



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Actividad Quimioprotectora y Caracterización Química Parcial de Orégano
(*Lippia graveolens* Kunth)

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

Cynthia Cristina Arcila Lozano

Dirigido por:

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

SINODALES

Dra. Ma. Gpe. Flavia Loarca Piña
Presidente


Firma

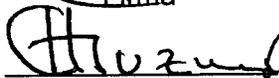
Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Secretario


Firma

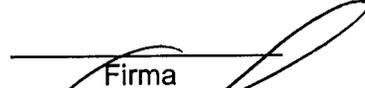
Mtro. Salvador Lecona Uribe
Vocal

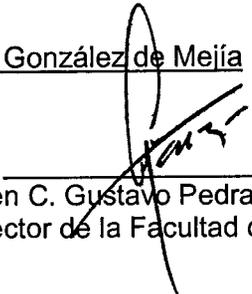

Firma

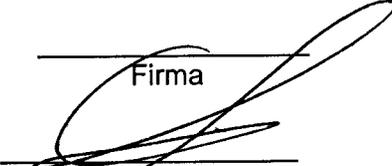
Dr. Salvador Horacio Guzmán Maldonado
Suplente


Firma

Dra. Elvira González de Mejía
Suplente


Firma


M. en C. Gustavo Pedraza Aboytes
Director de la Facultad de Química


Dr. Sergio Quesada Aldana
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Mayo 2004
México

No. Adq. H69185

No. Título _____

Clas. 581.632

A674a

ej.1

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro y en la Universidad de Illinois, Campus Urbana-Champaign, bajo la dirección de la Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña y la Dra. Elvira González de Mejía, cuyos conocimientos y experiencia fueron la base para la realización de este trabajo, y a quienes expreso mi gratitud por el apoyo, la confianza y los consejos brindados.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de Maestría en Ciencias.

De la misma forma externo mi gratitud al programa TIES-US-MÉXICO, por el apoyo para la realización de una estancia en la Universidad de Illinois, Campus Urbana-Champaign.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Querétaro (CONCYTEQ), por el apoyo brindado en la realización del presente trabajo.

De manera muy especial expreso mi agradecimiento al Dr. José Marco Vinicio Ramírez Mares por su valiosa colaboración durante la realización del presente trabajo.

A mis sinodales: Dra. Rosalía Reynoso Camacho, Dr. Salvador Horacio Guzmán Maldonado y Mtro. Salvador Lecona Uribe, por sus sugerencias y valiosos comentarios para mejorar este trabajo.

Con gran amor, gratitud y respeto a mis padres:

Gustavo y María de los Ángeles

con su ejemplo de superación, tenacidad, honestidad y amor formaron a la
persona que soy ahora.

A mis hermanas: Leslie y Brenda; gracias por la paciencia, el amor y la
amistad.

Con cariño a mis compañeros y amigos: Lourdes Manzo, Ivón Ventura, Víctor Olvera, Mónica Ortega, Xóchitl Aparicio, Brisia Villalón, Rocío Meraz, y Lupita González, por su amistad y apoyo.

INDICE GENERAL

	Página
Índice	i
Lista de figuras	iv
Lista de cuadros	v
I. Introducción	1
II. Antecedentes	5
1.0 Compuestos fenólicos	5
1.1 Generalidades	5
1.2 Propiedades biológicas de los compuestos fenólicos	6
2.0 Orégano	7
2.1 Generalidades	7
2.2 Compuestos fenólicos presentes en orégano	9
2.2.1 Potencial antimicrobiano de compuestos fenólicos presentes en el orégano	15
2.3 Métodos para la caracterización de compuestos fenólicos	16
3.0 Ensayos biológicos	17
3.1 Actividad antimutagénica	17
3.1.1 Ensayos Biológicos para detección de mutagenicidad y antimutagenicidad	19
3.1.1.1 Generalidades	19
3.1.1.2 Ensayo de Ames	19
3.2 Actividad antitopoisomerasa	21
3.2.1 Generalidades	21
3.2.2 Levaduras como modelo para estudiar el efecto de drogas con acción sobre topoisomerasas.	29
III. Hipótesis	32

IV. Objetivos	32
1. Objetivo General	32
2. Objetivos particulares	32
V. Materiales y Métodos	33
A. Material	33
1. Compuestos químicos	33
2. Material biológico	33
B. Métodos	34
1.0 Determinación de Polifenoles	34
1.1 Preparación de té	34
1.2 Método de Folin-Ciocalteu	34
1.2.1 Cuantificación	34
2.0 Caracterización parcial de componentes de aceite esencial de orégano	34
2.1 Cromatografía de gases/espectrometría de masas	34
3.0 Ensayos de mutagenicidad y antimutagenicidad	35
3.1 Curva dosis-respuesta de 1-Nitropireno	35
3.1.1 Propagación de la bacteria	35
3.1.2 Preparación de la fracción S9	35
3.1.3 Preparación del agar de superficie y vaciado en cajas Petri	35
3.1.4 Preincubación	36
3.2 Curva dosis-respuesta de aceite esencial	36
3.3 Efecto antimutagénico del aceite esencial	36
4.0 Determinación de actividad antitopoisomerasa	36
5.0 Análisis estadístico	37
VI. Resultados y discusión	38
1.0 Concentración de polifenoles	38
2.0 Actividad antimutagénica del aceite esencial	42
2.1 Curva dosis-respuesta de 1-NP	42

2.2 No toxicidad y no mutagenicidad del aceite esencial	43
2.3 Actividad antimutagénica	43
3.0 Actividad antitopoisomerasa del aceite esencial	45
4.0 Actividad antitopoisomerasa de compuestos fenólicos puros	47
4.1 Actividad antitopoisomerasa de p-cimeno	47
4.2 Actividad antitopoisomerasa de gamma-terpineno	48
4.3 Actividad antitopoisomerasa de carvacrol	53
4.4 Actividad antitopoisomerasa de timol	56
4.5 Actividad antitopoisomerasa de flavonoides	59
4.5.1 Actividad antitopoisomerasa de naringenina	59
4.5.2 Actividad antitopoisomerasa de pinocembrina	61
5.0 Actividad antitopoisomerasa de compuestos presentes en té de hojas de <i>O. vulgare</i> , <i>O. laevigatum</i> y <i>L. graveolens</i> Kunth.	61
6.0 Caracterización parcial de <i>Lippia graveolens</i> Kunth.	66
VII. Conclusiones	75
VII. Bibliografía	76

Lista de figuras

No	Título	Página
1	Estructuras químicas de compuestos fenólicos del tipo flavonoide presentes en algunos tipos de orégano.	13
2	Estructuras químicas de algunos compuestos monoterpenoides presentes en aceites esenciales de orégano.	14
3	Estructuras de algunos inhibidores no catalíticos. Camptotecina y topotecan son venenos topoisomerasa I; doxorubicin, etoposide y amsacrina son venenos topoisomerasa II, AMCA y m-AMCA son variantes de amsacrina.	24
4	Estructuras de fármacos con acción inhibidora topoisomerasa I.	25
5	Inhibidores topoisomerasa II.	26
6	Posibles rutas seguidas en la formación del complejo topoisomerasa II-fármaco-ADN.	28
7	Porcentaje de inhibición de monoterpenos y compuestos presentes en el té de <i>Lippia graveolens</i> .	67
8	Espectro GC/MS de aceite esencial de orégano (<i>Lippia graveolens</i> Kunth).	71
9	Espectro GC/MS del extracto etéreo de <i>Lippia graveolens</i> , hojas secadas a la sombra.	72
10	Espectro GC/MS del extracto etéreo de <i>Lippia graveolens</i> , hojas secadas al sol.	73

Lista de cuadros

No	Título	Página
1	Clasificación taxonómica de especias	3
2	Nombres del orégano de acuerdo al idioma	8
3	Composición química de <i>Origanum</i> y <i>Limpia</i>	11
4	Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> genéticamente modificadas.	31
5	Contenido de compuestos fenólicos en té de hojas de <i>Origanum laevigatum</i> herrenhausen, <i>Origanum vulgare</i> y <i>Lippia graveolens</i> Kunth secado en sombra y bajo sol, expresados como equivalentes de EGCG, ácido gálico y (+) catequina en mg/ml.	39
6	Contenido de compuestos fenólicos en té de hojas de <i>Origanum laevigatum</i> herrenhausen, <i>Origanum vulgare</i> y <i>Lippia graveolens</i> Kunth secado en sombra y bajo sol, expresados como equivalentes de EGCG, ácido gálico y (+) catequina en mg/g DL.	41
7	Curva dosis respuesta de 1-NP en la cepa TA98.	42
8	Actividad antimutagénica de aceite esencial de orégano (<i>Lippia graveolens</i> Kunth) secado a la sombra, en la cepa de prueba TA98, con activación metabólica.	44
9	Capacidad antitopoisomerasa del aceite esencial de orégano (<i>Lippia graveolens</i> Kunth), en las diluciones 5×10^{-6} y 1.67×10^{-5} , sobre las cepas JN394 y JN362a de <i>S. cerevisiae</i> .	46
10	Actividad antitopoisomerasa de p-cimeno en una concentración 30 μ M sobre las cepas JN394 y JN362a de <i>S. cerevisiae</i> .	49
11	Actividad antitopoisomerasa de p-cimeno en una concentración 60 μ M sobre las cepas JN394 y JN362a de <i>S. cerevisiae</i> .	50

12	Actividad antitopoisomerasa de gamma-terpineno en una concentración 30 μM sobre las cepas JN394 y JN362a de <i>S. cerevisiae</i> .	51
13	Actividad antitopoisomerasa de gamma-terpineno en una concentración 150 μM sobre las cepas JN394 y JN362a de <i>S. cerevisiae</i> .	52
14	Actividad antitopoisomerasa de carvacrol en una concentración 150 μM sobre las cepas JN394 y JN362a de <i>S. cerevisiae</i> .	54
15	Actividad antitopoisomerasa de carvacrol en una concentración 300 μM sobre las cepas JN394 y JN362a de <i>S. cerevisiae</i> .	55
16	Actividad antitopoisomerasa de timol en una concentración 500 μM sobre las cepas JN394 y JN362a de <i>S. cerevisiae</i> .	57
17	Actividad antitopoisomerasa de timol en una concentración 1000 μM sobre las cepas JN394 y JN362a de <i>S. cerevisiae</i> .	58
18	Actividad antitopoisomerasa de naringenina en una concentración 500 μM sobre las cepas JN394 y JN362a de <i>S. cerevisiae</i> .	60
19	Actividad antitopoisomerasa de pinocembrina en una concentración 75 μM sobre las cepas JN394 y JN362a de <i>S. cerevisiae</i> .	63
20	Actividad antitopoisomerasa del té preparado con hojas de <i>Origanum vulgare</i> y <i>Origanum laevigatum</i> herrenhausen sobre las cepas JN394 y JN362a de <i>S. cerevisiae</i> .	64
21	Actividad antitopoisomerasa del té preparado con hojas de <i>Lippia graveolens</i> , secadas en sol y sombra, sobre las cepas JN394 y JN362a de <i>S. cerevisiae</i> .	65
22	Principales compuestos del aceite esencial de <i>Lippia graveolens</i> .	70

Componentes presentes en los extractos etéreos de *Lippia graveolens*, hojas secadas en sol y sombra.

RESUMEN

El orégano es una planta que comprende varios géneros y especies, los más comunes son el *Origanum vulgare*, nativo de Europa, y el *Lippia graveolens*, originario de México; algunas propiedades del orégano y sus extractos han sido estudiadas debido al creciente interés por sustituir los compuestos aditivos sintéticos de los alimentos. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad biológica y caracterizar parcialmente el orégano (*Lippia graveolens* Kunth), para lo cual se determinó la actividad antimutagénica del aceite esencial de *Lippia graveolens* sobre la mutagenicidad inducida por 1-nitropireno (1-NP) mediante el ensayo de microsuspensión; así como la actividad antitopoisomerasa del aceite esencial, de té de hojas secadas al sol y sombra, y de compuestos fenólicos puros, empleando como modelo las mutantes de *S. cerevisiae* JN394 y JN362a. La composición del aceite esencial y de extractos etéreos de la planta fueron analizados mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC/MS). La cuantificación de compuestos fenólicos en las hojas de *Lippia* se realizó por el método de Folin-Ciocalteu. El contenido de compuestos fenólicos fue de 223 ± 5 mg equivalentes de epigalo catequin galato/g de hoja seca (eq EGCG/g HS) en hojas secadas en sombra y 217 mg eq EGCG/g HS en las hojas secadas al sol. Los principales compuestos encontrados en el aceite esencial fueron p-cimeno, γ -terpineno, timol y carvacrol; estos monoterpenos y eucaliptol fueron identificados también en los extractos etéreos, como componentes mayoritarios. El aceite esencial inhibió la mutagenicidad inducida por 1-NP en 46%, 44%, 47% y 23%, en las diluciones 1.25×10^{-5} , 2.5×10^{-5} , 5×10^{-5} y 1×10^{-4} respectivamente; sin embargo no mostró efecto antitopoisomerasa en las concentraciones probadas. Los compuestos monoterpénicos puros p-cimeno (30 μ M) y carvacrol (300 μ M) presentaron inhibición en la actividad topoisomerasa de 45.27% y 71.83%, respectivamente; así como las diferentes preparaciones de té, cuyos porcentajes fueron desde 64.58% hasta 86.09%. Resultados que sugieren que el orégano mexicano *Lippia graveolens* Kunth y/o sus componentes pueden ser considerados una alternativa para el tratamiento y/o prevención de trastornos crónico-degenerativos.

Palabras clave: orégano, lippia, aceite esencial, compuestos fenólicos, monoterpeno, actividad antimutagénica, actividad antitopoisomerasa.

SUMMARY

The oregano is a plant that includes several genus and species, the most common are *Origanum vulgare*, native of Europe, and *Lippia graveolens*, native of Mexico; some properties of the oregano and its extracts are being currently studied due to the growing interest for substituting the synthetic additive compounds in foods. The aim of this study was to determine the biological activity and composition of oregano (*Lippia graveolens* Kunth), the antimutagenic activity of the essential oil against the mutagenicity induced by 1-nitropyren (1-NP) was evaluated using the microsuspension assay, the antitopoisomerase activity of the essential oil, tea and pure phenolic compounds was tested on the growth of JN394 and JN362a mutants of *S. cerevisiae*, by the clone forming assay. The composition of the essential oil and ethereal extracts were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). The phenolic compounds in leaves of *Lippia* were quantified by Folin-Ciocalteu method. The phenolic compounds content was 223 ± 5 mg epigallo catechin gallate equivalents/g dried leaves (EGCG eq/g DL) in leaves dried in shade and 217 ± 2 mg EGCG eq /g dried leaves in leaves dried under sun light. The main components in essential oil were ρ -cymene, γ -terpinene, thymol and carvacrol; these monoterpenes and eucalyptol were also identified in the ethereal extracts, as majority components. Essential oil inhibited the mutagenicity induced by 1-NP in 46%, 44%, 47% and 23%, in dilutions 1.25×10^{-5} , 2.5×10^{-5} , 5×10^{-5} and 1×10^{-4} respectively; however it did not show antitopoisomerase effect at the concentrations tested. The pure monoterpenes ρ -cymene (30 μ M) and carvacrol (300 μ M) exhibited antitopoisomerase activity, inhibiting 45.27% and 71.83%, respectively; as well as the different tea preparations, whose percentages were from 64.58% to 86.09%. Results that suggest that the Mexican oregano *Lippia graveolens* Kunth and/or its components can be considered an alternative for the treatment and/or prevention of chronic-degenerative disorders.

Key words: oregano, lippia, essential oil, phenolic compounds, monoterpen, antimutagenic activity, antitopoisomerase activity.

I.- INTRODUCCIÓN

Aún cuando el uso de plantas con fines medicinales ha existido desde tiempos remotos, solo recientemente está siendo sustentada científicamente la evidencia nutricional y medicinal de sus fitoquímicos; los cuales pueden ser incorporados en alimentos o suplementos alimenticios como nutraceuticos o algunas veces a productos farmacéuticos. El rápido crecimiento de la industria de los nutraceuticos ha impactado a los consumidores quienes gastan millones de dólares cada año en alimentos nutraceuticos y suplementos. Definiendo un alimento nutraceutico como un alimento completo, ingredientes o suplementos dietarios a los que se les ha demostrado beneficios a la salud y/o médico, además de sus funciones nutricionales básicas (Morrissey, 2002). Un agente nutraceutico puede ser un producto aislado o purificado de un material biológico y que generalmente se vende como medicamento y que puede estar asociado o no con alimentos (Morrissey, 2002).

Steinmetz y Potter (1996), revisaron 206 estudios epidemiológicos sobre la relación entre el consumo de vegetales y frutas y el riesgo a desarrollar cáncer. El efecto protector fue evidente para cáncer de estómago, esófago, pulmón, cavidad oral y faringe, endometrio, páncreas y colon. Entre los fitonutrientes potencialmente relacionados con esta evidencia se encuentran isotiocianatos, indol-3-carbinol, isoflavonas, inhibidores de proteasas, saponinas, fitoesteroles, inositol, vitamina C, D-limoneno, luteína, ácido fólico, beta-caroteno, licopeno, selenio, vitamina E, flavonoides y fibra dietaria.

México posee una amplia biodiversidad que no es explotada de forma adecuada, algunas especies herbólicas han sido usadas por años por los indígenas para el tratamiento y/o prevención de enfermedades, sin embargo, la investigación existente no es suficiente para tener el conocimiento de metabolitos secundarios con potencial nutraceutico.

