que otras crónicas y persistentes, como el envejecimiento y el cáncer de piel (Ichihashi *et al.* 2003; Matsumura & Ananthaswamy 2004; Zaidi *et al.* 2008). Es por esto que en los últimos años, se ha dado importancia a la búsqueda de estrategias de protección que ayuden a mitigar el impacto que tiene la R-UV sobre la salud humana (Gilaberte & Gonzales 2010, Nichols & Katiyar 2010).

Dentro de las estrategias empleadas para mitigar el daño inducido por la R-UV los fotoprotectores juegan un papel fundamental, ya que estos actúan previniendo o reparando los daños inducidos por la radiación solar (Gilaberte & Gonzales 2010). En el mercado existen diversos tipos de fotoprotectores donde se incluyen agentes de bloqueo como ropa, sombreros y gafas, agentes tópicos o filtros químicos, agentes orales o de fotoprotección sistémica y nuevas estrategias que incluyen la estimulación de la melanogénesis y la reparación del daño genético (González *et al.* 2008; Gilaberte & González 2010). Sin embargo, hasta el momento los preparados tópicos siguen siendo los más ampliamente utilizados. Para el desarrollo de fotoprotectores se han utilizado compuestos naturales que han demostrado propiedades anti-oxidantes, anti-inflamatorias, anti-fúngicas, anti-virales, anti-microbianas, anti-genotóxicas, anti-cancerígenas, entre otras (Afaq & Katiyar 2011; Bakkali *et al.* 2008; Gilaberte & González 2010; Nichols & Katiyar 2010), ya que estas propiedades pueden resultar relevantes para la fotoprotección de la piel.

Así mismo se ha descrito la actividad de compuestos naturales frente a los tres tipos de R-UV, A, B y C, empleando diferentes técnicas de extracción. Por ejemplo, el extracto etanólico de *Prunella vulgaris* suprime la producción de radicales libres inducida por la R-UVA en queratinocitos humanos (Psotova *et al.* 2006). Jeong y colaboradores (2009) atribuyen a la actividad antioxidante encontrada en el aceite esencial (AE) de *Cnidium officinale* y *Ligusticum chuanxiong* la disminución del daño inducido en el ADN por la R-UVB en fibroblastos de ratón. El extracto fenólico de las macroalgas marinas *Macrocystis pyrifera* y *Porphyra columbina* evidenciaron fotoprotección cercana al 100% frente al daño causado por la R-UVB en embriones de pez cebra (Guinea *et al.* 2012). Por su parte el AE de *Salvia officinalis* reduce el daño producido en el ADN por la R-UVC en células de *Escherichia coli* y *Saccharomyces Cerevisiae*, sugiriendo que este extracto actúa como un bioantimutágeno (Vuković-Gaćić *et al.* 2006).

La extracción con fluido súper crítico (SFE) es una técnica novedosa que cuenta con algunas ventajas sobre otras técnicas de extracción como lo son la rápida obtención de los metabolitos secundarios, la alta selectividad de los compuestos que extrae y que no utiliza solventes orgánicos tóxicos (Herrero *et al.* 2006). A la fecha no se conocen reportes de la actividad fotoprotectora de compuestos de origen natural obtenidos mediante esta técnica. Se ha demostrado que la composición de los SFE es muy similar a la de los AE obtenidos mediante hidrodestilación (Clifford *et al.* 1999; Fadel *et al.* 1999; Stashenko *et al.* 2004; Stashenko *et al.* 2009); sin embargo, su efecto terapéutico puede ser más acentuado (Fadel *et al.* 1999). Así mismo, se ha revelado que los extractos SFE poseen mayores concentraciones de sesquiterpenos y compuestos oxigenados pesados en relación con los obtenidos por técnicas de hidrodestilación y que tradicionalmente han presentado actividad biológica relevante (Fadel *et al.* 1999; Stashenko *et al.* 2004).

Por lo anterior, la presente pasantía de investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto genotóxico y potencial antígenotóxico frente a la radiación ultravioleta tipo C (R-UVC), de cinco extractos de fluidos supercríticos obtenidos a partir de las especies vegetales *Calycolpus moritzianus*, *Eugenia punicifolia*, *Minthostachys septentrionalis*, *Sida aggregata* y *Turnera diffusa*, empleando diseños experimentales de co-tratamiento en el ensayo SOS chromotest (Quillardet *et al.* 1982, Fuentes *et al.* 2006).

