



ARTÍCULO ORIGINAL

Fotoprotección del DNA ejercida por fracciones obtenidas de *Cymbopogon citratus* (Poaceae)

DNA photoprotection exerted by chemical fractions obtained from Cymbopogon citratus (Poaceae)

Fabiana Fuentes-León^{1*}, Franklin García-Fernández¹, Keily Beatriz Aguilera-Roque¹, Rodrigo da Silva Galhardo², Carlos Federico Martins Menck² y Ángel Sánchez-Lamar¹

¹ Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Ciudad de La Habana, Cuba

² Departamento de Microbiología, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidad de São Paulo, Brasil.

* Autor para correspondencia:
fabianafuentesleon@gmail.com

RESUMEN

El uso de compuestos de origen vegetal, dada su diversidad molecular y funcionalidad biológica, es una estrategia actual utilizada para mitigar el daño producido al DNA por la exposición a la radiación UV, que en los últimos años ha aumentado su incidencia sobre la superficie terrestre. La quimiopreención contempla el empleo simultáneo de diferentes fitoquímicos capaces de evitar, revertir o disminuir la frecuencia de enfermedades relacionadas con las mutaciones. *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, conocida como Caña Santa en Cuba, es una planta que se utiliza en medicina tradicional. Se ha demostrado que la decocción de sus hojas es capaz de proteger al DNA del daño inducido por agentes oxidantes y aminas aromáticas. En la actualidad se han informado resultados experimentales que avalan su capacidad de reducir el daño producido por las radiaciones UV en el DNA. La presente investigación evalúa las propiedades fotoprotectoras de diferentes fracciones obtenidas de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. Como requisito previo, se evaluaron las propiedades tóxicas de cada fracción. Los ensayos empleados fueron: Sobrevivencia bacteriana, SOS Colorimétrico y Mutagenicidad de resistencia a la Rifampicina (Rifr), en células de *Caulobacter crescentus*. Los resultados demostraron que la fracción obtenida con butanol como solvente, resultó tóxica; en tanto que las fracciones acuosa y aceites esenciales poseen propiedades bioantimutagénicas frente a la luz UVC.

Palabras clave: fracciones acuosa, butanólica, aceites esenciales; *Caulobacter crescentus*, antimutagenicidad, radiación UVC

ABSTRACT

The use of plant compounds, given their molecular biological diversity and functionality, are being used today as a strategy to reduce the DNA damage caused by exposure to UV radiation, which in recent years has increased its incidence on the Earth's surface. Chemoprevention, whereby the use of natural agents, is a promising application in order to stop, reverse or diminish the frequency of chronic diseases related with mutations. *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, known as Caña Santa in Cuba, is a plant used in traditional medi-

Recibido: 2016-10-29

Aceptado: 2017-03-18

cine. It have been shown that the decoction is able to protect the DNA damage induced by oxidizing agents and aromatic amines. It is now reported experimental results supporting its photoprotective properties in front of UV radiation. This research evaluates the photoprotective properties of different chemical fractions obtained from Cymbopogon citratus. As a premise, its toxic properties were tested. SOS Colorimetric assay, Bacterial survival test and Mutagenicity resistance Rifampicin test (Rifr) were used in cells of Caulobacter crescentus. The results showed that the butanolic fraction is toxic. On the other hand, aqueous and essential oils fractions have bioantimutagenic properties against UVC.

Keywords: Essential oils; butanolic and aqueous fractions; *Caulobacter crescentus*, antimutagenicity, UVC radiation

INTRODUCCIÓN

La radiación ultravioleta (UV) es la responsable de un amplio rango de afecciones en los organismos vivos. En los últimos años se ha prestado especial interés a los efectos nocivos que provoca en la piel. Procesos como fotoenvejecimiento, fotosensibilización, inmunosupresión y fotocarcinogénesis, se encuentran relacionados en su génesis, con la ocurrencia de mutaciones en células somáticas (Seebode *et al.*, 2016). Ante semejante problemática es de interés para la comunidad científica la búsqueda de compuestos con potencialidades fotoprotectoras frente a esta radiación.

Las plantas se destacan dentro de las principales fuentes de compuestos fotoprotectores, al ser sintetizadoras de una variada gama de metabolitos secundarios con capacidad de protección ante la luz ultravioleta en condiciones naturales. A la vez, las plantas constituyen una fuente promisoría de candidatos farmacológicos con menos efectos secundarios sobre la salud humana que los fármacos obtenidos por síntesis artificial (Rojas *et al.*, 2016). Especies como *Camellia sinensis* (Katiyar, 2011), *Vitis vinifera* (Matito *et al.*, 2011) y *Phyllanthus orbicularis* (Vernhes *et al.*, 2013a; 2013b; 2016), entre otras, han sido muy estudiadas con estos propósitos.

Cymbopogon citratus (DC) Stapf (Caña Santa) es una planta medicinal consumida por una gran parte de la población mundial en forma de decocción, principalmente por su agradable sabor y sus propiedades curativas. De manera general se usa para tratar problemas estomacales, resfriados y fiebres, tos, gingivitis, neumonía y desórdenes vasculares (Ekpenyong *et al.*, 2015). En la actualidad se conoce que *C. citratus* posee capacidad de proteger al DNA. Se ha demostrado la capacidad secuestradora de radicales libres del extracto hidroalcohólico ante el daño inducido por radiación gamma (Rao *et al.*, 2009). Estudios *in vitro* e *in vivo* han probado que la decocción posee propiedades

protectoras al DNA ante mutágenos químicos (Cápiro *et al.*, 2001; 2005).