Una de estas especies es el orégano que además de usarse en el arte culinario, actualmente tiene un potencial enorme debido a sus propiedades nutraceuticas (Arcila-Lozano *et al.*, 2004).

El orégano tiene usos medicinales, culinarios y cosméticos. Etimológicamente, el nombre orégano proviene de *óros* “montaña” y del verbo *ganoûsthai* “deleitarse”; dado que el orégano prefiere grandes altitudes en el clima Mediterráneo. Esta hierba posee un fuerte y amargo aroma y un sabor picante. El nombre “orégano” comprende más de dos docenas de diferentes especies de plantas, con flores y hojas que presentan un olor característico a “especioso”. Las hojas secas de *Origanum vulgare*, nativo de Europa y de *Lippia graveolens*, planta nativa de México son de uso culinario común (Pierce, 1999). El género *Origanum* pertenece a la familia *Lamiaceae*, mientras que el *Lippia graveolens*, a la familia *Verbenaceae*, ambas familias se encuentran relacionadas al pertenecer a la orden *Tubiflorae*. El cuadro 1 presenta la clasificación taxonómica de las distintas especies (Skuola *et al.*, 1999).

Algunas especies del género *Origanum* son originarias del Mediterráneo y todas se consideran como especias.

El clima, la estación y el tipo de suelo tienen mucha influencia en la composición del orégano y de los aceites esenciales, que la diferencia entre las especies (www-ang.kfunigraz.ac.at). La composición y la cantidad de los metabolitos secundarios de estas plantas son afectados por factores climáticos, la altitud, la época de cosecha de las flores y hojas, y su estado de crecimiento. Por lo cual, el estudio de dichos factores y la influencia en su cultivo es importante para su mejor aprovechamiento y explotación (Kokkini *et al.*, 1997). El p-cimeno y los derivados fenólicos carvacrol y timol han sido encontrados en diversas hierbas y especias incluyendo al orégano. Estas sustancias son monoterpenoides representativos de un pequeño grupo de compuestos aromáticos que la naturaleza produce vía la ruta del mevalonato seguido por compuestos aromáticos que involucran al ácido shikímico (Dewick, 1997). La Organización Mundial de la Salud estima que cerca del 80% de la población en el mundo usa extractos vegetales o sus compuestos activos, por ejemplo los terpenoides, para sus cuidados de salud primarios.

Existen múltiples estudios sobre la actividad antimicrobiana y antifúngica de los extractos de diferentes tipos de orégano. Se ha evaluado la actividad antimicrobiana de los componentes aislados, así como el del aceite esencial.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de especias.

Angiospermae	Dicotiledoneae	Sympetalae	Tubiflorae	Lamiaceae	Albahaca, Mejorana, Menta, Orégano, Romero, Salvia, Tomillo
				Solanaceae	Chile, Pimentón, Pimiento rojo
				Pedaliaceae	Ajonjolí
				Vervenaceae	Orégano Mexicano
		Cañpunulatae	Compositae	Camomila, Chicoria, Estragón	
		Arquiclamydeae	Piperales	Piperaceae	Cubeba, pimienta larga, pimienta
			Ranales	Myristicaceae	Macis, Nuez moscada
				Lauraceae	Laurel, Canela, Casia
	Magnoliaceae			Anís estrella	
	Rhoeadales		Cruciferae	Mostaza, Wasabi	
	Myrtiflorae		Myrtaceae	Pimienta inglesa, Clavo	
	Unbelliflorae	Umbelliferae	Anís, Comino, Apio, Chirivía, Cilantro, Comino, Eneldo, Hinojo, Perejil		
	Monocotiledoneae	Liliiflorae	Liliaceae	Ajo, Cebolla	
			Iridaceae	Azafrán	
Scitamineae		Zingiberaceae	Cardamomo, Jengibre		
Orchidales		Orquidaceae	Vainilla		

Adaptado de Nakatani, 1992.

Los fenoles carvacrol y principalmente timol poseen los niveles más altos de actividad contra microorganismos gram negativos, excepto para *P. aeruginosa*, (Sivropoulou *et al.*, 1996, Elgayyar *et al.*, 2001). Otros compuestos, como el γ -terpineno y p -cimeno no mostraron actividad contra las bacterias, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. thypimurium*, *S. aureus* y *S. epidermidis* (Aligiannis *et al.*, 2001, Sivropoulou *et al.*, 1996).

Los aceites esenciales de plantas representan una alternativa para la protección de los cultivos contra plagas (Isman, 2000). Algunos aceites esenciales y sus componentes poseen un amplio espectro de actividad contra insectos, ácaros, hongos y nemátodos, tales como *Rhyzopertha dominica*, *Tribolium castaneum*, y *Sitophilus oryzae*, plagas que atacan granos almacenados y contra *Musca domestica* (Isman, 2000; Prates *et al.*, 1998).

El aceite esencial de *O. syriacum* contiene un alto nivel de carvacrol (61%), el cual posee una concentración letal media (LC_{50}) = 37.6 mg/L, seguido del timol (21.8%) con un LC_{50} = 36 mg/L contra larvas del mosquito *Culex pipiens molestus*. Entre otros compuestos activos se tiene a la mentona, el 1,8-cineol, el linalol y el terpineol (Traboulsi *et al.*, 2002). Los aceites esenciales de *O. majorana* y *O. compactum* poseen una alta actividad insecticida contra huevos y adultos de *Mayetiola destructor* (Lamiri *et al.*, 2001).

El orégano mexicano es una planta perenne que crece de manera silvestre. A mediados de los 90's México fue el segundo abastecedor (30-34 %) después de Turquía (53-55 %) de orégano al mercado de los EUA (Buzzanell *et al.*, 1995). Sin embargo, algunos comercializadores consideran que el orégano mexicano es de una calidad inferior al europeo por presentar un sabor más fuerte, lo cual se relaciona directamente a la composición y proporción de los compuestos presentes en el aceite esencial.

Por lo anterior, es de interés conocer la naturaleza química de estos compuestos en hoja seca, té y aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth), evaluando algunas propiedades biológicas (actividad antimutagénica y antitopoisomerasa).

II.- ANTECEDENTES

1.0 COMPUESTOS FENÓLICOS

1.1 GENERALIDADES

Los compuestos fenólicos, referidos comúnmente como polifenoles, están presentes en todas las plantas, siendo esenciales para su fisiología y morfología y se encuentran involucrados en el crecimiento, reproducción y resistencia a patógenos (Bravo, 1998). Existen más de 8000 estructuras fenólicas que han sido identificadas. Estas varían estructuralmente, desde moléculas simples, como ácidos fenólicos con una estructura de anillo C₆; hasta compuestos altamente polimerizados como los taninos (Kris-Etherton *et al.*, 2002).

Un compuesto fenólico o polifenólico es una sustancia que posee un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo, incluyendo derivados funcionales (ésteres, metil ésteres, glucósidos, etc.). Los compuestos fenólicos están comprendidos en tres grupos (Ho, 1992):

- ❑ Fenoles simples ó ácidos fenólicos
- ❑ Derivados del ácido hidroxicinámico
- ❑ Flavonoides

Los fenoles simples ó ácidos fenólicos incluyen monofenoles como el p-cresol, aislado de varias frutas como la frambuesa (van Straten, 1977), y difenoles como la hidroquinona (van Sumere, 1989) y trifenoles como el ácido gálico, presente en su forma esterificada en té.

Los derivados del ácido hidroxicinámico son exclusivamente derivados de los ácidos p-cumárico, caféico y ferúlico. Los ácidos hidroxicinámicos están usualmente en formas conjugadas como ésteres y glicósidos. El más importante miembro de este grupo es el ácido clorogénico, el cual es el sustrato para el oscurecimiento enzimático en manzanas y peras (Ho, 1992).

Los flavonoides son los compuestos fenólicos más comúnmente presentes en plantas, estos pueden ser catalogados dentro de 13 clases, comprendiendo más

de 5000 compuestos, siendo las flavonas, flavonoles y sus glicósidos los más comunes (Bravo, 1998).

Los extractos crudos de frutas, hierbas, vegetales y cereales ricos en compuestos fenólicos están incrementando el interés en la industria alimenticia debido a que retardan la degradación de lípidos y por lo tanto mejoran la calidad y valor nutricional del alimento (Kähkönen *et al.*, 1999).

1.2 Propiedades biológicas de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos, sustancias bioactivos extranutricionales, se encuentran en cantidades pequeñas en los alimentos, y están íntimamente relacionados con características sensoriales de los vegetales frescos y procesados (Kris-Etherton *et al.*, 2002).

Se ha descrito que los compuestos fenólicos pueden poseer actividades biológicas, las que a su vez confieren beneficios a la salud como antioxidantes y atrapadores de radicales libres (Surh, 1999). Esta capacidad antioxidante es debida principalmente a sus propiedades redox, las cuales les permiten reducir agentes, donar hidrógenos y atrapar singuletes de oxígeno; además, tienen potencial para quelar metales (Rice-Evans *et al.*, 1995). También actúan como inhibidores de la mutagenicidad inducida por algunos mutágenos potentes como los hidrocarburos policíclicos aromáticos, nitrosaminas, micotoxinas, etc. (San y Chan, 1987; Teel y Castonguay, 1992; Choi *et al.*, 1994; Enderharder y Tang, 1997; Hour *et al.*, 1999). Huang y Ferraro (1992) informaron sobre la capacidad de algunos flavonoides para modular ciertas actividades enzimáticas.

Un gran número de plantas aromáticas, especias y medicinales contienen compuestos químicos que exhiben propiedades antioxidantes. Numerosos estudios llevados a cabo en algunas de estas plantas, como romero, salvia y orégano dieron como resultado el desarrollo de formulaciones antioxidantes naturales para alimentos, cosméticos así como otras aplicaciones (Miliauskas *et al.*, 2004).

2.0 ORÉGANO

2.1 GENERALIDADES

El orégano europeo *Origanum* spp. pertenece a la familia *Lamiaceae*, mientras que el orégano mexicano *Lippia graveolens* Kunth es de la familia *Verbenacea*.

En base a criterios morfológicos, el género *Origanum* se ha clasificado en tres grupos, diez secciones, 38 especies, seis subespecies y 17 híbridos (Nakatani, 1992). Lawrence (1984) informa que son cuatro los grupos de orégano comúnmente usados con propósitos culinarios: el griego (*Origanum vulgare* spp. *Hirtum* (Link) *letsvaart*), el español (*Coridohymus capitatus* (L.) *Hoffmanns* y *Link*), el turco (*Origanum onites* L.) y el mexicano (*Lippia graveolens* Kunth).

Lippia graveolens Kunth es una planta perenne que crece de manera silvestre en suelos arcillosos con pH de 4.5 a 8.7 y a temperaturas que van de los 5 a los 28° C. Requiere poca irrigación una vez que la planta está establecida (UCDavis 1998).

Algunos sinónimos o nombres con los que se conoce el orégano en diferentes idiomas se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Nombres del orégano de acuerdo al idioma.

Origen	Nombre común
Farmacología	Herba Origani
Botánica	Origanum vulgare
Árabe	Anrar
Danés	Oregano
Holandés	Wilde marjolein
Inglés	Wild marjoram, oregan
Estonio	Harilik pune
Farsi	Avishan kuhi
Finlandés	Mäkimeirami
Francés	Marjolaine bâtarde, Marjolaine sauvage, Origan, Pelevoué, Marazolette, Penevoué, Thé rouge, Thym de berger, Doste
Alemán	Oregano, Wilder majoran, Dost, Kostets
Húngaro	Oregánó, Szurokfű, Vadmajoránna, Kaslók, Fekete gyopar
Islandés	Oreganó, Bergminta
Italiano	Erba acciuga, Origano
Noruego	Kung, Bergmynte
Polaco	Lebiodka pospolita, Dziki majeranek
Portugués	Onrégão, Orégano
Rumano	Sovírf, Oregano
Ruso	Dushitsa
Español	Orégano,
Sueco	Vild Mejram, Kungsmynta
Turco	Izmir kekigi

(www-ang.kfunigraz.ac.at/)

2.2 COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN EL ORÉGANO

Existen diversos estudios sobre la composición química del orégano, de extractos acuosos y aceites esenciales (Pascual *et al.*, 2001). Se han identificado flavonoides como la apigenina y la luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano (Justesen y Knuthsen, 2001). En el *O. vulgare* se han encontrado ácidos coumérico, ferúlico, caféico, *p*-hidroxibenzóico y vainillínico (Milos *et al.*, 2000). Los ácidos ferúlico, caféico, *p*-hidroxibenzóico y vainillínico están presentes en *O. onites* (Gerothanassis *et al.*, 1998).

En extractos metanólicos de hojas de *L. graveolens* se han encontrado siete iridoides minoritarios conocidos como loganina, secologanina, secoxyloganina, dimetilsecologanosido, ácido logánico, ácido 8-epi-logánico y carioptosido; y tres iridoides mayoritarios como el ácido carioptosídico y sus derivados 6'-O-*p*-coumaroil y 6'-O-cafeoil (Rastrelli *et al.*, 1998). También contiene flavonoides como naringenina y pinocembrina, lapachenol e icterogenina (Wagner y Elmadfa, 2003; Hutchings y van Staden, 1994; Pascual *et al.*, 2001).

Los monoterpenos, compuestos volátiles con olores intensamente pungentes, son los responsables de las fragancias y las sensaciones de olor-sabor de muchas plantas (Dewick, 1997). Estructural y biológicamente son muy diferentes, llegando a clasificárseles hasta en 35 grupos (Robbers *et al.*, 1996). De acuerdo a los compuestos presentes, las diferentes especies se clasifican en quimiotipos. Los principales quimiotipos de la especie *O. vulgare* son el carvacrol y el timol cada una con enzimas específicas que dirigen su biosíntesis (D'antuono *et al.*, 2000).

La subespecie *O. vulgare spp. hirtum* es la más estudiada, especialmente en relación a la composición y calidad de su aceite esencial, ya que este último tiene un importante valor comercial. En esta subespecie el rendimiento del aceite esencial en la hoja seca varía entre 2% y 6% (Russo *et al.*, 1998; Milos *et al.*, 2000). El contenido de aceite se ve afectado por la altitud del lugar de siembra (Russo *et al.*, 1998), y por la época de recolección, siendo este más bajo en el otoño (Kokkini *et al.*, 1997).

Los compuestos mayoritarios encontrados en *O. vulgare* spp. hirtum son el carvacrol, timol, p-cimeno y γ -terpineno, aunque en diversos estudios realizados por cromatografía de gases/espectrometría de masas se han identificado de 16 a 56 compuestos diferentes (Russo *et al*, 1998; Milos *et al*, 2000; Aligiannis *et al*, 2001). Estos componentes también se han encontrado en *O. dictamnus* (Sivropoulou *et al*, 1996) y se sabe que otras especies como *O. scabrum* y *O. microphyllum* contienen alrededor de 28 y 41 compuestos diferentes, respectivamente (Aligiannis *et al*, 2001). El Cuadro 3 presenta los compuestos principales de algunos tipos de orégano.

La composición química del aceite esencial de orégano es de gran importancia debido a su actividad biológica. En un aceite esencial pueden encontrarse hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, así como sus derivados oxigenados (alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres), sustancias azufradas y nitrogenadas. Los compuestos más frecuentes derivan del ácido mevalónico; se les clasifica en monoterpenoides y sesquiterpenoides (Domínguez, 1979). Por lo general se obtienen por arrastre de vapor a partir de flores, brotes, semillas, hojas, ramas, cortezas, hierbas, maderas, frutas y raíces, aunque también pueden extraerse por solventes orgánicos.

La época de la cosecha, factores climáticos, intensidad en el metabolismo de la planta y actividad secretoria, entre otros factores, afectan la síntesis y secreción de aceites.

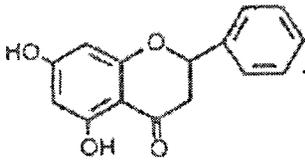
Cuadro 3. Composición química de *Origanum* y *Lippia*

Nombre Científico	Principales componentes
<i>O. vulgare</i>	<p>Ácido o-cumárico, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido vainillínico, ácido rosmarínico.</p> <p>Mirceno, α-terpineno p-cimeno, γ-terpineno, timol, carvacrol, β- cariofileno</p>
<i>O. dictamnus</i>	p-cimeno, timoquinona, carvacrol
<i>O. onites</i>	Ácido ferúlico, ácido cafeico, p-hidroxibenzoico, ácido vainillínico
<i>O. glandulosum</i>	p-cimeno, γ -terpineno, timol, carvacrol
<i>L. multiflora</i>	1, 8-cineol, linalool, β -cariofileno, (Z)b-farneseno, germacreno D, (Z)-nerolidol
<i>L. graveolens</i>	Ácido carioptosídico, naringenina, pinocembrina, β -felandreno, carvacrol, 1,8-cineol, p-cimeno, metil timol, timol.
<i>L. sodoides</i>	metil 3, 4-dihidroxibenzoato, lapachenol, quercetin, luteolin, lipsidoquinona.

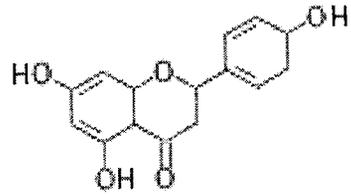
(Hutchings y van Staden, 1994 ; Kokkini *et al.*, 1997 ; Gerothanassis *et al.*, 1998; Rastrelli *et al.*, 1998 ; Russo *et al.*, 1998 ; Milos *et al.*, 2000; Oladimeji *et al.*, 2000 ; Costa *et al.*, 2001 ; Pascual *et al.*, 2001 ; Economakis *et al.*, 2002 ; Exarchou *et al.*, 2002 ; Ruberto *et al.*, 2002).