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

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

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Extractos vegetales

Los extractos obtenidos mediante extracción con fluido súper crítico (SFE) objeto de estudio de la presente pasantía, fueron suministrados por el Centro de Investigación en Biomoléculas (CIBIMOL) y se realizaron en el marco del proyecto Bio-Red-CO-CENIVAM No. RC-0572-2012.

### 2.2 Principio del ensayo SOS Chromotest

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

### 2.3 Cepa de ensayo y condiciones de cultivo

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 µg/ml) y tetraciclina (17 µg/ml) a una temperatura de 37 °C con agitación permanente (100 rpm) durante 15-16 horas. Al día siguiente se realizó una resiembra en medio fresco adicionando 2 ml del medio crecido en 20 ml de medio LB, el cual se dejó crecer bajo las condiciones experimentales descritas anteriormente un tiempo aproximado de dos horas, hasta que alcanzó una densidad óptica  $DO_{600nm}$  de 0,4.

## **2.4 Ensayo de genotoxicidad**

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

## **2.5 Ensayos enzimáticos**

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

### **3.5.1 Ensayo enzimático de $\beta$ -galactosidasa (BG).**

En cada pozo se dispensaron 135 µl de buffer Z ( $Na_2HPO_4$  3,22 g,  $NaH_2PO_4$  x  $H_2O$  1,1 g, KCl 0,15 g,  $MgSO_4$  \* 7  $H_2O$  0,05 g, SDS 0,2 g,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,54

ml, pH 7,0) y se añadieron 15 µl de células de cada tratamiento. Esto se incubo por 20 minutos a temperatura ambiente para que se diera la lisis celular. Posteriormente, se adicionaron 30 µl de la solución Stock del sustrato β-galactosidasa (orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosido, ONPG) la cual se preparó a 4 mg/ml en buffer fosfato de sodio (1,42 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M, 1,38 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O 0,1 M, pH 8,8) y se incubo durante 40 minutos a temperatura ambiente para el desarrollo del color. La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de la solución Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 M) y se realizó la lectura de la microplaca a una densidad óptica DO<sub>420nm</sub> en el espectrofotómetro de UV/visible Thermo Scientific Multiskan GO.

### 3.5.2 Ensayo enzimático de fosfatasa alcalina (FA).

En cada pozo de dispensaron 135 µl de buffer T (TRIS 24,22 g y SDS 0,2 g, pH 8,8) y se añadieron 15 µl 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 µl 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 incubo durante 40 minutos para el desarrollo del color. La reacción se detuvo añadiendo 50 µl de la solución HCl (2,5 M) y cinco minutos después se le agregaron 50 µl de la solución TRIS (2 M). Finalmente se realizó la lectura de la microplaca como se describió en el ensayo de BG.

## 2.6 Criterio de genotoxicidad.

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

### Ecuación 1

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

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

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

### Ecuación 2

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

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

### Ecuación 3

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

<b>R<sub>t</sub></b> : Células tratadas <b>R<sub>nt</sub></b> : Células no tratadas
--

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 efecto antigenotóxico de los SFE frente a R-UVC se evaluó en el ensayo SOS Chromotest (Quillardet *et al.*, 1982), empleando diseños experimentales de co-tratamiento. En estos las células fueron expuestas simultáneamente a diferentes concentraciones de la fracción acuosa del compuesto a evaluar y a la dosis de R-UVC previamente determinada en el LMMA, siguiendo el protocolo propuesto por Fuentes y colaboradores (2006).

El cultivo fresco crecido hasta una densidad óptica DO600nm de 0,4 fue diluido cinco veces en medio LB 2X, esta dilución se distribuyó a razón de 600 µl en tubos de microcentrífuga que contenían igual volumen de las diluciones del extracto en

estudio. Posteriormente 1 ml de la mezcla fue depositado en cajas petri pequeñas para realizar la irradiación a una dosis de 20,28 J/m<sup>2</sup> en la cabina de seguridad biológica FLC85. Posterior a la irradiación se tomó una alícuota de cada co-tratamiento en tubos de microcentrífuga y se incubaron por 30 minutos a una temperatura entre 4-8 °C y posteriormente durante dos horas a 37 °C con agitación permanente (300 rpm) en el Thermomixer Comfort (Eppendorf, Alemania). En todos los casos, se realizaron al menos tres experimentos independientes con cuatro replicas cada uno. En cada experimento se incluyó un control negativo (C- células sin irradiar mezcladas con agua destilada estéril) y un control positivo (C+ células irradiadas mezcladas con agua destilada estéril).