González-Pumarega *et al.*, (2016) y Vernhes *et al.*, (2016) informaron que el extracto total acuoso de *C. citratus* obtenido por decocción de las hojas de la planta es capaz de proteger al DNA del daño inducido por la luz ultravioleta. Sin embargo, se desconocen los compuestos responsables de esta actividad. Por otra parte, en la planta pueden existir otros fitocomponentes volátiles, no presentes en la decocción, con propiedades fotoprotectoras. En tal sentido la actual investigación se propone como objetivo evaluar en tres fracciones (butanólica, acuosa y aceites esenciales) obtenidas de *Cymbopogon citratus* la capacidad de proteger al DNA del daño inducido por radiaciones de la banda C de la luz UV (UVC).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las hojas de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, Poaceae, se colectaron a partir de plantas en estado adulto. El proceso de fraccionamiento se realizó a partir del material fresco. Las aceites esenciales, y las fracciones butanólica y acuosa se obtuvieron en el Laboratorio Central de Farmacología del Hospital Dr. Salvador Allende, empleando los métodos de fraccionamiento arrastre con vapor de agua para obtener los aceites esenciales (Elhassan *et al.*, 2016) y lavado con butanol para la separación de las fracciones butanólica y acuosa (Emrizal *et al.*, 2014). Las fracciones se conservaron en bulbos de cristal protegidos de la luz, a 4 °C, hasta el momento de realizar los experimentos.

Las soluciones de trabajo (16 mg/mL) se prepararon con H₂O MILIQ y dimetilsulfóxido (DMSO) al 2.8 % y

2.0 % para la fracción butanólica y los aceites, respectivamente. La fracción acuosa se preparó solo en H₂O MILIQ. Al momento de realizar los experimentos las soluciones de trabajo se diluyeron en medio de cultivo para obtener las concentraciones a evaluar: 0.1; 0.5; 1.0; 2.0 y 4.0 mg/mL. En todos los casos la concentración de DMSO no superó al 1.0 %.

Cepa bacteriana y medio de cultivo

Se empleó la cepa NA 1000 pP3213 Lac Z de *Caulobacter crescentus*, donada gentilmente por el Departamento de Microbiología del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de São Paulo, Brasil. Las células crecieron a 30°C y 200 rpm de agitación en medio de cultivo PYE (Peptone Yeast Extract, por sus siglas en inglés) suplementado con CaCl₂ 0.5 mM (Poindexter, 1964), y tetraciclina 2.0 µg/mL, hasta una DO_{600nm}=0.4.

Evaluación de la toxicidad de las fracciones obtenidas de *C. citratus*

La toxicidad se analizó como: Citotoxicidad y Genotoxicidad. Para ello las células bacterianas de *Caulobacter crescentus* se dejaron crecer hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial, con una DO_{600nm}=0.4 (aproximadamente 6x10⁷ células/mL) y se resuspendieron en viales con 0.1; 0.5; 1.0; 2.0 y 4.0 mg/mL de las fracciones en estudio, respectivamente. Posteriormente los viales se incubaron durante 30 min a 4°C seguido de incubación a 30°C durante 4 h. La evaluación de la citotoxicidad se realizó mediante el ensayo de Sobrevivencia Bacteriana. Se consideraron citotóxicos aquellos tratamientos que disminuyeron significativamente el número de colonias formadas. En el caso particular de la genotoxicidad se utilizaron dos ensayos: SOS colorimétrico para cuantificar la ocurrencia de daño genético a nivel de estructura primaria del DNA, y Mutagenicidad de Resistencia a la Rifampicina (Rif^r) para detectar daño a nivel de secuencia génica. Se consideraron como genotóxicos aquellos tratamientos que incrementaron significativamente la actividad β-galactosidasa y/o la frecuencia de células mutantes. Se siguió el procedimiento previamente utilizado por Galhardo *et al.*, (2005) y Lopes-Kulishev *et al.*, (2015).

Evaluación de la capacidad de proteger al DNA de las fracciones de *C. citratus*

Con las fracciones y concentraciones que no mostraron efectos tóxicos, se realizó la evaluación de las

capacidades fotoprotectoras.

Capacidad de las fracciones de absorber radiación UVC

Se cuantificó la transmitancia, de las fracciones a λ=254nm (Rango UVC) utilizando un espectrofotómetro Génesis TM Serie 10 (de la Corporación Thermo Electrón). Para obtener las concentraciones a evaluar, la solución de trabajo se diluyó en H₂O MILIQ.

Antigenotoxicidad y antimutagenicidad

Se empleó un protocolo experimental semejante al descrito en la evaluación de la toxicidad. Luego de la incubación a 4°C, 1.5 mL de cultivo se irradió en placas Petri de 3 cm de diámetro, con una dosis de 45 J/m² correspondiente a 16 segundos, a la temperatura de 25±0.5°C. La irradiación se realizó a una distancia de 30 cm, utilizando una lámpara Vilber Loumart T15M 15 W que emitía a una longitud de onda de 254 nm correspondiente a la banda C del espectro UV. Luego el tratamiento de las células se renovó (PYE + fracción a las diferentes concentraciones). Posteriormente las células se incubaron durante 4 h a 30°C. De esta manera, las células bacterianas estuvieron expuestas a las fracciones antes, durante y después de someterlas a irradiación. Las propiedades de protección se analizaron usando los ensayos SOS colorimétrico y de Rif^r anteriormente mencionados. En el caso del ensayo de resistencia a la Rifampicina, los resultados se presentaron como porcentaje de frecuencia de mutagenicidad relativa con respecto al control de bacterias solamente irradiadas.