Se ha informado que los aceites esenciales de orégano ricos en compuestos fenólicos poseen altos niveles de actividad antimicrobiana, así como propiedades expectorantes, antiespasmódicas, antisépticas, analgésicas y antifúngicas (Russo *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2001). En el aceite del orégano que crece en forma silvestre se ha encontrado la presencia dominante de carvacrol y timol. De igual manera, los hidrocarburos monoterpenoides γ -terpineno y p -cimeno están presentes de manera constante en los aceites esenciales, pero siempre en cantidades menores a las de los dos fenoles (Kokkini *et al.*, 1997).

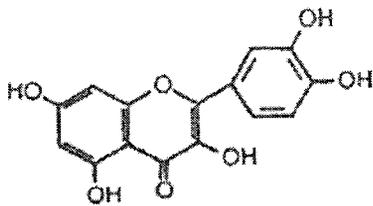
En el aceite de orégano silvestre cultivado en hidroponía con fósforo adicionado a la solución nutritiva, se identificaron 46 componentes. En este caso, los principales compuestos fueron el carvacrol (29%-73%) y el p -cimeno (11%-42%). Al mismo tiempo se observó un incremento en el contenido de p -cimeno y un decremento de carvacrol en el aceite de plantas cultivadas en un medio nutritivo enriquecido con nitrógeno (Economakis *et al.*, 2002), esto se explica por el hecho de que p -cimeno es precursor de timol, mientras que γ -terpineno lo es de carvacrol. Los aceites esenciales de especies de *Lippia* contienen limoneno, β -cariofileno, p -cimeno, canfor, linalol, α -pineno y timol, los cuáles pueden variar de acuerdo al quimiotipo (Pascual *et al.*, 2001). Se ha informado que el aceite esencial de orégano mexicano posee un 50 % de timol, 12 % carvacrol, 9 % p -cimeno y otros monoterpenos en cantidades entre 1 y 5 % (1,8-cineol, γ -terpineno, terpineno-4-ol y acetato de 4-terpinenil), (www-ang.kfunigraz.ac.at). Las Figuras 1 y 2 presentan las estructuras químicas de algunos de los compuestos principales presentes en el orégano.



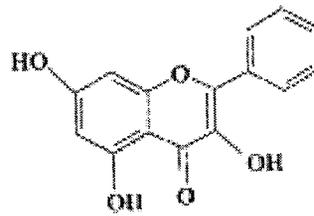
Pinocembrina



Naringenina

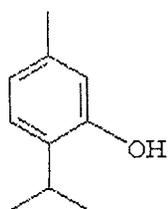


Quercetina

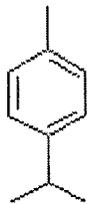


Galangina

Figura 1. Estructuras químicas de compuestos fenólicos del tipo flavonoide presentes en algunos tipos de orégano. (So *et al.*, 1997; Heo *et al.*, 2001).



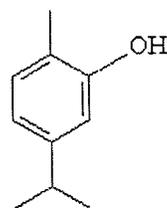
Timol



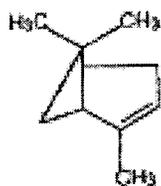
p-cimeno



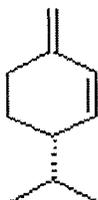
γ -terpineno



Carvacrol



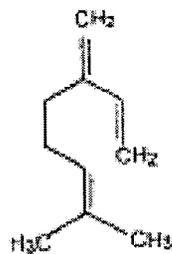
α -pineno



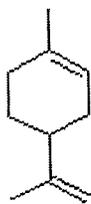
β -felandreno



β -pineno



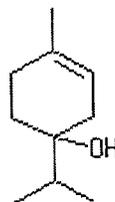
β -mirceno



limoneno



linalol



terpinen-4-ol

Figura 2. Estructuras químicas de algunos compuestos monoterpénicos presentes en aceites esenciales de orégano (De Oliveira *et al*, 1997).

2.2.1 POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN EL ORÉGANO

Existen múltiples estudios sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de diferentes tipos de orégano. Se ha encontrado que los aceites esenciales de las especies del género *Origanum* presentan actividad contra bacterias gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae*; y las gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis* (Elgayyar *et al.*, 2001; Aligiannis *et al.*, 2001). Tienen además capacidad antifúngica contra *Cándida albicans*, *C.tropicalis*, *Torulopsis glabrata*, *Aspergillus níger*, *Geotrichum* y *Rhodotorula*; pero no contra *Pseudomona aeruginosa* (Sivropoulou *et al.*, 1996). Se ha evaluado la actividad antimicrobiana de los componentes aislados, así como el del aceite esencial. Los fenoles carvacrol y timol poseen los niveles más altos de actividad contra microorganismos gram negativos, excepto para *P. aeruginosa*, siendo el timol más activo (Sivropoulou *et al.*, 1996, Elgayyar *et al.*, 2001). Otros compuestos, como el γ -terpineno y p -cimeno no mostraron actividad contra las bacterias estudiadas (Aligiannis *et al.*, 2001, Sivropoulou *et al.*, 1996). Los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) para los aceites esenciales se han establecido entre 0.28-1.27 mg/ml para bacterias, y de 0.65-1.27 mg/ml para hongos (Aligiannis *et al.*, 2001).

En el caso de *E.coli* O157:H7 existe una relación concentración/efecto a 625 μ /L con actividad bactericida después de un minuto de exposición al aceite, mientras que después de cinco minutos se requirieron 156 y 312 μ /L. Dicha acción antimicrobiana posiblemente se debe al efecto sobre los fosfolípidos de la capa externa de la membrana celular bacteriana, provocando cambios en la composición de los ácidos grasos. Se ha informado que las células que crecen en concentraciones subletales de carvacrol, sintetizan dos fosfolípidos adicionales y se detiene la síntesis de uno de los fosfolípidos originales (Burt y Reinders, 2003; Ultee *et al.*, 2000).

También se ha demostrado que para los aceites de *L. multiflora* y *L. chevalieri*, los valores de concentración mínima bactericida (CMB) son más bajos para los microorganismos gram negativos (*Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteria*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*) que para los gram positivos (*Staphylococcus camorum*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Bacillus cereus*). *L. multiflora* presenta alta actividad antimicrobiana debido a su alto contenido de timol y sus derivados. *L. chevalieri* contiene un alto porcentaje de p-cimeno, el cual ejerce un efecto antagónico con el carvacrol y el timol, lo que explica su baja actividad antimicrobiana (Bassole *et al.*, 2003; Cosentino *et al.*, 1999). Así mismo, Hernández *et al.*, (2000) encontraron que el extracto metanólico de *Lippia turbinata* posee una fuerte actividad contra gram positivos (*S. aureus*, *S. epidermidis* y *Streptococcus β-hemoliticus*) y gram negativos (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella sp.*).

La consideración de la gran actividad antimicrobiana, acoplado a los efectos anticarcinogénicos del aceite esencial de orégano muestra el potencial de esta planta aromática en la conservación de alimentos así como en la industria cosmética y farmacéutica (Russo *et al.*, 1998).

2.3 MÉTODOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Russo *et al.*, (1998), determinaron la composición del aceite esencial mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS) de 24 muestras de aceite esencial de *Origanum vulgare* spp. *hirtum* (Link), recolectado en el sur de Italia en diferentes épocas, condiciones climáticas, y altitud. Identificaron un total de 56 compuestos, ocho de ellos por GC/MS no reportados anteriormente en la bibliografía; 3-octanona, trans-p-menth-2-en-1-ol, timoquinona, acetato de timol, alcohol cumínico, valenceno, allo-aromadendreno, germacreno-D y germacreno-D-4-ol. Una diferencia significativa se encontró entre el contenido de dos fenoles isoméricos, carvacrol (fenol no cristalizabile) y timol (fenol cristalizabile) y sus precursores γ -terpineno y p-cimeno.

El incremento en el contenido de timol con el correspondiente decremento en carvacrol indica una correlación entre los dos componentes. Los quimiotipos forman variedades bioquímicas en las especies botánicas, cada una con enzimas específicas codificadas genéticamente que dirigen la biosíntesis de ciertos compuestos (Russo *et al.*, 1998).

A pesar de que muchas plantas y especies han sido estudiadas ampliamente en sus aceites esenciales, el contenido de compuestos fenólicos es poco estudiado en otros extractos.

Los perfiles fenólicos se analizan frecuentemente después de un proceso de hidrólisis o de glicosidación, para simplificar su identificación. En algunos métodos el material biológico es pulverizado, los compuestos fenólicos se extraen con solventes orgánicos ó soluciones amortiguadoras, se someten a destilación o se preparan en té con agua bajo reflujo. La cuantificación de fenoles totales se lleva a cabo por el método de Folin-Ciocalteu, por espectrometría de ionización por impacto electrónico (EI) o por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Kähkönen *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2001; Zheng y Wang, 2001; Parejo *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2002).

En *O. vulgare* ssp. *hirtum* y *O. x majoricum* se ha determinado el contenido total de polifenoles en hojas utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu, encontrándose una concentración de 11.8 ± 0.6 y 11.65 ± 0.29 mg equivalentes de ácido gálico/g de hoja fresca en *O. vulgare* y *O. x majoricum*, respectivamente (Zheng y Wang, 2001).

3.0 ENSAYOS BIOLÓGICOS

3.1 ACTIVIDAD ANTIMUTAGÉNICA

La mayoría de los cánceres son carcinomas de origen epitelial, los cuales tienen como sitios primarios al pulmón, colon y útero, lo que refleja la selectiva vulnerabilidad de estos tejidos al daño causado por la exposición frecuente a ambientes externos, se estima que del 80 al 90% de los cánceres se atribuyen a factores de riesgo ambientales que incluyen químicos, radiaciones y virus. Las

sustancias involucradas son introducidas al ambiente por manipulación humana, y pueden por lo tanto, ser controladas o removidas, lo que constituye la base de una prevención primaria (Surh, 1999). El conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares de la carcinogénesis han permitido el desarrollo de una estrategia enfocada en su prevención, esta es la quimioprevención, la cual se define como el uso farmacológico de agentes naturales o sintéticos para prevenir, inhibir, retardar o revertir el proceso de carcinogénesis (Surh, 1999; She *et al.*, 2003).

La dieta es una mezcla compleja, en la que pueden encontrarse tanto sustancias benéficas como tóxicas. Muchos estudios epidemiológicos desarrollados en los últimos años han demostrado el papel que desempeñan los constituyentes de la dieta derivada de vegetales en la prevención de enfermedades crónico/degenerativas como el cáncer, cardiovasculares y diabetes. Esto ha provocado un gran interés en buscar fuentes de nutrientes y de no nutrientes que ayuden a prevenir o contrarrestar el efecto adverso que pudiesen ocasionar los aditivos sintéticos, tóxicos naturales, las sustancias generadas durante el procesamiento y los contaminantes accidentales presentes en los alimentos.

Se ha informado que algunos fitoquímicos (sustancias químicas producidas por las plantas) presentes en el orégano, poseen propiedades biológicas; por ejemplo, los monoterpenos presentes en los aceites esenciales son inhibidores efectivos de la carcinogénesis. El aceite esencial de orégano tiene la capacidad de inducir un incremento en la actividad de la enzima detoxificante glutathione S-transferasa (GST) cuando se administra oralmente, lo cual sugiere un potencial anticarcinogénico (Lam y Zheng, 1991). Los monoterpenos con diferentes grupos funcionales tales como hidrocarburos, aldehídos y cetonas son inhibidores *in vitro* de las monooxigenasas de citocromo P450 isoforma 2B1 (CYP2B1), por lo que pueden alterar la biotransformación de sustancias tóxicas (De-Oliveira *et al.*, 1999). Algunos modelos animales para cáncer han demostrado que varios monoterpenos poseen propiedades anticarcinogénicas actuando a nivel molecular y celular (Loza-Tavera, 1999). Por ejemplo el carvacrol (50 y 100 μ M) reduce en 25 y 35 %, respectivamente, el número de células de melanoma murino (B16F10), línea celular con un potencial metastásico elevado (He *et al.*, 1997).

El tectol y la lippsidoquinona presentes en *L. sidooides* mostraron inhibición *in vitro* contra células humanas de leucemia promielocítica (HL60) y leucemia linfoblástica aguda (CEM) (Costa *et al.*, 2001). En *L. dulcis*, (+)-animol inhibe células de melanoma murino (B16F10). También las células HeLa fueron sensibles a las flavonas como la eupafolina (Abe *et al.*, 2002). Se sabe que los patrones de sustitución en los anillos A y B de la flavona, tienen diferente influencia en la actividad contra diferentes células tumorales.

Otro estudio ha resaltado las cualidades nutraceuticas del género *Origanum* fue realizado por Kanazawa *et al.*, (1995); en el que informaron que dos flavonoides, (galangina y quercetina), inhibieron la mutagenicidad inducida por 3-amino-1-metil-5H-pirido[4, 3-b]indol (Trp-P-2, mutágeno que se ha encontrado como contaminante en la dieta) La cantidad de galangina y quercetina requerida para inhibir el 50% de la mutagenicidad de 20 ng del carcinógeno trp-P-2 fue de 0.12 y de 0.81 µg, respectivamente, mientras que los extractos de hexano, cloruro de metilo y acetato de etilo de orégano presentaron la mayor actividad inhibitoria (68-72%), utilizando el método de Ames *et al.* (1975) con algunas modificaciones, usando la mezcla S9 y la cepa TA98 de *Salmonella Thyphimurium*.

No obstante la importancia del uso de las plantas y sus componentes químicos como alternativa en la prevención y/o tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas, el potencial quimioprotector del orégano mexicano, no ha sido evaluado; dichos estudios pueden conducir al empleo de extractos obtenidos de esta planta en formulaciones farmacéuticas, suplementos alimenticios y alimentos procesados.

3.1.1 ENSAYOS BIOLÓGICOS PARA LA DETECCIÓN DE MUTAGENICIDAD Y ANTIMUTAGENICIDAD

3.1.1.1 Generalidades

Las pruebas de genotoxicidad a corto plazo son una herramienta que permiten investigar los mecanismos de acción de compuestos tóxicos, para detectar xenobióticos en el ambiente (agua, aire, suelo y alimentos) y para detectar compuestos genotóxicos en tejidos o fluidos fisiológicos de humanos y animales.

Una de las pruebas de genotoxicidad a corto plazo es la de Ames, utilizando como organismo detector a la *Salmonella typhimurium*. La versión más utilizada de la prueba de Ames en el tamizaje de sustancias con actividad mutagénica y/o antimutagénica es el método de incorporación en placa, que consiste en combinar la cepa de prueba (*S.typhimurium*), la fracción microsomal S9 o la mezcla de cofactores y el agente químico de prueba.

Una modificación a la prueba de Ames realizada por Kado *et al.*, (1983 y 1986), es el método de microsuspensión, este presenta ventajas sobre el de incorporación en placa ya que es más sensible (10 veces superior). La modificación consiste en incrementar la concentración de células bacterianas de 1×10^9 a 1×10^{10} células/ml, la adición de éstas a la fracción S9 evita una posible difusión o dilución del mutágeno o sus metabolitos. Además, un mayor número de bacterias incrementa el número de blancos disponibles para interactuar con los mutágenos o antimutágenos, factor que facilita la absorción de enzimas microsomales hacia la bacteria, así como el transporte de intermediarios reactivos hacia la célula.

Para la detección de premutágenos (sustancias que requieren de ser biotransformadas para ejercer su actividad mutagénica), se adiciona la fracción microsomal S9, la cual se prepara de tejido hepático proveniente de mamíferos inducidos a incrementar la expresión del complejo enzimático citocromo P450. Los microsomas hepáticos contienen el complejo enzimático Citocromo P450 (CYP450) con potencial para catalizar diferentes reacciones de biotransformación de xenobióticos, tales como hidroxilación, epoxidación, dealquilación, oxigenación y deshidrogenación. La fracción microsomal se obtiene de ratas macho Sprague-Dawley inducidas con una mezcla de bifenilos policlorados. Esta fracción contiene las isoformas CYP1 y CYP2B.

3.1.1.2 Ensayo De Ames

El ensayo con *Salmonella* fue validado primeramente en un estudio con 300 sustancias químicas, la mayoría de las cuales se sabía que eran carcinógenos.

Las cepas usadas para la prueba de mutagenicidad son auxótrofas a histidina. Cada cepa presenta una mutación diferente en el operón de histidina. La cepa TA98 contiene la mutación hisD3052 en el gen hisD que codifica para la histidinol deshidrogenasa y detecta mutaciones por corrimiento de bases. La cepa TA100 contiene la mutación hisG46 en el gen hisG que codifica para la primera enzima de la biosíntesis de histidina, la mutación es la sustitución de una prolina por una leucina, esto permite la detección de mutágenos que inducen mutación por sustitución de pares de bases (Maron y Ames, 1983). Además de esta mutación, las cepas contienen otra mutación que incrementa su habilidad para detectar mutágenos. Una mutación (*rfa*) causa la pérdida parcial de la barrera de lipopolisacáridos que cubren la superficie de la bacteria incrementando así la permeabilidad a moléculas grandes tales como el benzo(a)pireno que no penetra de manera normal la pared celular (Ames *et al.*, 1973). La otra mutación (*uvrB*) es una delección del gen que codifica para el sistema que repara ecsisiones del DNA, resultando en un incremento en la sensibilidad para detectar mutágenos (Ames, 1971, Ames *et al.*, 1973).