## 2.8 Criterio de antigenotoxicidad

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

$$\%IG = \frac{I_{co} - I_{basal}}{I_{uv} - I_{basal}}$$

### Ecuación 4

**I<sub>co</sub>**: factor de inducción SOS de los cotratamientos (células + extracto vegetal + RUV).  
**I<sub>basal</sub>**: factor de inducción SOS del control negativo.  
**I<sub>uv</sub>**: factor de inducción SOS del control positivo.

## 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 Levene. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas con una prueba a posteriori de Dunnett. Para todos los análisis estadísticos, se consideró un p < 0,05. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa R.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se presentan los resultados del estudio de genotoxicidad del SFE obtenido a partir de las especies *Calycolpus moritzianus*, *Eugenia punicifolia*, *Minthostachys septentrionalis*, *Sida aggregata* y *Turnera diffusa*. Los valores del FI para las cinco especies evaluadas en todas las concentraciones probadas, 4 µg/ml a 1053 µg/ml, fue siempre igual o inferior a 1,0. Lo cual indica que para este modelo biológico y para el rango de concentraciones evaluadas, los SFE de las especies vegetales analizadas no son genotóxicos en el modelo de estudio.

Estudios previos (Yáñez-Rueda *et al.* 2009), donde se evalúa la citotoxicidad de 40 AE de *Calycolpus moritzianus* en líneas celulares tumorales (Hela y Jurkat) y no tumorales (Vero) empleando la técnica fotolorimétrica del MTT, encontraron que los aceites no son tóxicos en células Vero ni Jurkat; solo dos AE fueron citotóxicos de forma dosis dependiente en células Hela. Para *Eugenia punicifolia* se ha registrado que los extractos acuoso, butanólico y metanólico suministrados por sonda en ratas diabéticas no exhiben toxicidad hepatobiliar, muscular, pancreática ni microvascular (Brunetti *et al.* 2006). Finalmente, para la especie *Turnera diffusa* se reporta que el extracto hidroalcohólico suministrado a ratones de forma oral e intraperitoneal, tiene una baja toxicidad y no se evidenció un efecto estimulante o depresivo en los animales (Bezerra *et al.* 2011). Adicionalmente, el extracto metanólico de esta planta no fue citotóxico en linfocitos de ratón (Salazar *et al.* 2008). Para las especies *Sida aggregata* y *Minthostachys septentrionalis* este trabajo constituye el primer reporte de la evaluación de su genotoxicidad. Este trabajo junto a los publicados en la literatura soportan la inocuidad de las

especies de estudio, al menos en los modelos usados, lo que las hace candidatas para la evaluación de compuestos con diferentes actividades biológicas.

**Tabla 1.** Efecto genotóxico de los extractos súper críticos, medido en el ensayo SOS Chromotest.

ESPECIE	<i>Calycolpus moritzianus</i>	<i>Eugenia punicifolia</i>	<i>Minthostachys septentrionalis</i>	<i>Sida aggregata</i>	<i>Turnera diffusa</i>
TRATAMIENTOS	FI	FI	FI	FI	FI
C- H2O	1.0 ± 0.02	1.0 ± 0.02	1 ± 0.02	1.0 ± 0.05	1.0 ± 0.06
C+ 2,34 µM	18.2 ± 0.63 *	14.2 ± 1.12 *	14.4 ± 0.29 *	19.4 ± 1.52 *	16.5 ± 0.81 *
1053 µg/ml	1.0 ± 0.05 n.s	0.8 ± 0.07 n.s	0.7 ± 0.02 n.s	1.1 ± 0.12 n.s	1.0 ± 0.07 n.s
527 µg/ml	1.0 ± 0.04 n.s	0.7 ± 0.03 n.s	0.6 ± 0.02 **	0.8 ± 0.07 n.s	0.7 ± 0.01 n.s
263 µg/ml	0.9 ± 0.05 n.s	0.8 ± 0.04 n.s	0.7 ± 0.03 n.s	0.8 ± 0.05 n.s	0.8 ± 0.07 n.s
132 µg/ml	0.9 ± 0.04 n.s	0.7 ± 0.07 n.s	0.8 ± 0.04 n.s	0.7 ± 0.04 n.s	0.7 ± 0.04 n.s
66 µg/ml	0.9 ± 0.04 n.s	0.9 ± 0.04 n.s	0.8 ± 0.02 n.s	0.7 ± 0.03 n.s	0.8 ± 0.06 n.s
33 µg/ml	0.9 ± 0.03 n.s	0.9 ± 0.05 n.s	0.9 ± 0.04 n.s	0.8 ± 0.06 n.s	0.8 ± 0.02 n.s
16 µg/ml	0.9 ± 0.04 n.s	1.0 ± 0.04 n.s	0.8 ± 0.02 n.s	1.0 ± 0.05 n.s	0.8 ± 0.04 n.s
8 µg/ml	1.0 ± 0.03 n.s	0.9 ± 0.07 n.s	0.9 ± 0.02 n.s	0.9 ± 0.06 n.s	0.9 ± 0.04 n.s
4 µg/ml	1.0 ± 0.07 n.s	0.9 ± 0.04 n.s	1.0 ± 0.03 n.s	1.0 ± 0.07 n.s	0.9 ± 0.05 n.s