Análisis estadístico

Para el análisis de los datos experimentales número de colonias, actividad enzimática de la β-galactosidasa y frecuencia de células mutantes, se calcularon los valores medios de cada experimento y sus correspondientes errores estándar para cada tratamiento. Se analizó la normalidad y la homogeneidad de varianza de los datos mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Brown Forsythe, respectivamente. Se desarrolló además un ANOVA de clasificación simple y por último; los valores medios se compararon con los controles respectivos en cada caso, utilizando una prueba de Dunnett con una significación del 95 % en todos los casos. Para estos análisis se utilizó el programa Statistica 6.0.

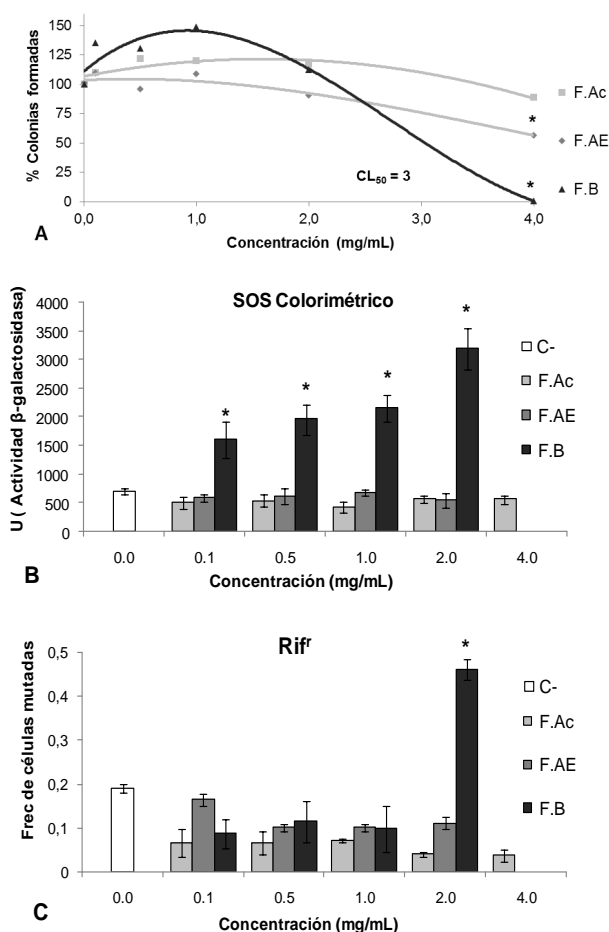


Figura 1: Toxicidad de las fracciones butanólica, acuosa y aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* a diferentes concentraciones, en *Caulobacter crescentus*. (A) Citotoxicidad y Genotoxicidad a nivel celular (B) de estructura primaria y (C) de secuencia génica. Se representa la media de 3 experimentos con 3 réplicas cada uno. (*): Significación de la prueba de Dunnett, $p < 0.05$. C-: Células crecidas en medio óptimo; F.B: Fracción butanólica; F.Ac: Fracción acuosa; F.AE: Fracción aceites esenciales.

Figure 1: Toxicity of butanolic, aqueous and essential oils fractions of *Cymbopogon citratus*, in *Caulobacter crescentus* at different concentrations. (A) Cytotoxicity and Genotoxicity at cellular (B) primary structure and (C) genic sequence level. Average of three experiments with three replicas are presented. (*): Dunnett test signification, $p < 0.05$. C-: Cells grown in optimum medium; F.B: Butanolic Fraction; F.Ac: Aqueous Fraction; F.AE: Essential Oils Fraction.

RESULTADOS

Toxicidad de las fracciones extraídas de *C. citratus*

La evaluación de la toxicidad de las fracciones de *C. citratus* sobre las células de *Caulobacter crescentus* se realizó a tres niveles diferentes: celular, daño primario y génico. Para ello se utilizaron los ensayos de Supervivencia bacteriana, SOS Colorimétrico y de mutagenicidad de resistencia a la Rifampicina, respectivamente (Fig. 1).

En la Fig. 1A se muestra el porcentaje de colonias formadas por las células bacterianas al ser tratadas con las diferentes concentraciones de las tres fracciones en estudio: butanólica, acuosa y aceites. La fracción acuosa no resultó citotóxica a ninguna concentración evaluada. En el caso de las fracciones butanólica y aceites esenciales, la concentración 4.0 mg/mL disminuyó de forma significativa la supervivencia de las bacterias a un 0 y 56%, respectivamente lo cual resultó estadísticamente significativo. En los casos de las fracciones acuosa y aceites no se alcanzaron reducciones de la supervivencia iguales o menores que el 50%, para el intervalo de concentraciones evaluadas en este experimento. La Concentración Letal (CL_{50}), calculada para la fracción butanólica fue igual a 3.0 mg/mL. Se observa además que los tratamientos de 0,1 – 2.0 mg/mL incrementaron ligeramente los porcentajes de colonias formadas, sin que los aumentos obtenidos fueran estadísticamente significativos. La citotoxicidad producida fue el fundamento para decidir la máxima concentración a evaluar en los ensayos de genotoxicidad.