3.2 ACTIVIDAD ANTITOPISOMERASA

3.2.1 GENERALIDADES

Las topoisomerasas son enzimas que afectan el estado topológico (tal como acabado, enrollamiento, anudamiento, o enredado) de los ácidos nucleicos, generando rompimientos transitorios en la cadena de DNA. Para mantener la integridad del material genético durante este proceso, las topoisomerasas forman enlaces covalentes con el ADN, por lo tanto estas enzimas alteran solo la orientación espacial de la doble hélice. Existen dos clases de topoisomerasas, conocidas como tipo I y tipo II. Las topoisomerasas tipo I actúan produciendo rompimientos transitorios en una sola hebra. La enzima se mantiene unida covalentemente al extremo 5' de la hebra rota, formando un enlace fosfodiéster entre el fosfato 5' y un hidroxilo de tirosina. El extremo 3' queda libre para girar. El grupo hidroxilo del extremo 3' ataca luego al fosfato 5' activado unido covalentemente, cerrando la mella. Como resultado, estas enzimas pueden

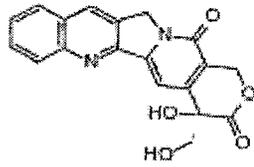
regular el enrollamiento de la doble hélice y separar las dos hebras antes del proceso de replicación. Por otro lado, una topoisomerasa tipo II cataliza la ruptura de las dos hebras del ADN, las inmoviliza y transporta a través de la abertura, finalmente sella ambas hebras (Osheroff, 1998; Mathews y van Holde, 1998; Berger, 1998).

Las topoisomerasas son esenciales para la sobrevivencia de las células y juegan un papel crítico en el metabolismo del ADN, incluyendo replicación, transcripción y entrecruzamiento. Además, se requieren para la segregación de los cromosomas y para mantener la estructura de los mismos (Osheroff, 1998; Mathews y van Holde, 1998).

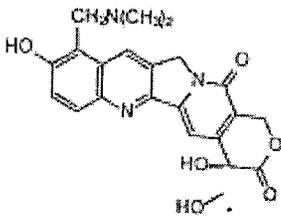
Se ha establecido que las topoisomerasas representan un blanco de ataque en la terapia contra el cáncer. Se conoce un gran número de agentes topoisomerasa dirigidos con uso clínico. Sin embargo, así como inducen la muerte celular, pueden inducir mutaciones. Tales eventos pueden tener consecuencias importantes en la quimioterapia contra el cáncer. Primeramente, las mutaciones pueden conducir a una resistencia a la droga, lo cual limita nuevas terapias. Las mutaciones celulares son transmitidas a futuras generaciones, y finalmente, dichas mutaciones pueden llevar al desarrollo de tumores secundarios a partir de células que originalmente no eran neoplásicas (Baguley y Ferguson, 1998).

Algunos compuestos son capaces de interferir con las funciones de las topoisomerasas por diversos mecanismos. Muchos agentes antitumorales estabilizan un intermediario covalente enzima-ADN formando un complejo ADN-fármaco-enzima, impidiendo la unión de los fragmentos de ADN, resultando en un incremento en los niveles de ADN dividido, en células vivas así como en sistemas *in vitro*. Estos fármacos actúan transformando a la topoisomerasa en una toxina letal para el ADN dañado, por lo que se les conoce como inhibidores no catalíticos (Figura 3). Otra clase de compuestos, los inhibidores de topoisomerasas actúan inhibiendo la actividad catalítica de la enzima (Figuras 4 y 5). El mecanismo molecular de la inhibición catalítica se distingue porque algunos inhibidores se unen al ADN impidiendo así el acceso de la topoisomerasa a la secuencia de ADN. Algunos inhibidores no catalíticos poseen una constante de afinidad muy alta hacia el ADN, lo que les confiere, a esta clase en particular, el estatus de

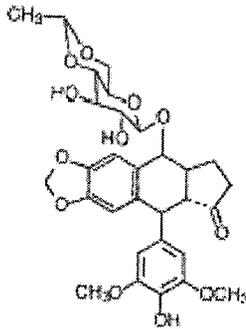
inhibidores. Consecuentemente, estos compuestos son capaces de inhibir a altas concentraciones, la actividad catalítica sin estimular el aumento de cadenas de ADN dividido, mientras que a bajas concentraciones, provocan el aumento del rompimiento de la molécula (Capranico y Binaschi, 1998).



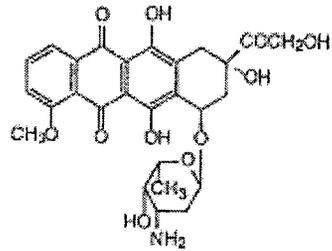
Camptotecina



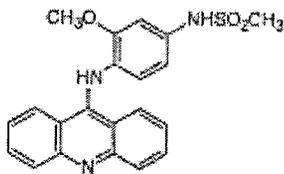
Topotecan



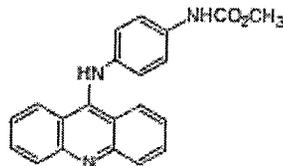
Etoposido



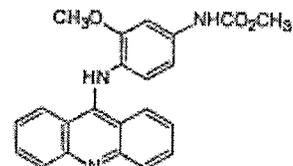
Doxorubicin



Amsacrina

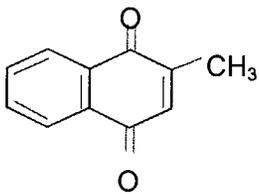


AMCA

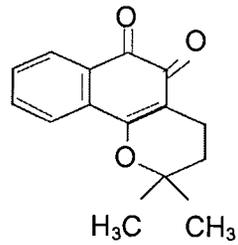


mAMCA

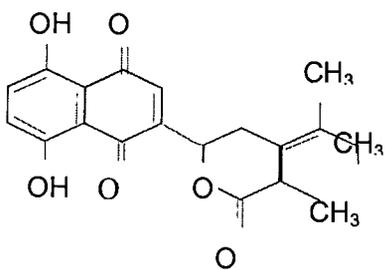
Figura 3. Estructuras de algunos inhibidores no catalíticos. Camptotecina y topotecan son Inhibidores no catalíticos topoisomerasa I; doxorubicin, etoposido y amsacrina son Inhibidores no catalíticos topoisomerasa II, AMCA [4'-(9-acridinylamino)sulfon anisidide] y m-AMCA [4'-(9-acridinylamino)methanesulfon-*m*-anisidide] son variantes de amsacrina (Baguley and Ferguson, 1998; Freudenreich y Kreuzer, 1994).



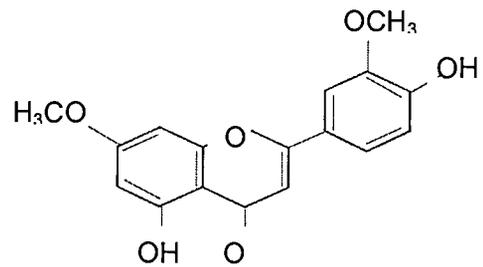
Menadiona



β -lapachona

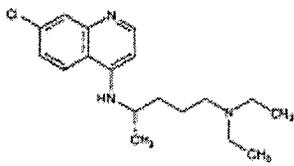


Acetilshikonina

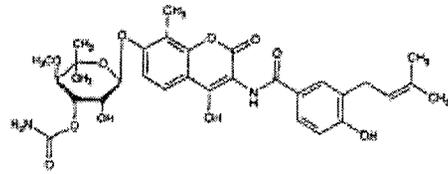


Velutina

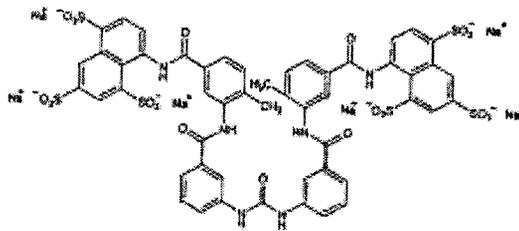
Figura 4. Estructuras de compuestos con acción inhibidora topoisomerasa I (Pommier *et al.*, 1998).



Cloroquina



Novobiocina



Suramina

Figura 5. Inhibidores topoisomerasa II (Andoh e Ishida 1998).

La sensibilidad a los inhibidores no catalíticos topoisomerasa I (TOP I), incrementa con la sobreexpresión del gen *top1*; contrariamente, la reducción en la actividad de este gen (*top1*) es la causa más común de resistencia a los inhibidores no catalíticos TOP I. Lo opuesto se espera para los inhibidores *top1*, los cuales deben ser más activos en células con baja actividad *top1*. A diferencia de los inhibidores topoisomerasa II (TOP II), la selectividad de los *top1* no es específica (Pommier *et al.*, 1998).

En el estudio *in vitro* durante el ciclo catalítico, el equilibrio separación/religación de ADN puede ser llevado dramáticamente hacia el estado de religación por alteración en la temperatura de reacción, incremento en la concentración de sales en la mezcla de reacción o por la quelación de cationes divalentes necesarios. La habilidad para controlar este equilibrio ha servido para conocer el mecanismo por el cual los fármacos anticáncer llevan a cabo su acción sobre la TOP II.

Como prerrequisito para la división del ácido nucleico y la subsecuente muerte celular, debe formarse un complejo topoisomerasa II-fármaco-ADN. Existen tres posibles rutas por las cuales puede formarse el complejo ternario (Figura 6): la ruta 1 involucra la unión del fármaco al ADN, seguido de la unión de la enzima al complejo. La ruta 2 consiste en la unión de la enzima al ADN, seguido por la unión del fármaco. En la ruta 3 se lleva a cabo la unión del fármaco a la enzima y posteriormente la unión del ADN al complejo fármaco-enzima. No obstante los agentes anticáncer que interaccionan con TOP II parecen ser capaces de unirse al ADN, se considera que la vía para la formación del complejo terciario no covalente es a través de interacciones con la enzima, lo que sugiere que los sitios de formación del complejo terciario están determinados por la especificidad de la enzima por esos sitios. Una vez que se ha formado el complejo, la habilidad para cambiar el equilibrio, de una interacción no covalente a un complejo covalente es determinado por la habilidad del fármaco para cambiar la estructura del ADN a una secuencia específica a la cual se unirá la enzima (Burden y Osheroff, 1998).

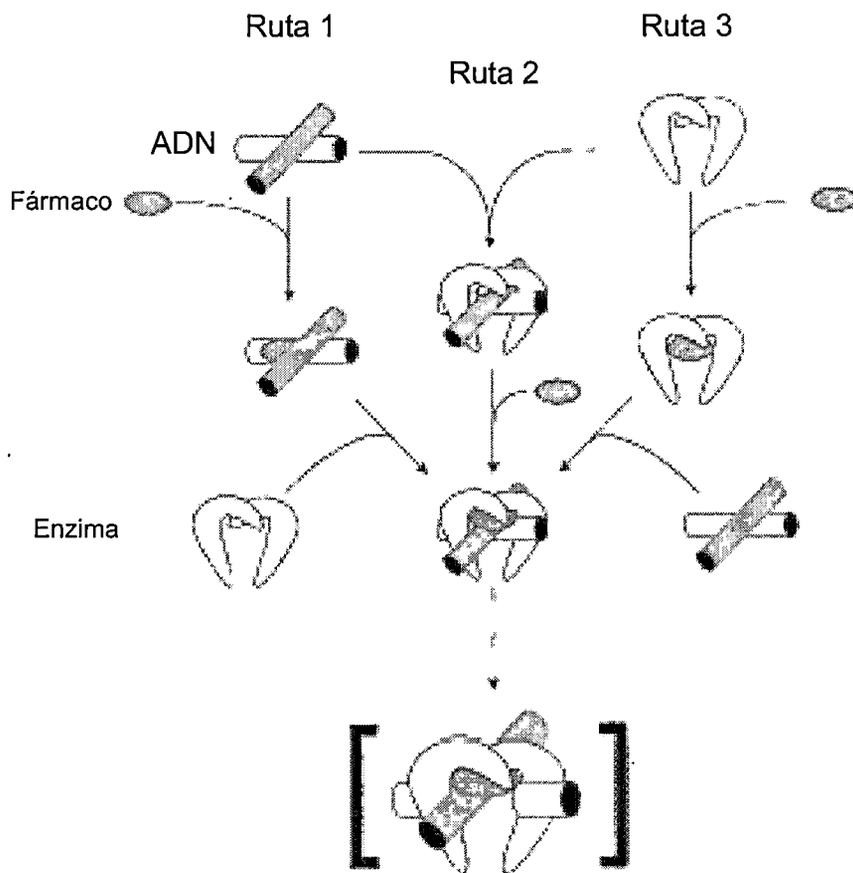


Figura 6. Posibles rutas seguidas en la formación del complejo topoisomerasa II-fármaco-ADN (Burden y Osheroff, 1998).

3.2.2 LAS LEVADURAS COMO MODELO PARA ESTUDIAR EL EFECTO DE DROGAS CON ACCIÓN SOBRE TOPOISOMERASAS

Se sabe que las levaduras, al igual que otros organismos eucariotas poseen topoisomerasas I y II, las cuales han mostrado un comportamiento enzimático similar a las topoisomerasas de otros eucariotas (Goto y Wang, 1985). Muchos aspectos de la biología de las topoisomerasas en organismos eucariotas han sido descubierto mediante el estudio de mutantes de levaduras, las cuales presentan deficiencia en una o más topoisomerasas, observándose que en levaduras de *Saccharomyce cerevisiae*, así como en *S. pombe*, las topoisomerasas son capaces de sustituirse una a la otra en muchas funciones.

La levadura *S. cerevisiae*, fácilmente manipulable genéticamente, ha sido útil en la elucidación de procesos biológicos complejos, tales como regulación de la proliferación celular, progresión del ciclo celular y respuesta celular al daño del ADN. El aspecto más notable de las levaduras como sistema genético es que se conoce la secuencia de su genoma (Reid, 1998).

Estudios en levaduras indican la existencia de tres topoisomerasas, dos enzimas del tipo I, codificadas por el gen *top1* y *top3*, y una enzima tipo II, codificada por el gen *top2*. Existe un nuevo homólogo de topoisomerasa en levaduras y otros eucariotas que está codificado por el gen *spo11* (Nitiss, 1998). Diversos análisis han demostrado que el gen *top1* no es esencial para la viabilidad de la célula de levadura, una posible explicación es que la TOP I puede ser sustituida por la TOP II, la cual es esencial para la sobrevivencia de la levadura (Goto y Wang, 1985; Thrash *et al.*, 1985).

Se han caracterizado dos subfamilias de las topoisomerasas tipo I. Estas no son homólogas y difieren en el tipo de aducto de ADN que forman. La subfamilia IA incluye topoisomerasas I y III de *E. coli*, top III eucarióticas (*top3*, aislada de levaduras y de células humanas) y girasas reversas; éstas forman una unión fosfotirosina covalente al extremo 5' de los productos del ADN durante la catálisis. Los miembros de la subfamilia IB, que incluyen TOP I eucariótica, TOP V y TOP I poxviral; reaccionan con el extremo 3' del ADN. El mecanismo de acoplamiento entre la ATPasa y la ruptura/transporte del ADN ha sido conocido mediante

estudios estructurales de dos enzimas tipo II, la DNA girasa de *E. coli* y topoisomerasa II de *S. cerevisiae* (Berger, 1998).

Las levaduras han sido un modelo útil en el estudio de inhibidores de topoisomerasas en mamíferos, hasta ahora no se han observado diferencias significativas a la sensibilidad a las drogas entre enzimas de levaduras y de mamíferos. La expresión de top1 en hongos, sugiere la posibilidad de desarrollar fármacos que podrían seleccionar las enzimas fúngicas blanco (Pommier *et al.*, 1998).

La mayoría de los fármacos que actúan sobre topoisomerasas, lo hacen convirtiendo la enzima en un agente que daña el ADN estabilizando el intermediario covalente enzima-ADN, conocido como complejo de división, en el cual se inhibe la reacción de religación de la topoisomerasa (Khan *et al.*, 2002).

Cepas mutantes de *S. cerevisiae* se han empleado para estudiar el efecto de una droga sobre las topoisomerasas. La cepa JN394, presenta mutaciones en los genes *ise2* y *rad52*, las cuales incrementan la sensibilidad de las células a las drogas. La ausencia de *ise2*, gen de la pared celular, facilita el paso de moléculas al interior de la célula. *Rad52* en *S. cerevisiae* es necesario para interrelacionar dos eventos de la profase meiotica, la sinapsis de los cromosomas y la recombinación, ambos requeridos para la apropiada segregación de los cromosomas en la primera división meiotica; durante el crecimiento vegetativo la función de *rad52* es requerida para reparar el ADN dañado. Estudios realizados en *S. cerevisiae* han demostrado que la mutación de *rad52* confiere hipersensibilidad a la camptotecina y a m-amsacrina, inhibidores no catalíticos topoisomerasa I y II respectivamente. Otro mutante empleado es la cepa JN362a, la cual presenta una sobreexpresión en la vía de reparación de ADN (gen *rad52*), Cuadro 4; por lo que los inhibidores no catalíticos camptotecina y m-amsacrina no afectan la sobrevivencia de la célula, (Khan *et al.*, 2002; Baker *et al.*, 1976; Alani *et al.*, 1989; Chen y Liu, 1994).

Cuadro 4. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* genéticamente modificadas.

Cepa	Descripción	Genotipo
JN394	Deficiente sistema de reparación de ADN	Mata α ura3-52 leu2 trp1 his7 ade1-2 ise2 rad52::LEU2
JN362a	Eficiente sistema de reparación de ADN	Mata α ura3-52 leu2 trp1 his7 ade1-2 ise2

(Heck y Earnshaw, 1986; Nitiss y Wang, 1988).

III. HIPÓTESIS

Los compuestos presentes en el aceite esencial y té de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) presentan mayor actividad antitopoisomerasa y antimutagénica que el orégano *Origanum vulgare* y *Origanum laevigatum* herrenhausen.