Valores promedio del factor de inducción SOS (FI) de un mínimo de tres experimentos independientes con cuatro réplicas cada uno.

\*Aumento significativo ( $p < 0,05$ ) con respecto al control negativo. \*\*Disminución significativa ( $p < 0,05$ ) con respecto al control negativo. n.s no se encontró diferencia significativa.

En la tabla 2 se presentan los resultados del estudio de antigenotoxicidad de los SFE obtenidos a partir de las cinco especies vegetales en estudio. Los SFE de las especie *Turnera difussa*, *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys septentrionalis* disminuyeron el daño inducido por la R-UVC en células de *E. coli* de forma dosis dependiente. Para el extracto de *Turnera diffusa* y *Calycolpus mortizianus* la inhibición de la genotoxicidad fue significativa a partir de la dosis 263 µg/ml, mientras para *Minthostachys septentrionalis* lo fue a partir de la dosis 530 µg/ml. Por el contrario, los SFE de las especies vegetales *Sida aggregata* y *Eugenia puniceifolia* no mostraron un efecto antigenotóxico dosis dependiente, siendo significativa la inhibición de la genotoxicidad únicamente para la dosis más alta, 1053 µg/ml.

Tanto la técnica de extracción como el origen de las plantas pueden influir en la composición y concentración relativa de los compuestos en los extractos vegetales; lo que a su vez, determina las propiedades terapéuticas del extracto de la planta. Por ello, diversos estudios han relacionado los compuestos mayoritarios como los minoritarios con un amplio rango de actividades farmacológicas (Herrero *et al.* 2006, Edris 2007, Bakkali *et al.* 2008, Muñoz *et al.* 2007; Quiles *et al.* 2002; Marín *et al.* 2003). Para nuestras especies de interés, se encontró que tanto en *Calycolpus moritzianus* como en *Turnera diffusa* se han reportado variaciones en la concentración relativa de sus compuestos químicos, derivando en actividad biológica diferencial para extractos obtenidos a partir de plantas colectadas en diferentes regiones geográficas, así como en plantas de origen silvestre o micropropagadas (Alcaraz-Meléndez *et al.* 2004, Yáñez-Rueda *et al.* 2009, Soriano-Melgar *et al.* 2012).

**Tabla 2.** Efecto antigenotóxico de los extractos súper críticos frente a R-UVC, medido en el ensayo SOS chromotest.

ESPECIE	<i>Calycolpus moritzianus</i>		<i>Eugenia Punicifolia</i>		<i>Minthostachys septentrionalis</i>		<i>Sida aggregata</i>		<i>Turnera diffusa</i>	
	FI	%IG	FI	%IG	FI	%IG	FI	%IG	FI	%IG
C- H2O	1.0 ± 0.1		1.0 ± 0.0		1 ± 0.0		1.0 ± 0.0		1 ± 0.1	
C+ 2,34 µM	12.2 ± 0.4		10.9 ± 0.6		10.7 ± 0.4		13.5 ± 0.9		9.3 ± 0.4	
1053 µg/ml	5.4 ± 0.3 *	61	6.8 ± 0.4 *	42	4.2 ± 0.2 *	67	9.5 ± 0.5 *	35	1.2 ± 0.1 *	98
527 µg/ml	7.2 ± 0.4 *	45	9.8 ± 0.5 n.s	11	8.5 ± 0.3 *	23	14.1 ± 0.5 n.s	0	2.4 ± 0.2 *	83
263 µg/ml	9.8 ± 0.3 *	21	12.6 ± 0.8 n.s	0	11.3 ± 0.4 n.s	0	13.5 ± 0.6 n.s	0	5.2 ± 0.3 *	50
132 µg/ml	11.7 ± 0.5 n.s	13	13.3 ± 1.0 n.s	0	11.4 ± 0.6 n.s	0	14.1 ± 0.7 n.s	0	8.4 ± 0.8 n.s	10
66 µg/ml	11.6 ± 0.6 n.s	5	15.8 ± 0.6 n.s	0	12.0 ± 0.2 n.s	0	14.0 ± 0.7 n.s	0	8.4 ± 0.6 n.s	10
33 µg/ml	11.5 ± 0.4 n.s	15	15.1 ± 1.1 n.s	0	11.5 ± 0.6 n.s	0	14.4 ± 1.2 n.s	0	9.2 ± 0.5 n.s	1
16 µg/ml	10.8 ± 0.2 n.s	13	14.9 ± 1.5 n.s	0	11.6 ± 0.3 n.s	0	13.1 ± 0.5 n.s	0	8.6 ± 0.5 n.s	8
8 µg/ml	13.2 ± 0.6 n.s	0	16.3 ± 1.5 n.s	0	11.6 ± 0.4 n.s	0	14.5 ± 1.0 n.s	0	9.2 ± 0.3 n.s	1
4 µg/ml	10.7 ± 0.2 n.s	13	14.1 ± 0.7 n.s	0	12.2 ± 0.6 n.s	0	13.4 ± 0.8 n.s	0	8.8 ± 0.5 n.s	6