El empleo del ensayo SOS, proporciona información acerca del daño primario producido en el DNA de las células que han estado expuestas a la fracción butanólica de *Cymbopogon citratus* y se consideraron como genotóxicos aquellos tratamientos que incrementaron significativamente la actividad β -galactosidasa, en comparación con el nivel de actividad del control no tratado. Los resultados muestran que la inducción de SOS en células tratadas con la fracción butanólica aumenta significativamente desde la mínima concentración aplicada y se mantiene un efecto genotóxico significativo dependiente de la concentración (Fig. 1B). La actividad de la enzima β -galactosidasa de las células tratadas con las fracciones acuosa y aceites, no varía estadísticamente al compararla con el control no tratado.

El ensayo Rif^r está basado en la inducción de mutaciones en el gen *rpoB* que determina la sensibilidad a la Rifampicina. La frecuencia de células mutadas inducida por la fracción butanólica, mantiene niveles bajos en las menores concentraciones evaluadas, y aumenta, llegando a ser significativamente superior en la concentración de 2.0 mg/mL, respecto a los niveles alcanzados por las células no tratadas. La evaluación de la posible mutagenicidad inducida por las fracciones acuosa y aceites en las células de *Caulobacter crescentus* demostró que la frecuencia de aparición de las mutaciones en las células tratadas es menor que la encontrada en las células no tratadas (Fig. 1C).

Fotoprotección de las fracciones extraídas de *C. citratus*

El estudio de la capacidad fotoprotectora se centró en las concentraciones de las fracciones acuosa y de aceites esenciales que resultaron inocuas desde el punto de vista tóxico. La longitud de onda 254 nm es absorbida por la molécula de DNA, y por tanto es la frecuentemente usada para medir el efecto de la luz UV sobre el DNA (Schuch y Menck, 2010).

La medición de la transmitancia es un indicativo de la magnitud en que la radiación UVC es absorbida por las diferentes fracciones obtenidas de *C. citratus*. En la fracción acuosa, la transmitancia (Fig. 2 A) se mantiene relativamente constante alrededor del 40% para todas las concentraciones medidas. En los aceites esenciales, la menor concentración medida deja pasar el 100% de la luz UVC pero a medida que aumenta la concentración, la transmitancia se reduce hasta llegar a un 60 % en la concentración de 1.0 mg/mL que se mantiene, prácticamente, constante para todas las concentraciones restantes. Ello indica que en ambas fracciones, acuosas y aceites, existen compuestos que absorben el paso de la luz UVC a la longitud de onda de 254nm.

La evaluación de la actividad fotoprotectora del DNA también se realizó aplicando los ensayos SOS colorimétrico y Mutagenicidad de resistencia a la Rifampicina. En relación con el ensayo SOS (Fig. 2B) se evidenció que los tratamientos aplicados no reducen significativamente los niveles actividad de actividad de la enzima β galactosidasa, al ser comparados con células solamente irradiadas. Sin embargo en la figura 2C se observa que el tratamiento combinado de las

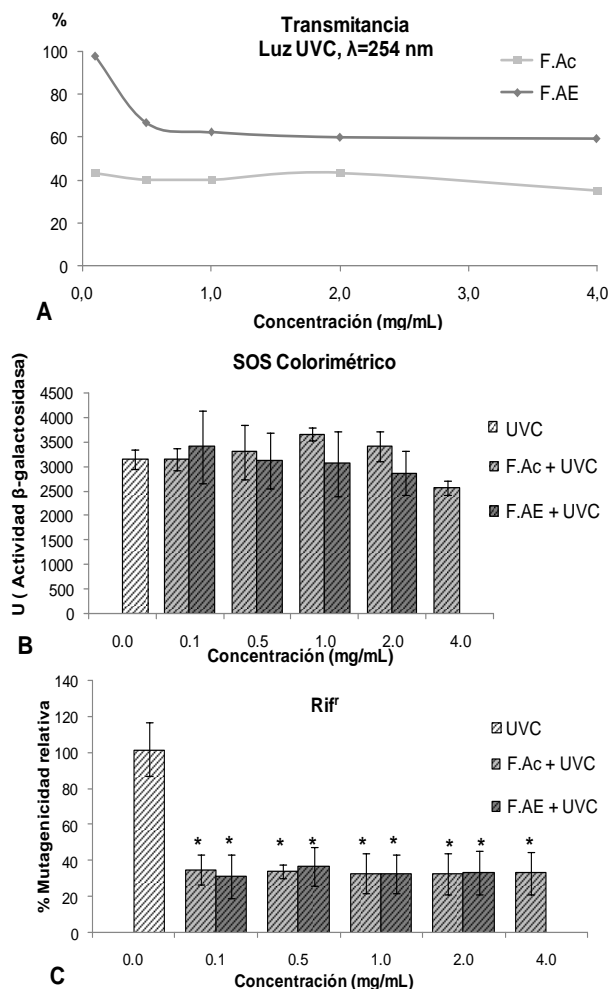


Figura 2: Capacidad fotoprotectora de las fracciones acuosa (F.Ac) y aceites esenciales (F.AE) de *Cymbopogon citratus* a diferentes concentraciones en *Caulobacter crescentus* (A) Transmitancia, (B) SOS colorimétrico y (C) Frecuencia de mutaciones Rif^r inducidas. Se representa la media de 3 experimentos con 3 réplicas cada uno. (*): Significación de la prueba de Dunnett, $p < 0.05$. UVC: células irradiadas con luz UVC 45 J/m². F.B: Fracción butanólica; F.Ac: Fracción acuosa; F.AE: Fracción aceites esenciales.