IV. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad biológica del orégano: *Lippia graveolens* Kunth, *Origanum vulgare* y *Origanum laevigatum* herrenhausen; así como caracterizar parcialmente el aceite esencial y el té de *L. graveolens*.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Comparar la concentración de fenoles totales en té de *Lippia graveolens* Kunth secado a la sombra y bajo sol.
2. Determinar y comparar la concentración de fenoles totales de las dos especies europeas de orégano (*Origanum vulgare* y *Origanum laevigatum* herrenhausen).
3. Caracterizar parcialmente el aceite esencial, así como los extractos etéreos de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) secado a la sombra y bajo sol.
4. Evaluar la actividad antimutagénica del aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) sobre la mutagenicidad inducida por 1-NP en *S. typhimurium* TA98.
5. Estudiar la actividad antitopoisomerasa del aceite esencial y del té de *Lippia graveolens* Kunth en las cepas JN 394 y JN 362a de *S. cerevisiae*.
6. Medir la actividad antitopoisomerasa del té de dos especies de orégano europeo (*Origanum vulgare* y *Origanum laevigatum* herrenhausen).

7. Comparar la actividad antitopoisomerasa del té de *Lippia graveolens* Kunth, *Origanum vulgare* y *Origanum laevigatum* herrenhausen.

V.- MATERIALES Y MÉTODOS

A. MATERIAL

1. Compuestos químicos.

Dimetilsulfóxido, 1-Nitropireno (1-NP), camptotecina, amsacrina, monoterpenos: carvacrol, gamma-terpineno, p-cimeno y timol; naringenina y pinocembrina fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Co., St, Louis, MO 63178 USA. Los reactivos químicos necesarios para el bioensayo de microsuspensión fueron adquiridos en J.T. Baker. El caldo y el agar nutritivo No. 2 se compraron en Oxoid LTD., Hants, England.

2. Material biológico

Orégano. Las hojas de *L. graveolens* fueron proporcionadas por la facultad de Biología de la Universidad Autónoma de Querétaro (Cand. Dr. Rosalía Ocampo) Aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) obtenido por arrastre de vapor, fue donado por el M. en C. Salvador Lecona Uribe de la facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Las plantas de orégano *O. vulgare* y *O. laevigatum* herrenhausen fueron cultivadas en el invernadero de la Universidad de Illinois, campus Urbana-Champaign.

La cepa de *Salmonella typhimurium* TA98 fue donada por el Dr. Bruce N. Ames de la Universidad de California, Campus Berkeley.

La fracción microsomal S9 proveniente de ratas macho cepa Sprague-Dawley tratadas con Aroclor 1254, se obtuvo de Molecular Toxicology, Inc. (Anápolis, MD).

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* JN394 Y JN362a fueron donadas por el Dr. John Nitiss del St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee.

B. MÉTODOS

1.0 Determinación de Polifenoles

1.1 Preparación de té

Las hojas frescas de orégano (*O. vulgare* y *O. laevigatum* herrenhausen) fueron secadas bajo sombra; las hojas frescas de *L. graveolens* fueron secadas en sombra y bajo luz solar. El material seco (1 y 2 gr) se adicionó a 100 mL de agua desionizada hirviendo, manteniéndose en ebullición por diez minutos. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente (25 °C) y se filtró con papel filtro de 0.45 m. El líquido obtenido se liofilizó y se almacenó a -20 °C protegido de la luz en contenedores sellados. La determinación de polifenoles se realizó con el té recién filtrado.

1.2 Método de Folin-Ciocalteu

1.2.1 Cuantificación

La cantidad de fenoles totales en el extracto fue determinada de acuerdo al método de Folin-Ciocalteu modificado (Nurmi *et al.*, 1996). 1 mL del extracto diluido (extracto-agua, 1:100 (v/v)) se colocó en un tubo de ensayo se adicionó y se mezcló 1 mL de reactivo de Folin Ciocalteu (1N), después de 3-5 minutos se adicionaron 2 mL de carbonato de sodio (Na₂CO₃) 20%. Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, se leyó la absorbancia a 730 nm. La cuantificación se realizó utilizando una curva estándar de epigalo catequin galato (EGCG), ácido gálico y (+) catequina. El contenido total de fenoles es expresado como equivalentes de EGCG, ácido gálico y (+) catequina en miligramos por mililitro (mg/mL) y miligramos por gramo de base seca (mg/g BS).

2.0 Caracterización parcial de componentes de aceite esencial de orégano

2.1 Cromatografía de gases/espectrometría de masas

El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, HP 5973 Mass selective detector, serial # US00024534. Utilizando dos columnas: Columna capilar HP5-MS (30m x 250 µm, grosor de película de 0.50

μm) y una columna capilar SPB-50 (30 m x 250 μm , grosor de película 0.25 μm). Se inyectó 1 μL de muestra, la cual se preparó con 100 mg del aceite esencial y 1 mL de una solución que contenía como estándares internos 0.0321 gr de decano y 0.0246 gr de t-amilfenol en 50 mL de éter, en el modo Split (relación de split 5.894:1). Se operó de 50 a 225 °C, como temperatura inicial y final. El tiempo de cada corrida fue de 83.33 min. El intervalo de espectro fue de 20 a 450 m/z. Los picos cromatográficos fueron identificados por sus tiempos de retención; los espectros de masas se compararon con los que se encuentran en la biblioteca NIST (National Institute of Standards and Technology).

3.0 Ensayos de mutagenicidad y antimutagenicidad

3.1 Curva dosis –respuesta de 1-Nitropireno

3.1.1 Propagación de la bacteria

Las bacterias (*S. Typhimurium* TA 98 y TA 100) se crecieron en caldo nutritivo Oxoid No. 2, hasta alcanzar una densidad de $1-2 \times 10^9$ (aproximadamente 12 h) Las células se concentraron por centrifugación (4500 rpm 4° C, 10 min) el paquete celular se resuspendió en una solución amortiguadora de fosfatos de sodio y potasio (PBS 0.15 M, pH 7.4) a una concentración de 1×10^{10} células/mL.

3.1.2 Preparación de la fracción S9

La mezcla de S9 (enzima más cofactores) se preparó de acuerdo al procedimiento descrito por Ames *et al.*, (1975). Se adicionaron los ingredientes en el orden siguiente: agua, solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.2 M, pH 7.4 (NaP buffer), solución de cloruro de magnesio 0.4 M y cloruro de potasio 1.65 M (MgCl_2/KCl), NADP 0.1 M, Glucosa-6-fosfato 1 M (G-6-P), y S9 (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

3.1.3 Preparación del agar de superficie y vaciado a cajas Petri

El agar de superficie se preparó siguiendo la técnica de Ames *et al.*, (1975). Se transfirieron 2 mL de agar a tubos de ensayo estériles y se mantuvieron a 45° C.

3.1.4 Preincubación (Kado et al, 1983 y 1986)

En tubos de ensayo estériles de 12 x 75 mm colocados en un baño de hielo a 4° C, se adicionaron los componentes en el siguiente orden: 0.1 mL de la mezcla S9, 0.1 mL de concentrado de bacterias en solución salina amortiguadora de sodio y fosfato (1×10^{10} células/mL de PBS) más 0.01 mL de DMSO para el control negativo ó, 0.01 mL de 1-nitropireno como control positivo en concentraciones 2.5 µg/tubo, 5 µg/tubo, 7.5 µg/tubo y 10 µg/tubo. Las mezclas se incubaron a 37° C con agitación por 90 min. A los 90 min de incubación, los tubos se colocaron en un baño de hielo a 4° C hasta el momento de agregar el agar de superficie.

A cada una de las mezclas con 90 min de incubación se les adicionaron 2 mL de agar de superficie, se agitaron en vortex y se vaciaron a cajas Petri con medio mínimo Vogel-Bonner. Se dejaron solidificar a temperatura ambiente, se incubaron a 37° C en la oscuridad por 48 h, al término de la incubación se contaron las colonias en un contador BioLogics AccuCount 1000.

3.2 Curva dosis-respuesta de aceite esencial

Con la finalidad de probar que el aceite esencial de orégano (*L. graveolens* Kunth), no fuera tóxico ni mutagénico, se realizó una curva dosis-respuesta, (1.25×10^{-5} , 2.5×10^{-5} , 5×10^{-5} y 1×10^{-4}) la preincubación se llevó a cabo como se indica en el punto 3.1.4 utilizando DMSO como control negativo.

3.3 Efecto antimutagénico del aceite esencial

Para la actividad antimutagénica, la preincubación se llevó a cabo como en el punto 3.1.4, teniendo como control negativo al DMSO, como control positivo (5 µg/tubo de 1-NP) y 0.005 mL de aceite esencial (1.25×10^{-5} , 2.5×10^{-5} , 5×10^{-5} y 1×10^{-4}) + 0.005 mL de 1-NP (5 µg/tubo).

4.0 Determinación de actividad antitopoisomerasa

En 5 ml de caldo nutritivo (papa dextrosa levadura, YPD por sus siglas en inglés) se sembró por agitación una colonia aislada de las cepas JN394 y JN362a de la levadura *S. cerevisiae*, se incubaron durante 18 horas, en baño de agua con

agitación a 30° C. Al término de la incubación, se determinó el número de células de levadura/mL; usando un hematocímetro (Cámara de Neubauer). La concentración requerida final para la prueba fue de 2×10^6 cel/mL en agar papa dextrosa levadura (YPDA), empleando para cada tratamiento 3 mL del cultivo diluido. El cultivo celular (2×10^6 cel/mL) se colocó en pequeños matraces (para cultivo de células), se adicionó dimetil sulfóxido (DMSO) como control negativo y el volumen de cada agente a probar, 15 y 50 μ L de aceite esencial de *L. graveolens* en diluciones 1:100 y 1:1000; 50 μ L de los compuestos fenólicos ρ -cimeno, gamma-terpineno, carvacrol, timol, naringenina y pinocembrina; y 50 μ L de las soluciones de los liofilizados de té preparado con 1 gr de hoja en 100 ml de agua desionizada; DMSO se empleó como vehículo (a una concentración no mayor de 2% v/v). Los matraces se colocaron en un baño de agua con agitación, a 30° C. Al siguiente día, a 100 μ L del medio de cultivo con células se le adicionó 900 μ L de agua estéril destilada. Se realizaron dos diluciones seriales más hasta 1×10^{-7} . Las tres últimas diluciones se sembraron (100 μ L de cada una) en cajas petri con medio YPDA. Se incubaron por tres días a 30° C y se contó el número de colonias.

5.0 Análisis estadístico

Para evaluar el potencial antimutagénico del aceite esencial y la actividad antitopoisomerasa del aceite, compuestos fenólicos puros y té de *Lippia graveolens*, se utilizó un diseño completamente al azar. El análisis estadístico se realizó por comparación de medias utilizando el estadístico de Tukey, mediante el programa SAS.

En el análisis por cromatografía de gases-masas se realizaron tres inyecciones del aceite esencial, como muestras independientes. Para el análisis de los compuestos volátiles, se hizo una extracción etérea por duplicado de cada muestra de *L. graveolens* (secado al sol y a la sombra), a su vez se llevaron a cabo dos inyecciones de cada extracción independiente.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.0 Concentración de polifenoles

En el Cuadro 5, se muestra el contenido de polifenoles totales en té de *Origanum vulgare*, *Origanum laevigatum* y *Lippia graveolens* en mg/mL. Los resultados se expresan como epigalo catequin galato (EGCG), ácido gálico y (+)- catequina, con sus respectivas curvas de calibración: $y = 0.0125x - 0.0758$, $r^2 = 0.9921$; $y = 0.0267x - 0.0966$, $r^2 = 0.9933$; $y = 0.0269x - 0.050$, $r^2 = 0.983$. Estos valores de r^2 indican un alto porcentaje de ajuste del modelo de regresión empleado en la obtención de las curvas de calibración.

El té preparado con 2 gr de *Origanum laevigatum* fue el que presentó mayor cantidad de polifenoles, 28.47 ± 1.32 , 14.11 ± 0.62 y 12.12 ± 0.77 mg/mL de EGCG, ácido gálico y (+) catequina, respectivamente; encontrándose una concentración tres veces mayor a la del té preparado con un gr de hoja, 9.23 ± 0.67 para EGCG, 5.10 ± 0.32 ácido gálico y 3.33 ± 0.31 (+)-catequina, respectivamente. Sin embargo esto no sucede en *L. graveolens* Kunth. Además tampoco existe diferencia significativa entre hojas secadas al sol y sombra. En *Origanum vulgare* los polifenoles cuantificados en el té 1 representan la mitad de los encontrados en el té 2.

Cabe mencionar que en todos los casos, el contenido de fenoles expresado como EGCG fue mayor que el de ácido gálico y (+) catequina. Resultados que sugieren que este compuesto o algunos otros que absorben a longitud de onda cercana a EGCG, como epicatequin (EC), o epigalocatequin (EGC) están presente en las tres plantas en una alta concentración. Cabrera *et al.*, (2003) informaron que en algunas variedades de té, la concentración de EGCG (103.5-1.4 mg/g de hoja) fue mayor que la de ácido gálico (6.7-0.04 mg/g de hoja).

Cuadro 5. Contenido de compuestos fenólicos en té de hojas de *Origanum laevigatum* herrenhausen, *Origanum vulgare* y *Lippia graveolens* Kunth secado en sombra y bajo sol, expresados como equivalentes de EGCG, ácido gálico y (+) catequina en mg/mL.

	EGCG	Ácido gálico	(+) Catequina
<i>O. laevigatum</i> 1 *	9.23 ± 0.67 ^c	5.10 ± 0.32 ^c	3.33 ± 0.31 ^c
<i>O. laevigatum</i> 2 **	28.47 ± 1.32 ^a	14.11 ± 0.62 ^a	12.12 ± 0.77 ^a
<i>O. vulgare</i> 1 *	7.64 ± 0.1 ^c	4.36 ± 0.04 ^c	2.59 ± 0.04 ^{cd}
<i>O. vulgare</i> 2 **	17.63 ± 3.76 ^b	9.03 ± 1.76 ^b	7.23 ± 1.75 ^b
<i>L. graveolens</i> sombra 1 *	2.82 ± 0.16 ^d	1.39 ± 0.07 ^d	1.21 ± 0.07 ^e
<i>L. graveolens</i> sombra 2 **	4.58 ± 0.42 ^d	2.22 ± 0.2 ^d	2.03 ± 0.19 ^{de}
<i>L. graveolens</i> sol 1 *	2.86 ± 0.07 ^d	1.29 ± 0.18 ^d	1.23 ± 0.03 ^e
<i>L. graveolens</i> sol 2 **	4.9 ± 0.09 ^d	2.37 ± 0.04 ^d	2.18 ± 0.04 ^{cde}

Los valores representan la media de dos experimentos independientes con tres repeticiones ± EE.

EGCG: Epigalo catequin galato.

* Té preparado con 1 gr de hoja seca en 100 ml de agua.

** Té preparado con 2 gr de hoja seca en 100 ml de agua.

Las diferentes letras indican diferencia significativa entre las medias por la prueba de Tukey, con una $\alpha=0.05$

El contenido de fenoles expresado como mg/g de base seca (mg/g BS), muestra diferencias con respecto al expresado como mg/mL, ya que la cantidad de hoja empleada para la preparación del té influye en la extracción de los compuestos (Cuadro 6).

En el té preparado con 1 gr de hoja/100 ml de agua de *Origanum laevigatum* y *Origanum vulgare* se encontró una concentración estadísticamente menor de fenoles comparado con el té hecho con el doble del peso de las hojas, sin embargo esta concentración no representa la mitad del valor obtenido para la preparación hecha con 2 gr /100 ml (Cuadro 6).

En *Lippia graveolens* no existe diferencia significativa entre las concentraciones de polifenoles encontradas en las dos diferentes preparaciones de té (1 gr y 2 gr), así como tampoco entre los procesos de secado de las hojas (sombra y sol). Concentraciones inferiores a las encontradas se han informado para 2 gr de *O. vulgare* y *O. x majoricum* en extracción con solución amortiguadora de fosfatos, 11.8 ± 0.6 y 11.65 ± 0.29 mg/g hoja fresca, respectivamente (Zheng y Wang, 2001). En otro tipo de hojas medicinales, y administradas como té; por ejemplo, en hojas de *Ardisia compressa*, la concentración fue de 16.79 ± 1.22 mg/g de hoja seca expresado como EGCG; mientras que en hojas de *Salvia officinalis*, *S. sclarea*, *S. glutinosa* y *Potentilla fruticosa*, 22.6 ± 0.9 , 24.0 ± 1.1 , 17.1 ± 0.6 y 37.9 ± 2.1 mg eq de ácido gálico/g de planta, respectivamente (González de Mejía y Ramírez-Mares, 2002; Miliauskas *et al*, 2004). El contenido de polifenoles en *Lippia graveolens* fue inferior al encontrado en los otros tipos de orégano, tanto en mg/ml como en mg/g de base seca.

Cuadro 6. Contenido de compuestos fenólicos en té de hojas de *Origanum laevigatum* herrenhausen, *Origanum vulgare* y *Lippia graveolens* Kunth secado en sombra y bajo sol, expresados como equivalentes de EGCG, ácido gálico y (+) catequina en mg/g BS.