Valores promedio del factor de inducción SOS (FI) de un mínimo de tres experimentos independientes con cuatro replicas cada uno. %IG, porcentaje de inhibición de la genotoxicidad. \*Reducción significativa (p<0,05) con respecto al control positivo encontrada en la prueba de Dunnet. \*\*Aumento significativo (p<0,05) con respecto al control positivo. n.s, no se encontró diferencia significativa

La caracterización química del extracto metanólico y clorofórmico de *Turnera diffusa* arroja una mezcla de flavonoides, fenoles, terpenos, sacaroides y derivados cianogénicos; mientras que para *Calycolpus moritzianus* se reporta una mezcla de flavonoides y terpenos (Zhao *et al.* 2007, Lepore *et al.* 2011), siendo los compuestos terpenicos las especies químicas más representativas en los extractos de estas dos plantas. En el caso del AE de *Turnera diffusa* se ha encontrado que los compuestos mayoritarios son óxido de cariofileno, cariofileno, 1,8-cineol,  $\delta$ -cadineno y  $\beta$ -elemeno todos compuestos terpénicos (Alcaraz-Meléndez *et al.* 2004). Mientras el AE de *Calycolpus mortizianus* contiene mayoritariamente los terpenos 1,8-cineol & limoneno, seguidos por otros compuestos en diferentes proporciones (Vanegas & Yáñez 2011; Castañeda *et al.* 2007, Yáñez-Rueda *et al.* 2009, Sepúlveda *et al.* 2011). Para los compuestos mencionados, se han reportado diversas actividades biológicas como sigue: el cariofileno y óxido de carifileno cuentan con actividad antiparasitaria y antifúngica respectivamente; y la capacidad citotóxica del AE de *Didymocarpus tomentosa* en células tumorales se relaciona con la elevada concentración de estos compuestos en el aceite (Yang *et al.* 1999, Gowda *et al.* 2012, Leite *et al.* 2013). Para el 1,8 cineol, se han reportado propiedades gastroprotectoras y antiinflamatorias (Santos & Rao 2001, Juergens *et al.* 2003). Mientras para el limoneno actividad quimiopreventiva (Paduch *et al.* 2007, Rabi & Bishayee 2009). Así mismo, el efecto citotóxico en células Hela reportado para el AE de *Calycolpus moritzianus* fue atribuido a la presencia de (-) Limoneno en el aceite (Yañez-Rueda *et al.* 2009).

Otros estudios con *Turnera diffusa* y *Calycolpus moritzianus*, en otros de sus compuestos han encontraron potencial terapéutico. Por ejemplo, la capacidad antioxidante de extractos de *Turnera diffusa* se ha relacionado con el contenido total de fenoles en el extracto (Salazar *et al.* 2008, Soriano-Melgar *et al.* 2012). Otro estudio (Taha *et al.* 2012), atribuye las propiedades gastroprotectoras de la especie a la presencia del flavonoide arbutina. Adicionalmente, algunos AEs de la

especie *Calycolpus moritzianus* cuentan con actividad antimicótica atribuida a los compuestos  $\alpha$ -pineno y terpineol-4-ol, actividad antibacteriana relacionada con la presencia de  $\alpha$ -copaeno; así como, actividad citotóxica del monoterpeno linalol en células Jurkat (Yañez-Rueda *et al.* 2009, Sepúlveda *et al.* 2011). Este amplio espectro de actividades biológicas apoya la idea de que tanto los constituyentes mayoritarios como minoritarios pueden ser los responsables de la actividad fotoprotectora mostrada por *Turnera diffusa* y *Calycolpus moritzianus*, haciendo necesaria la caracterización química de estos extractos y la evaluación del potencial fotoprotector de los componentes encontrados en aras de relacionar la actividad antigenotóxica reportada con constituyentes específicos de los extractos.