Figure 2: Photoprotective capacity of butanolic, aqueous and essential oils fractions of *Cymbopogon citratus*, in *Caulobacter crescentus* at different concentrations. (A) Transmittance (B) SOS Colorimetric (C) Frequency of Rif^r induced mutations. Average of three experiments with three replicas are presented. (*): Dunnett test significance, $p < 0.05$. C-: Cells grown in optimum medium; F.B: Butanolic Fraction; F.Ac: Aqueous Fraction; F.AE: Essential Oils Fraction.

fracciones con la irradiación, difiere significativamente y disminuye hasta 3 veces, la frecuencia de mutaciones inducida por la luz UVC.

DISCUSIÓN

La Caña Santa es una planta consumida por la población mundial en forma de decocción, y también es empleada en la medicina tradicional como hipotensor, para aliviar los síntomas del catarro y del reumatismo, entre otros padecimientos (Ekpenyong *et al.*, 2015). De la especie cubana se ha demostrado las propiedades protectoras del DNA de la decocción frente a mutágenos químicos directos y promutágenos (Cápiro *et al.*, 2001; 2005). Más recientemente se ha descrito su capacidad de proteger al DNA de las radiaciones ultravioleta-C (González-Pumariiega *et al.*, 2016; Vernhes *et al.*, 2016). En la presente investigación se ha evaluado la capacidad de proteger al DNA ante la acción dañina de la radiación UV, en fracciones químicamente menos complejas que la decocción de hojas frescas de Caña Santa.

Los fitocomponentes volátiles de la Caña Santa, esteroides y terpenoides en toda su variedad, se encuentran agrupados en la fracción de aceites esenciales, siendo el citral el componente más abundante (Elhassan *et al.*, 2016). La fracción butanólica, tiene una polaridad menor que el agua y en ella están contenidos la mayoría de los flavonoides como apigenina, luteolina, kaempferol y quercetina (Figueirinha *et al.*, 2008). La fracción acuosa contiene los componentes de mayor polaridad como son los compuestos fenólicos (ej: ácidos clorogénico, cafeico y cumárico) y los taninos. No obstante algunos de estos fenoles, o modificaciones de los mismos pueden encontrarse en otras fracciones (Marques y Farah, 2009; Roriz *et al.*, 2014).

En estas fracciones pudieran estar contenidos grupos de fitoquímicos que pueden potencialmente ser beneficiosos, pero otros pudieran resultar perjudiciales (Sharwan *et al.*, 2015). Por tal razón la evaluación de la genoprotección, conlleva la realización de ensayos para evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad como requisito previo.

Toxicidad de las fracciones extraídas de *C. citratus*

La evaluación de la toxicidad, demostró que la fracción butanólica es la más dañina (Fig. 1). El efecto citotóxico observado a partir de 2.0 mg/mL pudiera ser atribuido a daños en la fisiología, el metabolismo o

mecanismos celulares incompatibles con la sobrevivencia bacteriana. Este resultado de toxicidad también fue encontrado en células de *E. coli* (Fuentes-León *et al.*, 2017). Numerosas y variadas investigaciones, informan que tanto extracciones, como fracciones butanólicas de varias especies vegetales poseen destacadas propiedades antibacterianas como es el caso de *Ananas erectifolius*, *Ampelodesma mauritanica* (Toudert *et al.*, 2009), *Alchornea cordifolia* (Adeshina *et al.*, 2012), y *Piper crocatum* (Emrizal *et al.*, 2014) por solo citar unos pocos, que constituyen antecedentes de los resultados aquí encontrados. Donde, fitocompuestos como la rutina, que se forma creando un enlace entre el disacárido rutinosa y el grupo hidroxilo de la quercetina, presentes en *Cymbopogon citratus*, se han informado como responsables de esa toxicidad (Macías *et al.*, 2009; Marcarini *et al.*, 2011). Además, desde la menor concentración evaluada los incrementos significativos del daño genético a nivel primario unido al incremento en la sobrevivencia celular, indican la presencia fitocomponentes con potencialidad genotóxica (Brusick, 1987) en la fracción butanólica, lo que conllevó a su exclusión de una evaluación posterior como agente fotoprotector.

Los aceites esenciales mostraron una disminución significativa de la Sobrevivencia bacteriana, también encontrada en *E. coli* (Fuentes-León *et al.*, 2017), que llevó a la exclusión de la concentración 4.0 mg/mL. Este resultado pudiera deberse a las propiedades antimicrobianas descritas para esta especie vegetal (Fadipe y Onifade, 2015). En concentraciones menores, tampoco se encontraron indicadores de genotoxicidad a ninguno de los dos niveles evaluados, por el contrario se encontraron frecuencias de mutaciones más bajas que en el control no tratado. Un resultado semejante (toxicidad celular sin daño al DNA) se ha informado para los aceites esenciales de *Piper gaudichaudianum* (Sperotto *et al.*, 2013).