	EGCG	Ácido gálico	(+) Catequina
<i>O. laevigatum</i> 1 *	646 ± 19 ^b	357 ± 9 ^b	233 ± 9 ^b
<i>O. laevigatum</i> 2 **	1115 ± 21 ^a	552 ± 10 ^d	475 ± 13 ^a
<i>O. vulgare</i> 1 *	538 ± 3 ^c	307 ± 1 ^c	183 ± 1 ^c
<i>O. vulgare</i> 2 **	675 ± 57 ^b	346 ± 27 ^{bc}	277 ± 27 ^b
<i>L. graveolens</i> sombra 1 *	223 ± 5 ^d	110 ± 2 ^d	96 ± 2 ^d
<i>L. graveolens</i> sombra 2 **	178 ± 7 ^d	87 ± 3 ^d	79 ± 3 ^d
<i>L. graveolens</i> sol 1 *	217 ± 2 ^d	108 ± 0.8 ^d	94 ± 0.8 ^d
<i>L. graveolens</i> sol 2 **	181 ± 1 ^d	88 ± 0.8 ^d	81 ± 0.8 ^d

Los valores representan la media de dos experimentos independientes con tres repeticiones ± EE.

EGCG: Epigalo catequin galato.

* Té preparado con 1 gr de hoja seca en 100 ml de agua.

** Té preparado con 2 gr de hoja seca en 100 ml de agua.

mg/g HS: mg/g hoja seca

Las diferentes letras indican diferencia significativa entre las medias por la prueba de Tukey, con una $\alpha=0.05$

2.0 Actividad antimutagénica del aceite esencial

2.1 Curva dosis-respuesta de 1-NP

En el Cuadro 7 se muestra la curva dosis-respuesta de 1-NP para la cepa de prueba TA98 de *S. typhimurium*, mediante el ensayo de microsuspensión. La concentración de 5 µg/tubo se eligió para los ensayos de microsuspensión, ya que fue 27.45 veces el control negativo.

Cuadro 7. Curva dosis-respuesta de 1-NP en la cepa TA98.

1-NP*	No. de colonias revertantes/tubo
0.0	59 ± 4 ^a
2.5	1759 ± 311 ^b
5	1620 ± 254 ^b
7.5	1504 ± 163 ^b
10	1483 ± 147 ^b

Cada valor representa la media de dos experimentos independientes con tres réplicas ± DE.

* 1-Nitropireno (1-NP) = (µg/tubo).

Las diferentes letras indican diferencia significativa entre las medias por la prueba de Tukey, con una $\alpha=0.05$.

2.2 No toxicidad y no mutagenicidad del aceite esencial

El aceite esencial en las diluciones probadas 1.25×10^{-5} , 2.5×10^{-5} , 5×10^{-5} y 1×10^{-4} , no presentó una actividad mutagénica sobre la cepa TA98, ya que el número de colonias revertantes/tubo fue similar al del control negativo DMSO (14 ± 4 colonias revertantes /tubo) como se observa en el Cuadro 8.

2.3 Actividad antimutagénica

El efecto antimutagénico del aceite esencial sobre la mutagenicidad inducida por 1-NP fue de 23% al 46% (Cuadro 8). Cabe mencionar que concentraciones mayores de aceite esencial indujeron toxicidad o inhibición del crecimiento de la bacteria (*S. typhimurium*) y esto se atribuye a la actividad antimicrobiana que poseen los compuestos presentes en extractos de *Origanum* y *Lippia* (Aligiannis *et al.*, 2001; Elgayyar *et al.*, 2001; Sivropoulou *et al.*, 1996; Bassole *et al.*, 2003; Cosentino *et al.*, 1999; Hernández *et al.*, 2000). Actividad antimutagénica de orégano, ha sido reportada anteriormente para extractos metanólicos, identificándose a la galangina y quercetina como las sustancias activas (Kanazawa *et al.*, 1995). Sin embargo, para *Lippia* hasta el momento no hay datos sobre el efecto del aceite esencial, por lo cual, los resultados obtenidos en este trabajo dan la pauta para continuar con su investigación.

Cuadro 8. Actividad antimutagénica de aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens Kunth*) secado a la sombra, en la cepa de prueba TA98, con activación metabólica.

	Número de colonias revertantes/tubo	Inhibición (%)
Control (-) DMSO	14 ± 4 ^c	-
1-NP	1071 ± 403 ^a	-
1.25 x 10 ⁻⁵	15 ± 4 ^c	-
2.5 x 10 ⁻⁵	13 ± 4 ^c	-
5 x 10 ⁻⁵	14 ± 4 ^c	-
1 x 10 ⁻⁴	13 ± 2 ^c	-
1-NP + 1.25 x 10 ⁻⁵	578 ± 180 ^b	46
1-NP + 2.5 x 10 ⁻⁵	603 ± 370 ^b	44
1-NP + 5 x 10 ⁻⁵	569 ± 231 ^b	47
1-NP + 1 x 10 ⁻⁴	820 ± 345 ^{ab}	23

Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes con tres repeticiones ± DE.
 Las diferentes letras indican diferencia significativa entre las medias por la prueba de Tukey, con una $\alpha=0.05$.

3.0 Actividad antitopoisomerasa del aceite esencial

La actividad antitopoisomerasa se evaluó utilizando las mutantes JN394 y JN362a de *S. cerevisiae*. Se empleó como control negativo el DMSO y como controles positivos la camptotecina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, fármaco antitopo1) y amsacrina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, fármaco antitopo2).

Para evaluar el potencial antitopoisomerasa del aceite esencial de *L. graveolens* al igual que en el ensayo de microsuspensión se realizaron diluciones, empleando como disolvente el DMSO. El efecto del aceite esencial se evaluó empleando 15 y 50 μL de la dilución 1:1000, obteniendo como diluciones finales en la prueba 5×10^{-6} y 1.67×10^{-5} , respectivamente.

En el Cuadro 9 se muestra la actividad antitopoisomerasa y se puede observar que no existe diferencia estadística entre los tres aceites, ni entre diluciones, con excepción del aceite tres (letra C) dilución 1.67×10^{-5} , en la cepa JN394. El aceite esencial de *L. graveolens* no presenta actividad antitopoisomerasa en las diluciones 5×10^{-6} y 1.67×10^{-5} , ya que no inhibió el crecimiento de la cepa JN394 respecto al control negativo. Al mismo tiempo, no presenta efecto antimicrobiano, lo cual se establece si el agente no produce inhibición en el crecimiento de JN362a con respecto al obtenido con DMSO (control negativo). En la dilución menor 1.67×10^{-4} (cuya dilución inicial es 1:100), se obtuvo muerte total de las levaduras en ambas cepas (datos no mostrados), hecho que se explica por la acción antifúngica de los aceites esenciales (Russo *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2001). Esto indica que en las concentraciones probadas y empleando las cepas mutantes de *S. cerevisiae*, el aceite esencial de *L. graveolens* no resulta atractivo como agente antitopoisomerasa, por lo que se sugiere el empleo de otros modelos de estudio.

Cuadro 9. Actividad antitopoisomerasa del aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth), en las diluciones 5×10^{-6} y 1.67×10^{-5} , sobre las cepas JN394 y JN362a de *S. cerevisiae*.

	JN362a		JN394	
	No. células	Inhibición (%)	No. células	Inhibición (%)
Control (-) DMSO	$3205 \times 10^5 \pm 995 \times 10^5$ ^a	---	$3725 \times 10^5 \pm 1375 \times 10^5$ ^b	---
Aceite esencial-A1	$5625 \times 10^5 \pm 75 \times 10^5$ ^a	NI	$2225 \times 10^5 \pm 175 \times 10^5$ ^b	40.26
Aceite esencial-A2	$5300 \times 10^5 \pm 700 \times 10^5$ ^a	NI	$3150 \times 10^5 \pm 350 \times 10^5$ ^b	15.43
Aceite esencial-B1	$5775 \times 10^5 \pm 275 \times 10^5$ ^a	NI	$3725 \times 10^5 \pm 1225 \times 10^5$ ^b	0.0
Aceite esencial-C1	$9659 \times 10^5 \pm 2700 \times 10^5$ ^a	NI	$3555 \times 10^5 \pm 1495 \times 10^5$ ^b	4.56
Aceite esencial-C2	$6575 \times 10^5 \pm 825 \times 10^5$ ^a	NI	$39250 \times 10^5 \pm 5900 \times 10^5$ ^a	NI

Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes con tres repeticiones \pm EE.

A1, A2, B1, C1, C2, Las letras indican el uso de tres diferentes extracciones independientes de aceite esencial, A, B y C. Los números 1 y 2, las diluciones 5×10^{-6} y 1.67×10^{-5} , respectivamente.

Las diferentes letras indican diferencia significativa entre las medias por la prueba de Tukey, con una $\alpha=0.05$.

NI= No inhibición

4.0 Actividad antitopoisomerasa de compuestos fenólicos puros

4.1 Actividad antitopoisomerasa de ρ -cimeno

De acuerdo a reportes previos sobre la composición de aceites esenciales de algunos tipos de orégano (www-ang.kfunigraz.ac.at/; Aligiannis *et al.*, 2001; Russo *et al.*, 1998) y a resultados preliminares por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS) del aceite esencial de *Lippia graveolens*, se encontraron monoterpenos como: ρ -cimeno, gamma-terpineno, carvacrol y timol. Por lo que la actividad antitopoisomerasa de estos compuestos del tipo monoterpenoide fue también evaluada.

Se llevó a cabo la estandarización de la técnica con diferentes concentraciones de los compuestos fenólicos puros. Las concentraciones de 30 μM y 60 μM se eligieron para ρ -cimeno, ya que a concentraciones mayores se observó efecto tóxico sobre las levaduras.

Los resultados para 30 μM se muestran en el Cuadro 10. En esta concentración, el ρ -cimeno presentó actividad antitopoisomerasa, observado en la disminución del crecimiento de la cepa JN394, cuyo número de células es significativamente menor con respecto al control negativo. Se comprueba que este decremento es debido a un efecto directo sobre las topoisomerasas y no sobre otro mecanismo antimicrobiano al no haber diferencia significativa entre el número de células de JN362a para DMSO y ρ -cimeno.

El Cuadro 11 muestra el efecto presentado por el ρ -cimeno en una concentración de 60. Estos resultados indican que en esta concentración, dicho monoterpeno, no presenta un efecto sobre la topoisomerasa. Al mismo tiempo, tampoco se observa una acción antimicrobiana sobre la levadura. Sin embargo, es importante mencionar que debido al error estandar en los resultados de la cepa JN394, es posible que a esta concentración el ρ -cimeno también ejerza actividad antitopoisomerasa. Resultados que otorgan a este compuesto características interesantes que deben ser más estudiadas para establecer su posible uso como agente quimioprotector.

4.2 Actividad antitopoisomerasa de gamma-terpineno

La evaluación de la actividad antitopoisomerasa del gamma-terpineno se llevó a cabo en concentraciones de 30 y 150 μM . En ninguno de los casos se mostró actividad contra las topoisomerasas, ya que en ambas concentraciones, el número de células de JN394 no mostró diferencia estadística con respecto al DMSO, cuadros 12 y 13. Los controles positivos camptotecina y amsacrina, presentaron inhibición normal. Resultados que sugieren que este monoterpeno no resulta atractivo para ser empleado con fines de tratamiento contra el cáncer, al menos en este bioensayo y bajo las condiciones probadas.

Cuadro 10. Actividad antitopoisomerasa de ρ -cimeno en una concentración 30 μ M sobre las cepas JN394 y JN362a de *S. cerevisiae*.

	JN362a		JN394	
	No. células	Inhibición (%)	No. células	Inhibición (%)
Control (-) DMSO	$8350 \times 10^5 \pm 1592 \times 10^5$ ^a	---	$7537.5 \times 10^5 \pm 901 \times 10^5$ ^a	---
Camptotecina	*	---	7620 ± 2954 ^c	99.99
Amsacrina	*	---	589550 ± 322241 ^c	99.92
ρ -cimeno	$10050 \times 10^5 \pm 2188 \times 10^5$ ^a	NI	$4125 \times 10^5 \pm 260 \times 10^5$ ^b	45.27

Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes con dos repeticiones \pm EE.

* Los controles (+) producen un número incontable de colonias en la cepa JN362a.

Las diferentes letras indican diferencia significativa entre las medias por la prueba de Tukey, con una $\alpha=0.05$.

NI= No inhibición

Cuadro 11. Actividad antitopoisomerasa de ρ -cimeno en una concentración 60 μ M sobre las cepas JN394 y JN362a de *S. cerevisiae*.

	JN362a		JN394	
	No. células	Inhibición (%)	No. células	Inhibición (%)
Control (-)	$7362.5 \times 10^5 \pm 2215 \times 10^5$ ^a	---	$4600 \times 10^5 \pm 1511 \times 10^5$ ^a	----
DMSO	*	---	9766 ± 1861 ^b	99.99
Camptotecina	*	---	83300 ± 13364 ^b	99.98
Amsacrina	*	---	$5163.75 \times 10^5 \pm 1166 \times 10^5$ ^a	NI
ρ -cimeno	$20912.5 \times 10^5 \pm 8524 \times 10^5$ ^a	NI		

Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes con dos repeticiones \pm EE.

* Los controles (+) producen un número incontable de colonias en la cepa JN362a.

Las diferentes letras indican diferencia significativa entre las medias por la prueba de Tukey, con una $\alpha=0.05$.

NI= No inhibición

Cuadro 12. Actividad antitopoisomerasa de gamma-terpineno en una concentración 30 μ M sobre las cepas JN394 y JN362a de *S. cerevisiae*.

	JN362a		JN394	
	No. células	Inhibición (%)	No. células	Inhibición (%)
Control (-)	$5600 \times 10^5 \pm 250 \times 10^5$ ^b	---	$8175 \times 10^5 \pm 1225 \times 10^5$ ^a	---
DMSO	*	---	2664 ± 364 ^a	99.99
Camptotecina	*	---	$11.17 \times 10^5 \pm 2.57 \times 10^5$ ^a	99.86
Amsacrina	*	---	$13300 \times 10^5 \pm 4950 \times 10^5$ ^a	NI
Gamma-terpineno	$17100 \times 10^5 \pm 1100 \times 10^5$ ^a	NI		

Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes con dos repeticiones \pm EE.

* Los controles (+) producen un número incontable de colonias en la cepa JN362a.

Las diferentes letras indican diferencia significativa entre las medias por la prueba de Tukey, con una $\alpha=0.05$.

NI= No inhibición

Cuadro 13. Actividad antitopoisomerasa de gamma-terpineno en una concentración 150 μ M sobre las cepas JN394 y JN362a de *S. cerevisiae*.

	JN362a		JN394	
	No. células	Inhibición (%)	No. células	Inhibición (%)
Control (-) DMSO	$8512.5 \times 10^5 \pm 2930 \times 10^5$ ^a	---	$12037.5 \times 10^5 \pm 5816 \times 10^5$ ^a	---
Camptotecina	*	---	12608 ± 3313 ^b	99.99
Amsacrina	*	---	63368 ± 24146 ^b	99.99
Gamma-terpineno	$9600 \times 10^5 \pm 2458 \times 10^5$ ^a	NI	$43525 \times 10^5 \pm 15920 \times 10^5$ ^a	NI

Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes con dos repeticiones \pm EE.

* Los controles (+) producen un número incontable de colonias en la cepa JN362a.

Las diferentes letras indican diferencia significativa entre las medias por la prueba de Tukey, con una $\alpha=0.05$.

NI= No inhibición

4.3 Actividad antitopoisomerasa de carvacrol

En el Cuadro 14 se muestra el efecto del carvacrol, en el cual se observa claramente que este fenol en la concentración de 150 μM , no presenta actividad antitopoisomerasa, ni antimicrobiana.

Mientras que para la concentración de 300 μM (Cuadro 15), el número de células de JN394 es menor y estadísticamente diferente al del DMSO. Dicha inhibición es comparable con la presentada por los controles positivos, camptotecina y amsacrina. Se descarta que la disminución en el crecimiento de JN394 se deba a un mecanismo antimicrobiano al no haber muerte en la cepa JN362a. Los resultados sugieren al carvacrol como un agente nutracéutico con posibles usos a nivel industrial (farmacia, alimentos, cosméticos, etc).

Cuadro 14. Actividad antitopoisomerasa de carvacrol en una concentración 150 μ M sobre las cepas JN394 y JN362a de *S. cerevisiae*.

	JN362a		JN394	
	No. células	Inhibición (%)	No. células	Inhibición (%)
Control (-) DMSO	$8512.5 \times 10^5 \pm 2930 \times 10^5$ ^b	---	$12037.5 \times 10^5 \pm 5816 \times 10^5$ ^a	---
Camptotecina	*	---	12608 ± 3313 ^b	99.99
Amsacrina	*	---	63368 ± 24146 ^b	99.99
Carvacrol	$133975 \times 10^5 \pm 5174 \times 10^5$ ^a	NI	$89937.5 \times 10^5 \pm 4797 \times 10^5$ ^a	NI

Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes con dos repeticiones \pm EE.

* Los controles (+) producen un número incontable de colonias en la cepa JN362a.

Las diferentes letras indican diferencia significativa entre las medias por la prueba de Tukey, con una $\alpha=0.05$.

NI= No inhibición

Cuadro 15. Actividad antitopoisomerasa de carvacrol en una concentración 300 μ M sobre las cepas JN394 y JN362a de *S. cerevisiae*.

	JN362a		JN394	
	No. células	Inhibición (%)	No. células	Inhibición (%)
Control (-) DMSO	$6337.5 \times 10^5 \pm 1924 \times 10^5$ ^a	---	$2662.5 \times 10^5 \pm 401 \times 10^5$ ^a	---
Camptotecina	*	---	35978 ± 17849 ^b	99.98
Amsacrina	*	---	68000 ± 21553 ^b	99.97
Carvacrol	$14425 \times 10^5 \pm 7704 \times 10^5$ ^a	NI	$750 \times 10^5 \pm 283 \times 10^5$ ^b	71.83

Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes con dos repeticiones \pm EE.