En el caso de *Minthostachys septentrionalis* ningún estudio previo ha registrado el comportamiento terapéutico de sus extractos. Hasta hace poco esta especie se incluía dentro del género *Minthostachys mollis* variedad *mollis*, razón por la cual Schmidt-Lebuhn (2008) propone que el contenido de esta planta puede ser muy similar al reportado para *Minthostachys mollis*, cuyo componente mayoritario es el monoterpeno pulegona, al cual se le atribuyen propiedades antihistamínicas (Schmidt-Lebuhn 2008; Rojas & Usubillaga 1995). El presente trabajo, aunque con actividad no muy prominente, sería el primer registro del potencial fotoprotector de la especie. Para la especie *Eugenia punicifolia*, se ha reportado actividad antioxidante en su AE, y se ha atribuido esta propiedad a la presencia de compuestos fenólicos en el aceite (Galeno *et al.* 2014). Así mismo se ha observado un efecto benéfico en los síntomas de la diabetes para ratas a las que se les ha suministrados el extracto metanólico de esta planta (Brunetti *et al.* 2006). Sin embargo, no se encontró actividad fotoprotectora para el SFE de *Eugenia punicifolia* en este estudio.

Este trabajo, aporta nuevo conocimiento sobre potencial terapéutico de las especies *Turnera diffusa*, *Calycolpus moritzianus*, *Minthostachys septentrionalis*,

*Sida aggregata* y *Eugenia punicifolia*, en especial de las dos primeras, con la demostración de sus propiedades genotóxicas y antígenotóxicas.

#### 4. CONCLUSIONES

Los extractos súper críticos obtenidos a partir de las especies *Calycolpus moritzianus*, *Eugenia puniceifolia*, *Minthostachys septentrionalis*, *Sida aggregata* y *Turnera diffusa* no presentaron actividad genotóxica en el ensayo SOS chromotest para el rango de concentraciones ensayadas.

Los extractos supercríticos de las especies *Turnera diffusa*, *Calycolpus Moritzianus* y *Minthoscachys septentrionalis*, exhibieron actividad antígenotóxica frente a la radiación ultravioleta tipo C; siendo *Turnera diffusa* y *Calycolpus moritzianus* las especies más promisorias como fuente de compuestos con potencial fotoprotector. Por su parte, los extractos supercríticos de las especies vegetales *Sida aggregata* y *Eugenia puniceifolia* no evidenciaron una actividad antígenotóxica relevante.

## **5. RECOMENDACIONES**

Se recomienda ampliar el conocimiento fotoprotector de los SFE de las especies vegetales que resultaron positivas en el modelo de estudio empleado, esto se puede realizar en el ensayo SOS chromotest implementando diseños experimentales de pre y post tratamiento o evaluando diferentes tipos de radiación ultravioleta; así como también, incluyendo otros modelos biológicos diferentes al utilizado en esta pasantía de investigación. También sería importante, determinar mediante técnicas cromatográficas el contenido de sus componentes, esto con el fin de conocer cuál o cuáles compuestos son los responsables del potencial fotoprotector.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Afaq, F., & Katiyar, S. K. (2011). Polyphenols: skin photoprotection and inhibition of photocarcinogenesis. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 11(14), 1200-1215
- Alcaraz-Meléndez, L., Delgado-Rodríguez, J., & Real-Cosío, S. (2004). Analysis of essential oils from wild and micropropagated plants of damiana (*Turnera diffusa*). *Fitoterapia*, 75(7), 696-701.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Bezerra, A. G., Mendes, F. R., Tabach, R., & Carlini, E. A. (2011). Effects of a hydroalcoholic extract of *Turnera diffusa* Willd. ex Schult., Turneraceae, in tests for adaptogenic activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(1), 121-127.
- Brunetti, I. L., Vendramini, R. C., Januário, A. H., França, S. C., & Pepato, M. T. (2006). Effects and Toxicity of *Eugenia punicifolia*. Extracts in Streptozotocin-Diabetic Rats. *Pharmaceutical biology*, 44(1), 35-43.
- Castañeda, M. I., Muñoz, A., Martínez, J. R., & Stanschenko, E. E. (2007). Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Scientia et Technica*, 1(33), 165-166.
- Clifford, A. A., Basile, A., & Al-Saidi, S. H. (1999). A comparison of the extraction of clove buds with supercritical carbon dioxide and superheated water. *Fresenius journal of analytical chemistry*, 364(7), 635-637.
- Edris, A. E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research*, 21(4), 308-323.
- Fadel, H., Marx, F., El-Sawy, A., & El-Ghorab, A. (1999). Effect of extraction techniques on the chemical composition and antioxidant activity of *Eucalyptus camaldulensis* var. *brevirostris* leaf oils. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 208(3), 212-216.
- Fuentes, J. L., Vernhe, M., Cuetara, E. B., Sánchez-Lamar, A., Santana, J. L., & Llagostera, M. (2006). Tannins from barks of *Pinus caribaea* protect *Escherichia coli* cells against DNA damage induced by  $\gamma$ -rays. *Fitoterapia*, 77(2), 116-120.