Por su parte la fracción acuosa mantiene indicadores de daño estadísticamente semejante al control en los tres niveles evaluados (celular, daño primario y daño genético). Trabajos precedentes a esta investigación, empleando *E. coli* como modelo biológico para el ensayo SOS, encontraron toxicidad en la máxima concentración evaluada (Fuentes-León *et al.*, 2017). Semejante a los aceites esenciales, la fracción acuosa mantiene niveles de frecuencia de células mutadas mucho más bajas que el control, lo que indica una posible actividad antimutagénica de los compuestos allí presentes. Por estas razones, los estudios de protección frente a

luz UVC estuvieron dirigidos solamente a la fracción acuosa y aceites esenciales, en aquellas concentraciones que no dañaron a las células, ni al DNA.

Fotoprotección de las fracciones extraídas de *C. citratus*

Las propiedades protectoras ante agentes mutagénicos pueden deberse, básicamente, a dos formas de acción. Una de ellas es impedir que el agente dañino alcance la molécula de DNA, actuando como desmutágenos. Otra forma de acción es que una vez generado el daño en el DNA, este sea reparado o se impida la fijación de la mutación actuando en ese caso como bioantimutágenos (Bhattacharya, 2011). La utilización de una genotoxina de naturaleza física, como la luz UV, cuya penetración y acceso al DNA es directo, hace que el modo de acción desmutagénico quede prácticamente limitado a una acción de carácter físico: absorción o reflexión de la luz.

En la literatura se informa que de manera general, los polifenoles incluidos los taninos naturales son compuestos cromóforos pues poseen estructuras policíclicas aromáticas, que absorben la luz UV y actúan como “pantallas” o “barreras” (Saewan y Jimtaisong, 2013). Ejemplos de ellos presentes en *Cymbopogon* y que pudieran estar contenidos en la fracción acuosa, son ácidos fenólicos y cinámicos, como el ácido coumárico, clorogénico y cafeico, entre otros (Pinto *et al.*, 2015). Los monoterpenos y sesquiterpenos como geranial y neral, entre otros componentes de los aceites esenciales de esta planta, son capaces de absorber la radiación UV. Tal es el caso del limoneno que posee un máximo de absorción en 262 nm. Todos estos fitocompuestos poseen estructuras que, en principio, pudieran resultar favorables para la absorción de radiaciones, entre ellas las del espectro UV. Ello indica un posible efecto protector por un principio físico, actuando como barrera entre la luz y el material biológico en todas las concentraciones evaluadas de la fracción acuosa y a partir de 1 mg/mL en el caso de los aceites esenciales (Fig.2 A). Además, estos resultados presuponen que la fracción acuosa posee mayor capacidad fotoprotectora que los aceites esenciales atendiendo a un principio físico de acción, pues posee menores niveles de transmitancia desde la menor concentración evaluada.

Analizando de conjunto los resultados de inducción de SOS con la transmitancia ejercida por los componentes de estas fracciones, se apreció que no impidió la generación del daño primario pues la actividad

de la enzima β -galactosidasa tiene una magnitud similar al de las células solamente irradiadas (Fig 2 A y B). Ello indica que aunque las fracciones son capaces de absorber un por ciento de la irradiación ultravioleta, la dosis de luz que llega al DNA es capaz de generar daño primario. Lo cual significa que los compuestos presentes en las fracciones acuosas y aceites esenciales, no operan como desmutágenos.

La evaluación de la antimutagenicidad, evidencia que los tratamientos en debate disminuyen la frecuencia de aparición de mutaciones y mostraron diferencias estadísticamente significativas al comparlas con las células irradiadas no tratadas (Fig. 2C). Actualmente es considerado como verdadero agente antimutagénico aquel que disminuye la frecuencia de aparición de las mutaciones, tanto si ello implica o no reducir o prevenir el daño primario en el DNA (Bandyopadhyay *et al.*, 2014). Sobre esta base, la congruencia entre los resultados de fotoprotección obtenidos con el ensayo SOS y el de mutagenicidad Rif^r pudiera explicarse si asumimos que los componentes de las fracciones actúan inhibiendo la fijación de la mutación, por tanto como bioantimutágenos.

La propiedad antimutagénica de la Caña Santa se ha demostrado en fracciones obtenidas a partir de sus diferentes formas de extracción y en varios modelos biológicos como son las bacterias, las levaduras, los insectos y los ratones (Shah *et al.*, 2011). Ha demostrado respuesta positiva frente mutágenos químicos como el peróxido de hidrógeno y agentes alquilantes (Cápiro *et al.*, 2001; 2005).

Esta propiedad antimutagénica también se ha informado para los aceites esenciales de plantas como *Origanum compactum*, *Artemisia herba alba* y *Cinnamomum camphora* que reducen el daño genético nuclear inducido por UVC. También *Salvia officinalis* y sus componentes principales, entre los que se encuentra el limoneno, inhibe la mutagénesis inducida por UVC en *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* (Bakkali *et al.*, 2006; 2008). Estos autores plantean que los aceites esenciales afectan la producción de ATP, de manera que las células realizan un procesamiento más lento de los daños generados por la luz UV pues gran parte de la maquinaria enzimática de reparación requiere de energía. Demostraron, en particular, que los aceites de *Origanum compactum* poseen propiedades antimutagénicas independientes de la reparación por escisión de nucleótidos (NER, por sus siglas en inglés).