* Los controles (+) producen un número incontable de colonias en la cepa JN362a.

Las diferentes letras indican diferencia significativa entre las medias por la prueba de Tukey, con una $\alpha=0.05$.

NI= No inhibición

4.4 Actividad antitopoisomerasa de timol

En el Cuadro 16, se observa que el timol en la concentración de 500 μM , causó una disminución en el número de células de la cepa JN394, correspondiente al 96.98 %, sin embargo, este decremento también es producido sobre la cepa JN362a, en un 99%. Resultado que sugiere, que este compuesto presenta un fuerte efecto antimicrobiano a dicha concentración, sobre ambas cepas de *S. cerevisiae*, numerosos estudios han documentado el efecto antifúngico del timol presente en aceites esenciales (Aligiannis *et al.*, 2001; Cosentino *et al.*, 1999; Thompson 1989).

Por otro lado, la inhibición en el crecimiento de JN394, producida por el timol en concentración de 1000 μM , no es diferente significativamente al control negativo, lo cual indica que no presenta inhibición de topoisomerasas; al mismo tiempo, tampoco se presentó efecto antimicrobiano, ya que el número de células de JN362a no es diferente con respecto al DMSO (Cuadro 17). Aún cuando los resultados indican que una concentración 1000 μM de timol no actúa como antimicrobiano, a diferencia de 500 μM , debe ser considerado que el error estándar del DMSO es alto en comparación con el de timol en la cepa JN362a, por lo que se sugiere que si existe una disminución en el número de levaduras y por lo tanto actividad antimicrobiana en dicha concentración.

Cuadro 16. Actividad antitopoisomerasa de timol en una concentración 500 μ M sobre las cepas JN394 y JN362a de *S. cerevisiae*.

	JN362a		JN394	
	No. células	Inhibición (%)	No. células	Inhibición (%)
Control (-)	$5600 \times 10^5 \pm 245 \times 10^5$ ^a	---	$8175 \times 10^5 \pm 1225 \times 10^5$ ^a	---
DMSO	*	---	2664 ± 364 ^b	99.99
Camptotecina	*	---	$11.17 \times 10^5 \pm 2.6 \times 10^5$ ^b	99.86
Amsacrina	*	---	$246.65 \times 10^5 \pm 133.35 \times 10^5$ ^b	96.98
Timol	$51.67 \times 10^5 \pm 21.67 \times 10^5$ ^b	99.07		

Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes con dos repeticiones \pm EE.

* Los controles (+) producen un número incontable de colonias en la cepa JN362a.

Las diferentes letras indican diferencia significativa entre las medias por la prueba de Tukey, con una $\alpha=0.05$.

Cuadro 17. Actividad antitopoisomerasa de timol en una concentración 1000 μ M sobre las cepas JN394 y JN362a de *S. cerevisiae*.

	JN362a		JN394	
	No. células	Inhibición (%)	No. células	Inhibición (%)
Control (-) DMSO	$9050 \times 10^5 \pm 2450 \times 10^5$ ^a	---	$3025 \times 10^5 \pm 381 \times 10^5$ ^a	---
Camptotecina	*	---	65000 ± 15000 ^a	99.97
Amsacrina	*	---	31500 ± 3500 ^a	99.98
Timol	$5875 \times 10^5 \pm 75 \times 10^5$ ^a	35.08	$4475 \times 10^5 \pm 1775 \times 10^5$ ^a	NI

Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes con dos repeticiones \pm EE.

* Los controles (+) producen un número incontable de colonias en la cepa JN362a.

Las diferentes letras indican diferencia significativa entre las medias por la prueba de Tukey, con una $\alpha=0.05$.

NI= No inhibición

4.5 Actividad antitopoisomerasa de flavonoides

Al igual que los monoterpenos están presentes en los aceites esenciales de especias y plantas aromáticas; los flavonoides, pueden encontrarse en extractos acuosos u orgánicos y en el té de hierbas. Algunos flavonoides reportados previamente en *Lippia graveolens* son naringenina y pinocembrina (Pascual *et al.*, 2001).

4.5.1 Actividad antitopoisomerasa de naringenina

El efecto antitopoisomerasa de la naringenina se evaluó a una concentración de 500 μM , en la cual no presentó inhibición sobre la enzima, ya que no disminuyó el número de células de la cepa JN394, contrariamente, incrementó el crecimiento de la levadura y no presentó acción antimicrobiana (Cuadro 18). No existen reportes sobre la acción de naringenina en topoisomerasas, pero se ha estudiado su efecto en la proliferación de células de carcinoma mamario humano, en el cual se observó una débil actividad antiproliferativa ($\text{IC}_{50} = 66.1 \mu\text{M}$), de la misma forma se ha determinado que posee una actividad prooxidante, la cual puede estar involucrada con la actividad mutagénica y carcinogénica (Heo *et al.*, 2001)

Cuadro 18. Actividad antitopoisomerasa de naringenina en una concentración 500 μ M sobre las cepas JN394 y JN362a de *S. cerevisiae*.

	JN362a		JN394	
	No. células	Inhibición (%)	No. células	Inhibición (%)
Control (-) DMSO	$90050 \times 10^5 \pm 46756 \times 10^5$ ^a	---	$15575 \times 10^5 \pm 5107 \times 10^5$ ^b	----
Camptotecina	*	---	$1.8 \times 10^5 \pm 96736$ ^b	99.98
Amsacrina	*	---	92300 ± 17761 ^b	99.99
Naringenina	$33525 \times 10^5 \pm 4194 \times 10^5$ ^a	NI	$51875 \times 10^5 \pm 14851 \times 10^5$ ^a	NI

Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes con dos repeticiones \pm EE.

* Los controles (+) producen un número incontable de colonias en la cepa JN362a.

Las diferentes letras indican diferencia significativa entre las medias por la prueba de Tukey, con una $\alpha=0.05$.

NI= No inhibición

4.5.2 Actividad antitopoisomerasa de pinocembrina

Pinocembrina, en la concentración probada de 75 μM , no exhibió efecto antitopoisomerasa ni antimicrobiano (Cuadro 19). De acuerdo a este resultado se sugiere que pinocembrina debe ser evaluada empleando otras concentraciones y modelos de estudio ya que se ha reportado que esta flavanona es un potencial inductor de enzimas de fase II, evaluado en una concentración de 110 μM ; por lo que es posible exhiba otras propiedades quimioprotectoras. Además se considera a la pinocembrina uno de los agentes responsables de la actividad antioxidante de mieles extraídas de plantas (Fahey y Stephenson, 2002).

5.0 Actividad antitopoisomerasa de compuestos presentes en té de hojas de *Origanum vulgare*, *Origanum laevigatum* y *Lippia graveolens* Kunth

La evaluación de la actividad antitopoisomerasa de los compuestos presentes en el té de hojas de *Origanum vulgare*, *Origanum laevigatum* y *Lippia graveolens* secado en sombra y sol, se llevó a cabo con 10 y 5 mg de té liofilizado, en todos los casos.

Los compuestos de *O. vulgare* y *O. laevigatum*, no causaron inhibición de topoisomerasas en los niveles probados. *O. vulgare*-10 mg, contrariamente, incrementó el número de células de JN394, esto fue estadísticamente significativo respecto al control negativo, lo cual sugiere que las concentraciones de polifenoles presentes en *O. vulgare* (5096 μg equivalentes de EGCG, 2904.66 μg eq. de ácido gálico y 1728 μg eq. de (+) catequina) que se encuentran en 1 ml de té preparado con 1 gr de hoja en 100 mL, promueven el desarrollo de las células mutantes de *S.cerevisiae*, cepa JN394. Este efecto no es el deseado, pues se espera que haya inhibición en esta cepa para considerar a la sustancia probada como posible agente quimioprotector, con la condición de que el número de células de JN362a sea mayor o igual al obtenido con DMSO, de lo contrario la inhibición observada en JN394 se atribuye a actividad antimicrobiana y no actividad antitopoisomerasa.

El resto de los tratamientos no muestra diferencia con el control (Cuadro 20). Por otro lado, en el té proveniente de *Lippia graveolens* si hay una disminución significativa en el crecimiento de la cepa JN394, este efecto se puede atribuir a su acción sobre las enzimas topoisomerasas y no a muerte por acción antimicrobiana, ya que no hay afectación en el crecimiento de JN362a (Cuadro 21). No se encuentra informado en la literatura el efecto del té de orégano sobre las topoisomerasas, pero existe suficiente evidencia de que compuestos como (-)-epigallocatequin-3-galato, presentes en té verde inhibe la actividad de topoisomerasa I, pero no de topoisomerasa II en líneas celulares humanas de cáncer de colon (Berger *et al.*, 2001). Lo anterior sugiere que dicho compuesto no se encuentra presente en el té de *Origanum*, o que la concentración no es suficiente para ejercer el efecto deseado, en *Lippia graveolens* el efecto antitopoisomerasa observado puede ser atribuido a este compuesto, de estar presente en esta planta, o puede tratarse de uno o más compuestos diferentes. En el caso específico del té preparado con hojas de *Lippia* secado al sol, empleando 5 mg del liofilizado, no se observó efecto inhibitorio sobre JN394 (datos no mostrados). El comportamiento anterior puede deberse a que en las hojas secadas al sol algunos compuestos sufrieron cambios, a diferencia del secado a la sombra, esto sugiere que para el empleo de té de *L. graveolens* como agente quimioprotector resulta más efectivo si las hojas fueron secadas en sombra.

Cuadro 19. Actividad antitopoisomerasa de pinocembrina en una concentración 75 μ M sobre las cepas JN394 y JN362a de *S. cerevisiae*.

	JN362a		JN394	
	No. células	Inhibición (%)	No. células	Inhibición (%)
Control (-) DMSO	$8512.5 \times 10^5 \pm 2930 \times 10^5$ ^a	---	$12037.5 \times 10^5 \pm 5816 \times 10^5$ ^a	---
Camptotecina	*	---	12608 ± 3313 ^b	99.99
Amsacrina	*	---	63368 ± 24146 ^b	99.99
Pinocembrina	$40950 \times 10^5 \pm 21715 \times 10^5$ ^b	NI	$15137.5 \times 10^5 \pm 6415 \times 10^5$ ^a	NI

Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes con dos repeticiones \pm EE.

* Los controles (+) producen un número incontable de colonias en la cepa JN362a.

Las diferentes letras indican diferencia significativa entre las medias por la prueba de Tukey, con una $\alpha=0.05$.

NI= No inhibición

Cuadro 20. Actividad anti-topoisomerasa del té preparado con hojas de *Origanum vulgare* y *Origanum laevigatum* herrenhausen sobre las cepas JN394 y JN362a de *S. cerevisiae*.

	JN362a		JN394	
	No. células	Inhibición (%)	No. células	Inhibición (%)
Control (-)	6675 x 10 ⁵ ± 375 x 10 ⁵ bc	---	2975 x 10 ⁵ ± 1125 x 10 ⁵ b	---
DMSO	*	---	7485 ± 2155 b	99.99
Camptotecina	*	---	42350 ± 12650 b	99.98
Amsacrina	*	---		
O. vul- 5 mg***	14900 x 10 ⁵ ± 100 x 10 ⁵ a	NI	1075 x 10 ⁵ ± 175 x 10 ⁵ b	63.86
O. vul-10 mg**	12800 x 10 ⁵ ± 2600 x 10 ⁵ ab	NI	53025 x 10 ⁵ ± 725 x 10 ⁵ a	NI
O. lae- 5 mg***	4250 x 10 ⁵ ± 1050 x 10 ⁵ c	36.32	2025 x 10 ⁵ ± 825 x 10 ⁵ b	31.93
O. lae- 10 mg**	14900 x 10 ⁵ ± 750 x 10 ⁵ a	NI	1151.5 x 10 ⁵ ± 8.5 x 10 ⁵ b	61.29

Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes con dos repeticiones ± EE.

* Los controles (+) producen un número incontable de colonias en la cepa JN362a.

*** Se emplearon 5 mg de liofilizado en 100 µl de DMSO.

** Se emplearon 10 mg de liofilizado en 100 µl de DMSO.

Las diferentes letras indican diferencia significativa entre las medias por la prueba de Tukey, con una α=0.05.

NI= No inhibición

Cuadro 21. Actividad antitopoisomerasa del té preparado con hojas de *Lippia graveolens*, secadas en sol y sombra, sobre las cepas JN394 y JN362a de *S. cerevisiae*.

	JN362a		JN394	
	No. células	Inhibición (%)	No. células	Inhibición (%)
Control (-) DMSO	28287.5 x 10 ⁵ ± 14009 x 10 ⁵ ^a	---	20825 x 10 ⁵ ± 6133 x 10 ⁵ ^a	----
Camptotecina	*	---	9.54 x 10 ⁵ ± 5.56 x 10 ⁵ ^b	99.95
Amsacrina	*	---	9.30 x 10 ⁵ ± 3.82 x 10 ⁵ ^b	99.95
<i>Lippia</i> sombra 5 ^{***}	71250 x 10 ⁵ ± 30352 x 10 ⁵ ^a	NI	4987.5x 10 ⁵ ± 1670 x 10 ⁵ ^b	76.05
<i>Lippia</i> sombra 10 ^{**}	79625 x 10 ⁵ ± 18671 x 10 ⁵ ^a	NI	2896.68x 10 ⁵ ± 627 x 10 ⁵ ^b	86.09
<i>Lippia</i> sol 10 ^{**}	73075 x 10 ⁵ ± 18946 x 10 ⁵ ^a	NI	7375 x 10 ⁵ ± 3067 x 10 ⁵ ^b	64.58

Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes con dos repeticiones ± EE.

* Los controles (+) producen un número incontable de colonias en la cepa JN362a.

*** Se emplearon 5 mg de liofilizado en 100 µl de DMSO.

** Se emplearon 10 mg de liofilizado en 100 µl de DMSO.

Las diferentes letras indican diferencia significativa entre las medias por la prueba de Tukey, con una α=0.05.

NI= No inhibición

Recapitulando, la actividad antitopoisomerasa del té de *L. graveolens* proveniente de hojas secadas a la sombra (10 y 5 mg) y de hojas secadas al sol (10mg), así como de los monoterpenos puros, p-cimeno (30 μ M) y carvacrol (300 μ M), como porcentaje de inhibición se presentan en la Figura 7. Aún cuando el carvacrol es el monoterpeno que presenta mayor inhibición de la actividad topoisomerasa (71.83%), la potencia de p-cimeno es mayor, pues la inhibición ejercida por él representa el 63.02% de la correspondiente a carvacrol a una concentración 10 veces menor que éste.

Por otro lado, los porcentajes de inhibición del té de hojas de *Lippia* secadas a la sombra fueron de 86.09% y 76.05%, para 10 y 5 mg, respectivamente. Mientras que para el té de hojas secadas al sol (10 mg), fue de 64.58%. Esto sugiere que la inhibición de las topoisomerasas producida por los compuestos activos presentes en el té de *Lippia graveolens*, es dependiente de la concentración.

6.0 Caracterización parcial de *Lippia graveolens* Kunth

La caracterización parcial de *Lippia graveolens* Kunth, se realizó por Cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS), sobre el aceite esencial extraído por destilación con arrastre de vapor, así como en extractos etéreos obtenidos mediante extracción simultánea agua-éter de hojas sometidas a dos procesos de secado diferentes, bajo sol y en sombra.

Los componentes mayoritarios identificados en el aceite esencial y sus porcentajes en la mezcla se muestran en el Cuadro 22. Los compuestos mayoritarios son p-cimeno, γ -terpineno, timol y carvacrol, en un 10.35%, 2.82%, 66.12% y 1.9%, respectivamente.

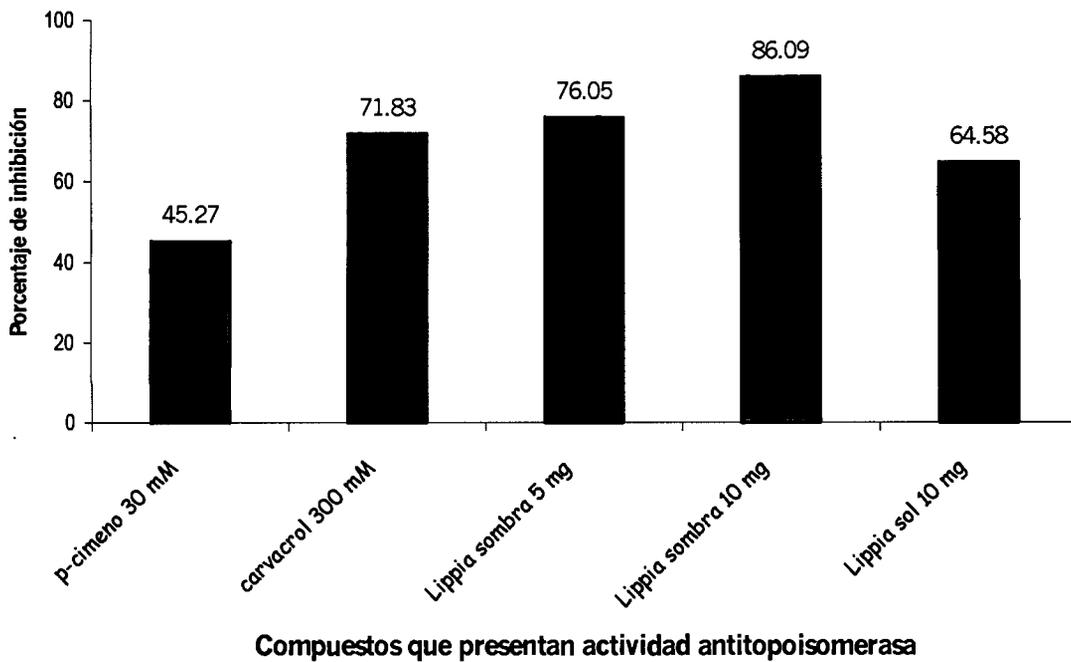


Figura 7. Porcentaje de inhibición de monoterpenos y compuestos presentes en el té de *Lippia graveolens*.