- Galeno, D. M. L., Carvalho, R. P., de Araújo Boleti, A. P., Lima, A. S., de Almeida, P. D. O., Pacheco, C. C., & Lima, E. S. (2014). Extract from *Eugenia punicifolia* is an Antioxidant and Inhibits Enzymes Related to Metabolic Syndrome. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(1), 311-324.
- Gilaberte, Y., & González, S. (2010). Update on photoprotection. *Actas dermo-sifiliograficas*, 101(8), 659-672.
- González, S., Fernández-Lorente, M., & Gilaberte-Calzada, Y. (2008). The latest on skin photoprotection. *Clinics in dermatology*, 26(6), 614-626.
- Gowda, P. J., Ramakrishnaiah, H., Krishna, V., Narra, S., & Jagannath, N. (2012). Caryophyllene-rich essential oil of *Didymocarpus tomentosa*: chemical composition and cytotoxic activity. *Natural product communications*, 7(11), 1535-1538.
- Guinea, M., Franco, V., Araujo-Bazán, L., Rodríguez-Martín, I., & González, S. (2012). In vivo UVB-photoprotective activity of extracts from commercial marine macroalgae. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3), 1109-1117.
- Herrero, M., Cifuentes, A., & Ibanez, E. (2006). Sub-and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food chemistry*, 98(1), 136-148.
- Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyo, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., & Horikawa, T. (2003). UV-induced skin damage. *Toxicology*, 189(1), 21-39.
- Jeong, J. B., Ju, S. Y., Park, J. H., Lee, J. R., Yun, K. W., Kwon, S. T., ... & Jeong, H. J. (2009). Antioxidant activity in essential oils of *Cnidium officinale* Makino and *Ligusticum sinense* hort and their inhibitory effects on DNA damage and apoptosis induced by ultraviolet B in mammalian cell. *Cancer epidemiology*, 33(1), 41-46.
- Juergens, U. R., Dethlefsen, U., Steinkamp, G., Gillissen, A., Regges, R., & Vetter, H. (2003). Anti-inflammatory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. *Respiratory Medicine*, 97(3), 250-256.
- Leite, N. F., Sobral-Souza, C. E., Albuquerque, R. S., Brito, D. I., Lavor, A. K., Alencar, L. B., ... & Coutinho, H. D. (2013). Actividad antiparasitaria in vitro citotóxica de cariofileno y eugenol contra *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania brasiliensis*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(4), 522-528.
- Lepore, L., Gualtieri, M. J., Malafronte, N., Cotugno, R., Dal Piaz, F., Ambrosio, L., & De Tommasi, N. (2011). Anti-angiogenic activity evaluation of secondary

metabolites from *Calycolpus moritzianus* leaves. *Natural product communications*, 6(7), 943-946.

Marín, S., Velluti, A., Muñoz, A., Ramos, A. J., & Sanchis, V. (2003). Control of fumonisin B1 accumulation in naturally contaminated maize inoculated with *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*, by cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarosa essential oils. *European Food Research and Technology*, 217(4), 332-337.

Matsumura, Y., & Ananthaswamy, H. N. (2004). Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and applied pharmacology*, 195(3), 298-308.

Muñoz, O., Copaja, S., Speisky, H., Peña, R. C., & Montenegro, G. (2007). Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. *Química Nova*, 30(4), 848.

Nichols, J. A., & Katiyar, S. K. (2010). Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of dermatological research*, 302(2), 71-83.

Paduch, R., Kandefer-Szerszeń, M., Trytek, M., & Fiedurek, J. (2007). Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 55(5), 315-327.