En la literatura son varios los ejemplos de productos naturales que fotoprotegen mediante el incremento de la efectividad de los mecanismos de reparación del DNA. Potenciar la reparación de apareamientos erróneos (MMR, por sus siglas en inglés), la fidelidad de la DNA polimerasa, en la replicación o en la reparación por síntesis, el aumento de la reversión del daño o la inhibición de la reparación no libre de errores, son formas de acción propuestas para extractos de plantas (Nichols y Katiyar, 2010). En este sentido, estudios futuros con las fracciones obtenidas de *C. citratus* pudieran contribuir al esclarecimiento de las vías de acción antimutagénica de estos derivados vegetales.

La actividad fotoprotectora de la fracción acuosa que evidencian los resultados de la presente investigación, indican que esta fracción tiene un aporte determinante a los resultados obtenidos por González-Pumariega *et al.*, (2016) y Vernhes *et al.*, (2016) referidos a la capacidad fotoprotectora frente a la radiación UVC de la decocción de *Cymbopogon citratus*. No obstante, compuestos químicos presentes en otras fracciones pudieran estar implicados en la actividad protectora de la decocción, mediante una acción sinérgica y/o aditiva que se perdió debido al proceso de fraccionamiento. Por otra parte, la capacidad antimutagénica encontrada en la fracción de aceites esenciales amplía el aval antimutagénico de la planta. A la vez estos resultados, constituyen una primera aproximación al esclarecimiento de cuáles son las posibles familias de fitocomponentes responsables de la actividad fotoprotectora de la decocción; proponen que la vía de acción protectora es bioantimutagénica.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por MES (Habana, Cuba) y CAPES (Brasília, Brazil). La cepa utilizada fue donada gentilmente por el Departamento de Microbiología del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de São Paulo, Brasil. Agradecer además a Hirán Cabrera que realizó el proceso de fraccionamiento en el Laboratorio Central de Farmacología del Hospital Dr. Salvador Allende. Este trabajo recibió el apoyo del Proyecto de Colaboración Internacional CAPES (Brasil)/MES(Cuba).

LITERATURA CITADA

- Aadeshina, G. O., B. O. Olayinka, A. Mohammed, Y. K. E. Ibrahim, *et al.*, (2012). Antistaphylococcal activity of N-Butanol and aqueous sub-fractions of *Alchornea cordifolia* leaves. *Br. J. Pharm. Res.* 2: 238-248.
- Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck y M. Idaomar (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* 46: 446-475.
- Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck, A. Zhiri, *et al.*, (2006). Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) after treatments with UVC radiation, 8-MOP plus UVA and MMS. *Mutat. Res.* 606: 27-38.
- Bandyopadhyay, N., S. Gautam y A. Sharma (2014). Suppression of SOS repair in *E. coli*: possible mechanism of antimutagenicity and protective effects of common vegetables. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 65: 251-258.
- Bhattacharya, S. (2011). Natural Antimutagens: A review. *Res. J. Medicinal Plants.* 5: 116-126.
- Brusick, D. (1987). Screening Chemicals for Genotoxic Properties. *Principles of Genetic Toxicology*. pp: 79-120. Plenum Press. Nueva York y Londres.
- Cápiro, N., Á. Sánchez-Lamar, G. Fonseca, L. Baluja, *et al.*, (2001). Capacidad protectora de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. ante el daño genético inducido por estrés oxidativo. *Rev. Cuba. Investigaciones Biomed.* 20 (1): 33-38.
- Cápiro, N., A. Sánchez-Lamar, L. Baluja, L. M. Sierra, *et al.*, (2005). Efecto de la Concentración de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf sobre la Genotoxicidad de Mutágenos Modelos, en el Ensayo Smart de Ojos W/W⁺ de *Drosophila melanogaster*. *Rev. CENIC Cienc. Biol.* 36: 1-5.
- Ekpenyong, C. E., E. Akpan y A. Nyoh (2015). Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf extracts. *Chin. J. Nat. Medicines.* 13 (5): 0321-0337.
- Elhassan, I. A., I. M. Eltayeb y E. B. Khalafalla (2016). Physiochemical investigation of essential oils from three *Cymbopogon* species cultivated in Sudan. *J. Pharmacog. Phytochem.* 5 (1): 24-29.
- Emrizal, A. F., R. Yuliandari, K. Rullah, N. R. Indrayani, *et al.*, (2014). Cytotoxic Activities of Fractions and Two Isolated compounds from Sirih Merah (Indonesian red betel), *Piper crocatum* Ruiz & Pav. *Procedia Chem.* 13: 79-84.
- Fadipe, D. O. y A. K. Onifade (2015). Antibacterial and Toxicological Properties of Essential Oils of *Cymbopogon citratus* Stapf and *Khaya ivorensis* Chev. *Int. J. Innovative Res. Adv. Stud.* 2: 28-32.
- Figueirinha, A., A. Paranhos, J. J. Pérez-Alonso, C. Santos-Buelga, *et al.*, (2008). *Cymbopogon citratus* leaves: Characterisation of flavonoids by HPLC–PDA–ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. *Food Chem.* 110: 718-728.
- Fuentes-León, F., M. González-Pumariega, M. Vernhes Tamayo, C.F.M. Menck y Sánchez-Lamar (2017). Toxic Evaluation of *Cymbopogon citratus* Chemical Fractions in *E. coli*. *Cosmetics.* 4 (20): 1-5

- Galhardo, R. S., R. P. Rocha, M. V. Marques y C. F. M. Menck (2005). An SOS-regulated operon involved in damage-inducible mutagenesis in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res.* 5 (8): 2603-2614.
- González-Pumariega, M., F. Fuentes-León, M. Vernhes, A. P. Schuch, *et al.*, (2016). El extracto acuoso de *Cymbopogon citratus* protege al ADN plasmídico del daño inducido por radiación UVC. *Ars Pharm.* 57 (4): 193-199.
- Katiyar, S. K. (2011). Green tea prevents non-melanoma skin cancer by enhancing DNA repair. *Arch. Biochem. Biophys.* 508: 152-158.
- Lopes-Kulishev, C. O., I. R. Alves, E. Y. Valencia, M. I. Pidhirnyj, *et al.*, (2015). Functional characterization of two SOS-regulated genes involved in mitomycin C resistance in *Caulobacter crescentus*. *DNA Repair.* 33: 78-89.
- Macías, B., M. F. Suárez, C. A. Berenguer y L. Pérez (2009). Intoxicaciones por plantas tóxicas atendidas desde un servicio de información toxicológica. *Rev. Cuba. Plantas Medicinales.* 14 (2): 1-8.
- Marcarini, J. C., M. S. F. Tsuboy, R. C. Luiz, L. R. Ribeiro, *et al.*, (2011). Investigation of cytotoxic, apoptosis-inducing, genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells. *Exp. Toxicol. Pathol.* 63: 459-465.
- Marques, V. y A. Farah (2009). Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. *Food Chem.* 113: 1370-1376.
- Matito, C., N. Agell, S. Sanchez-Tena, J. L. Torres, *et al.*, (2011). Protective Effect of Structurally Diverse Grape Procyanidin Fractions against UV-Induced Cell Damage and Death. *J. Agric. Food Chem.* 59: 4489-4495.
- Nichols, J. A. y S. K. Katiyar (2010). Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, anti-oxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of Dermatol. Res.* 302: 1-19.
- Pinto, Z. T., F. F. Sánchez, A. Ramos, A. C. F. Amaral, *et al.*, (2015). Chemical composition and insecticidal activity of *Cymbopogon citratus* essential oil from Cuba and Brazil against housefly. *Braz. J. Veg. Parasit.* 14 (1): 36-44.
- Poindexter, J. S. (1964). Biological properties and classification of the *Caulobacter* group. *Bacteriol. Rev.* 28: 231-295.
- Rao, B., R. Shanbhoge, B. Rao, S. Adiga, *et al.*, (2009). Preventive efficacy of hydroalcoholic extract of *Cymbopogon citratus* against radiation-induced DNA damage on V79 cells and free radical scavenging ability against radicals generated *in vitro*. *Hum. Exp. Toxicol.* 28: 195-202.
- Rojas, J., C. Londoño y Y. Ciro (2016). The Health Benefits of Natural Skin UVA Photoprotective Compounds Found in Botanical Sources. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 8 (3): 13-23.
- Roriz, C. L., L. Barros, A. M. Carvalho, C. Santos-Buelga, *et al.*, (2014). *Pterospartum tridentatum*, *Gomphrena globosa* and *Cymbopogon citratus*: A phytochemical study focused on antioxidant compounds. *Food Res. Int.* 62: 684-693.
- Saewan, N. y A. Jimtaisong (2013). Photoprotection of natural flavonoids. *J. Appl. Pharm. Sci.* 3: 129-141.
- Schuch, A. P. y C. F. M. Menck (2010). The genotoxic effects of DNA lesions induced by artificial UV-radiation and sunlight. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 99: 111-116.
- Seebode, C., J. Lehmann y S. Emmert (2016). Photocarcinogenesis and Skin Cancer Prevention Strategies. *Anticancer Res.* 36: 1371-1378.
- Shah, G., R. Shri, V. Panchal, N. Sharma, *et al.*, (2011). Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, Stapf (Lemon grass). *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 2: 3-8.
- Sharwan, G., P. Jain, R. Pandey y S. S. Shukla (2015). Toxicity profile of traditional herbal medicine. *J. Ayurvedic Herb. Medicine.* 1 (3): 81-90.
- Sperotto, A. R. M., D. J. Moura, V. F. Péres, F. C. Damasceno, *et al.*, (2013). Cytotoxic mechanism of *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oil and its major compound nerolidol. *Food Chem. Toxicol.* 57: 57-68.
- Toudert, N., S. E. Djilani, A. Djilani, A. Dicko, *et al.*, (2009). Antimicrobial Activity of the Butanolic and Methanolic Extracts of *Ampelodesma mauritanica*. *Adv. Nat. Appl. Sci.* 3: 19-21.
- Vernhes, M., M. González-Pumariega, A. P. Schuch, C. F. M. Menck, *et al.*, (2013a). El extracto acuoso de *Phyllanthus orbicularis* K protege al ADN plasmídico del daño inducido por las radiaciones ultravioletas. *Ars Pharm.* 54 (1): 16-23.
- Vernhes, M., M. González-Pumariega, F. Fuentes-León, L. Baly-Gil, *et al.*, (2016). Desmutagenic activity of *Cymbopogon citratus* and *Phyllanthus orbicularis* against UVC damage in *E. coli*. *Adv. Pharm. J.* 1 (3): 80-85.
- Vernhes, M., M. González-Pumariega, L. Andrade, A. P. Schuch, *et al.*, (2013b). Protective effect of a *Phyllanthus orbicularis* aqueous extract against UVB light in human cells. *Pharm. Biol.* 51: 1-7.

• • •

Editor para correspondencia: Dra. Maday Alonso