Psoтова, J., Svobodova, A., Kolarova, H., & Walterova, D. (2006). Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on human keratinocytes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 84(3), 167-174.

Quiles, J. L., Ramírez-Tortosa, M. C., Gómez, J. A., Huertas, J. R., & Mataix, J. (2002). Role of vitamin E and phenolic compounds in the antioxidant capacity, measured by ESR, of virgin olive, olive and sunflower oils after frying. *Food Chemistry*, 76(4), 461-468.

Quillardet, P., & Hofnung, M. (1985). The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 147(3), 65-78.

Quillardet, P., Huisman, O., D'ari, R., & Hofnung, M. (1982). SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(19), 5971-5975.

- Rabi, T., & Bishayee, A. (2009). Terpenoids and breast cancer chemoprevention. *Breast cancer research and treatment*, 115(2), 223-239.
- Rojas, L. B., & Usubillaga, A. N. (1995). Essential oil of *Minthostachys mollis* Grisebach from Venezuela. *Journal of Essential Oil Research*, 7(2), 211-213.
- Salazar, R., Pozos, M. E., Cordero, P., Perez, J., Salinas, M. C., & Waksman, N. (2008). Determination of the antioxidant activity of plants from Northeast Mexico. *Pharmaceutical Biology*, 46(3), 166-170.
- Sancar, A., & Rupp, W. D. (1983). A novel repair enzyme: UVRABC excision nuclease of *Escherichia coli* cuts a DNA strand on both sides of the damaged region. *Cell*, 33(1), 249-260.
- Santos, F. A., & Rao, V. S. N. (2001). 1, 8-cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. *Digestive diseases and sciences*, 46(2), 331-337.
- Sepúlveda, R. M., Pedraza, A. C., & Rueda, X. Y. (2011). Correlación entre la actividad antibacteriana y los componentes del aceite esencial de *Calycolpus moritzianus*. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 9(2), 9-14.
- Schmidt-Lebuhn, A. N. (2008). Ethnobotany, biochemistry and pharmacology of *Minthostachys* (Lamiaceae). *Journal of ethnopharmacology*, 118(3), 343-353.
- Soriano-Melgar, L. D. A. A., Alcaraz-Meléndez, L., Méndez-Rodríguez, L. C., Puente, M. E., Rivera-Cabrera, F., & Zenteno-Savín, T. (2012). Antioxidant and trace element content of damiana (*Turnera diffusa* Willd) under wild and cultivated conditions in semi-arid zones. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 321-327.
- 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.) NE Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*, 1025(1), 93-103.
- Stashenko, E. E., Ordóñez, S. A., Marín, N. A., & Martínez, J. R. (2009). Determination of the Volatile and Semi-volatile Secondary Metabolites, and Aristolochic Acids in *Aristolochia ringens* Vahl. *Journal of chromatographic science*, 47(9), 817-821.
- Taha, M. M. E., Salga, M. S., Ali, H. M., Abdulla, M. A., Abdelwahab, S. I., & Hadi, A. H. A. (2012). Gastroprotective activities of *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. revisited: Role of arbutin. *Journal of ethnopharmacology*, 141(1), 273-281.

Vanegas, V., & Rueda, Y. (2013). Estudio comparativo de la composición química del aceite esencial de *Calycolpus moritzianus* (Myrtaceae) proveniente de cinco regiones de Norte de Santander. Colombia. BISTUA REVISTA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS, 9(1), 9-15.

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(10), 1730-1738.

Yang, D., Michel, L., Chaumont, J. P., & Millet-Clerc, J. (2000). Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an in vitro experimental model of onychomycosis. Mycopathologia, 148(2), 79-82.

Yañez-Rueda, X., Betancur Galvis, L., Agudelo Gomez, L. S., Zapata, M. B., Correa Royero, J., Mesa Arango, A. C., & Stashenko, E. (2009). Composición química y actividad biológica de aceites esenciales de *Calycolpus moritzianus* recolectado en el Norte de Santander, Colombia; Chemical composition and biological activity of essential oils calycolpus moritzianus collectd in the Norte de Santander, Colombia. *Rev. Univ. Ind. Santander, Salud* 41(3), 259-267.

Zaidi, M. R., Day, C. P., & Merlino, G. (2008). From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. Journal of Investigative Dermatology, 128(10), 2381-2391.

Zhao, J., Pawar, R. S., Ali, Z., & Khan, I. A. (2007). Phytochemical investigation of *Turnera diffusa*. Journal of natural products, 70(2), 289-292.