La presencia de estos fenoles como principales en el aceite esencial concuerdan con lo reportado para *O. vulgare* spp. *hirtum*, *O. scabrum*, *O. microphyllum* y *O. glandulosum*, aunque la proporción de cada uno dentro de la mezcla varía en cada caso, encontrándose en *O. scabrum* y *O. glandulosum* al carvacol como monoterpeno mayoritario en un intervalo de 18.3% a 74.86%; a diferencia de *O. microphyllum* en el cual este compuesto no fue detectado (Russo *et al*, 1998; Aligiannis *et al*, 2001; Ruberto *et al*, 2002). En otros casos, timol y carvacol no se encontraron en el aceite esencial de *O. vulgare*, pero si se detectaron otros compuestos como sabineno, β -cariofileno y germacreno en 6.4-14.2%, 10.8-15.4% y 10-16.9%, respectivamente (Mockute *et al*, 2001).

En la Figura 8 se muestra el espectro GC/MS del aceite esencial de *L. graveolens* y se puede observar que el compuesto mayoritario fue el timol o 5-metil-2-(1-metiletil)fenol, cuya concentración constituye más del 50% de la mezcla. Siendo este porcentaje tan elevado, se puede explicar el fuerte efecto antimicrobiano mostrado por el aceite sobre *Salmonella typhimurium*, y *S. cerevisiae*, lo cual impidió determinar el potencial antimutagénico del aceite esencial y la actividad antitopoisomerasa en concentraciones mayores a las estudiadas, pues además de que se conocen las cualidades germicidas que este compuesto fenólico posee, en el análisis del estándar puro (timol) sobre las cepas de la levadura, también se observó inhibición en su crecimiento por este mecanismo.

Los resultados obtenidos para *L. graveolens* concuerdan con lo reportado por Pascual *et al.*, (2001) para esta misma planta, difiriendo con lo encontrado en aceite esencial de *Lippia multiflora*, ya que en esta solo se detectó p-cimeno en un 0.2% y otros compuestos terpenoides como linalol (20.2%), b-farneseno (10.5%) y(z)-nerolidol (45%) (Valentín *et al.*, 1995).

Las discrepancias entre la composición de los aceites esenciales de especias de *origanum* ha sido reportado para muestras de la misma especie, por lo que la variación en el porcentaje y tipo de compuesto encontrados en *L. graveolens*, se debe, además a la inherente diferencia de género y especie, a factores ambientales y al periodo de recolección.

El análisis por GC/MS de los extractos etéreos (Figuras 9 y 10), demuestra la presencia de algunos compuestos no identificados en el aceite esencial, así como diferencia entre la proporción de algunos otros dentro de los extractos.

Cabe destacar el eucaliptol o 1,8-cineol, el cual se encontró en un 1.39% en el aceite, y en los extractos etéreos en un 12.28% y 10.53% en hojas secadas a la sombra y al sol respectivamente.

La diferencia observada entre los dos procesos de secado sobre la composición de los extractos, se encuentra en la proporción de timol (4.67 ± 0.87 secado al sol y de 10.18 ± 3.17 secado a la sombra), el cual representa un $54.13 \% \pm 32.29$; carvacrol (0.22 ± 0.02 secado al sol y 0.49 ± 0.23 secado a la sombra) con una variación correspondiente al $55.10 \% \pm 47.12$; beta-mirceno (4.49 ± 0.24 secado al sol y 2.46 ± 1.16 secado a la sombra) con variación de $-82.52 \% \pm 48.15$; (+)-4-careno (3.25 ± 0.09 secado al sol y 2.13 ± 0.39 secado a la sombra) cuyo cambio representa un $-52.58 \% \pm 18.79$; la proporción en el extracto obtenido con hojas secadas al sol de timol y carvacrol, respecto al contenido presente en las hojas secadas en sombra indica que son compuestos fácilmente degradables por el efecto del calor, por otro lado, el beta-mirceno y (+)-4-careno exhiben el efecto contrario, su proporción en el extracto aumenta cuando las hojas son secadas bajo el sol. Otro compuesto que estableció una diferencia en los procesos de secado fue el decahidro-2-naftalen metanol, el cual no se encontró en la preparación de *Lippia* secada a la sombra (Cuadro 23). Estos compuestos han sido reportados en aceites esenciales, ya que se trata de sustancias volátiles fácilmente extraíbles por arraste de vapor (Russo *et al.*, 1998; Aligiannis *et al.*, 2001). Sin embargo, la influencia del proceso de secado de las hojas, en la composición de los extractos no se encuentra documentada.

Cuadro 22. Principales compuestos del aceite esencial de *Lippia graveolens*.

Componentes	Porcentaje (%)
Timol	66.12 ± 7.69
p-cimeno	10.35 ± 2.22
gamma-terpineno	2.82 ± 0.79
beta-mirceno	2.38 ± 0.93
Carvacrol	1.9 ± 0.19
Cariofileno	1.47 ± 0.22
Eucaliptol	1.39 ± 0.29
Metil-timetiléter	1.26 ± 0.26
Cariofilen-óxido	1.048 ± 0.08
alfa-cariofileno	0.97 ± 0.12
(+)-4-careno	0.82 ± 0.49

Los resultados representan la media de dos experimentos independientes con tres réplicas ± DS.

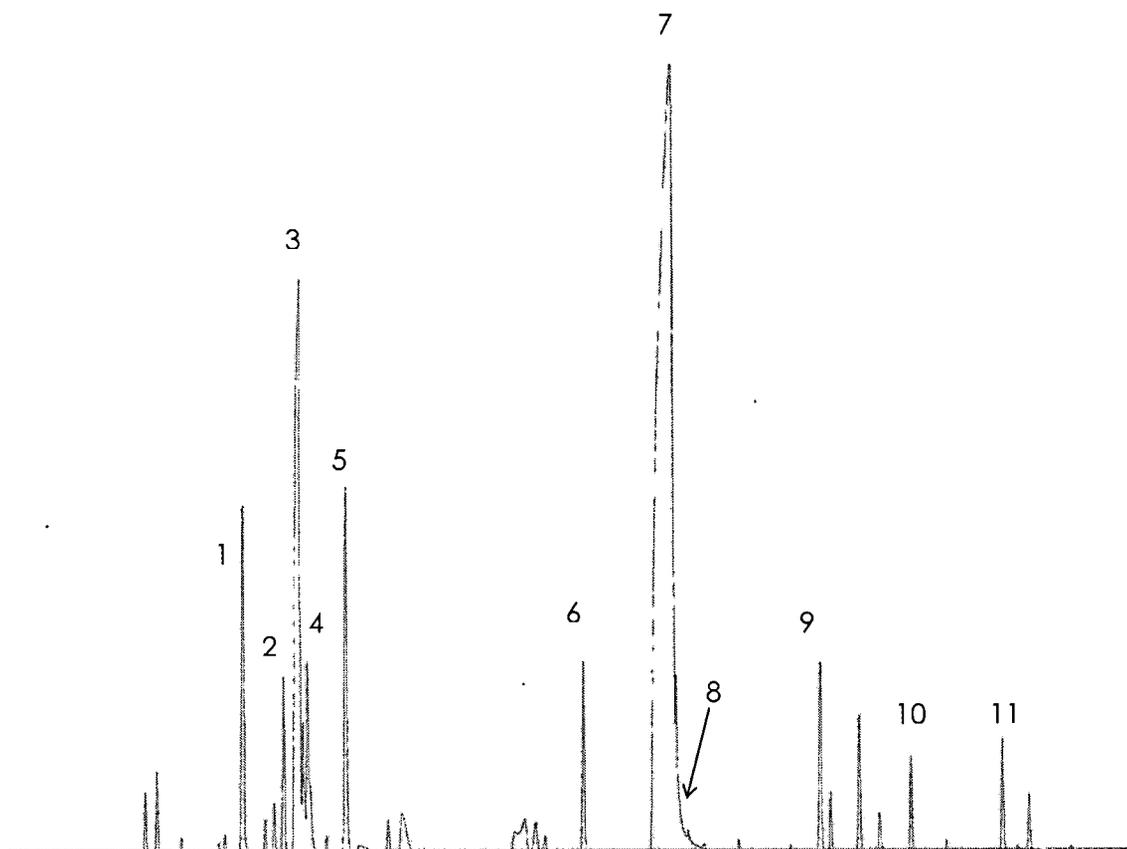


Figura 8. Espectro GC/MS de aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth).

1. beta-mirceno
2. (+)-4-careno
3. ρ -cimeno (1-metil-4-(metietil) benceno)
4. Eucaliptol (1,8-cineol)
5. gamma-terpineno
6. Metil timetiléter
7. Timol (5-metil-2-(1-metiletil) fenol)
8. Carvacrol (2-metil-5-(1-metiletil) fenol)
9. Cariofileno
10. alfa-cariofileno
11. cariofileno óxido

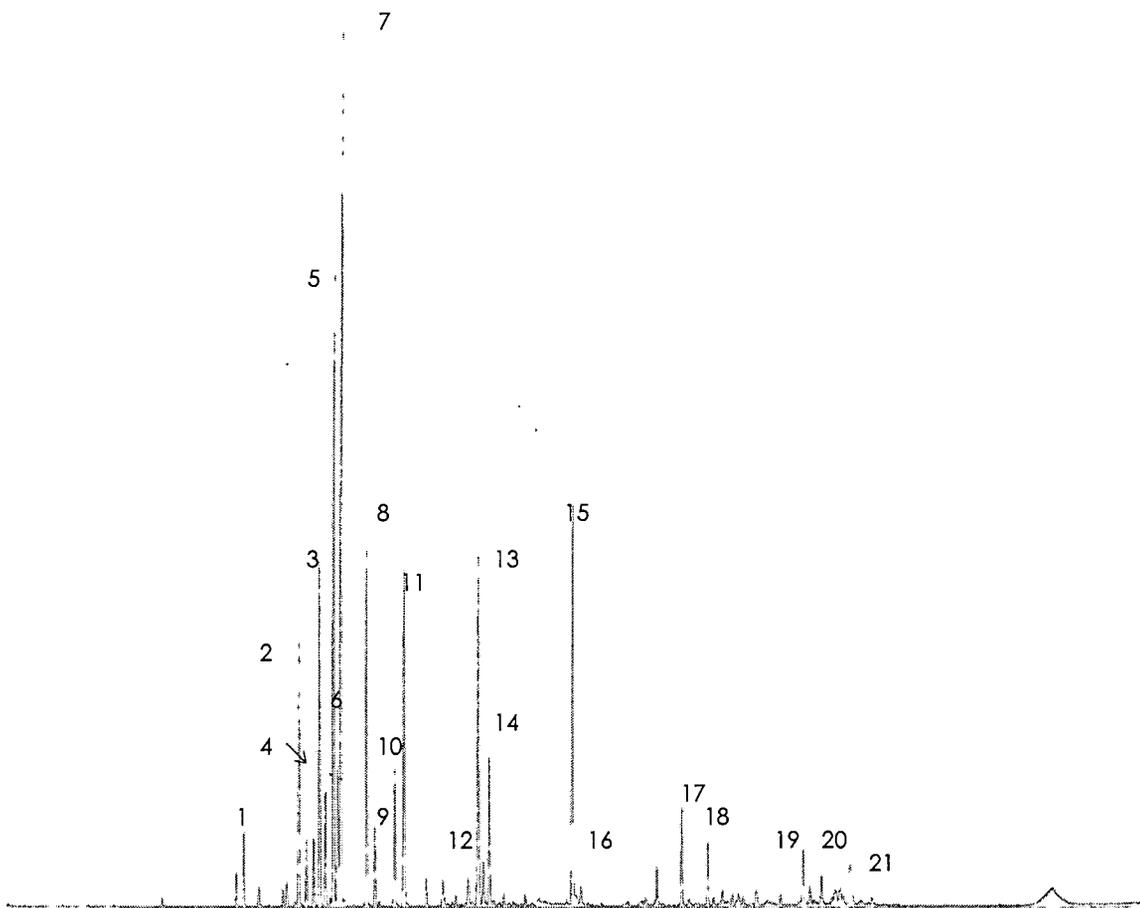


Figura 9. Espectro GC/MS del extracto etéreo de *Lippia graveolens*, hojas secadas a la sombra.

- | | |
|---|--|
| 1. Alfa-pineno | 12. Borneol |
| 2. Beta-mirceno | 13. 4-metil-1-(1-metil)3-ciclohexen-1-ol |
| 3. 3-careno | 14. (+)-alfa-terpineol |
| 4. 1-metil-4-(1,3-ciclohexadieno) | 15. Timol |
| 5. 1-metil-4-(1-metiletil) benceno ó ρ -cimeno | 16. Carvacrol |
| 6. Limoneno | 17. 4-(1,1-dimetilpropil) fenol |
| 7. Eucaliptol ó 1,8-cineol | 18. Cariofileno |
| 8. 1-metil-4-(1,4-ciclohexadieno) ó gamma-terpineno | 19. Alfa-cariofileno |
| 9. Trans-sabineno hidrato | 20. Cariofileno óxido |
| 10. (+)-4-careno | 21. 1,2,3,4,4a,2-naftalen metanol |
| 11. 3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol | |

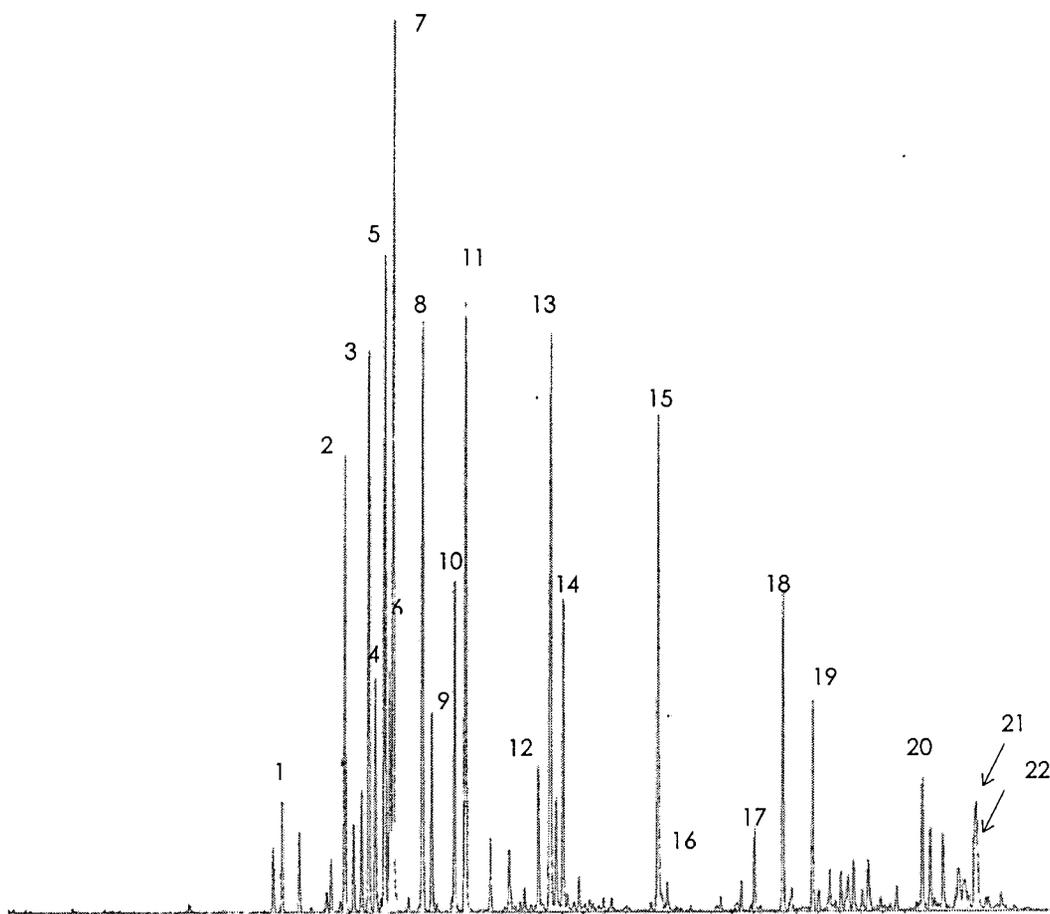


Figura 10. Espectro GC/MS del extracto etéreo de *Lippia graveolens*, hojas secadas al sol.

- | | |
|---|--|
| 1. Alfa-pineno | 12. Borneol |
| 2. Beta-mirceno | 13. 4-metil-1-(1-metil)3-ciclohexen-1-ol |
| 3. 3-careno | 14. (+)-alfa-terpineol |
| 4. 1-metil-4-(1,3-ciclohexadieno) | 15. Timol |
| 5. 1-metil-4-(1-metiletil) benceno ó p-cimeno | 16. Carvacrol |
| 6. Limoneno | 17. 4-(1,1-dimetilpropil) fenol |
| 7. Eucaliptol ó 1,8-cineol | 18. Cariofileno |
| 8. 1-metil-4-(1,4-ciclohexadieno) ó gamma-terpineno | 19. Alfa-cariofileno |
| 9. Trans-sabineno hidrato | 20. Cariofileno óxido |
| 10. (+)-4-careno | 21. Decahidro-2-naftalen metanol |
| 11. 3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol | 22. 1,2,3,4,4a,2-naftalen metanol |

Cuadro 23. Componentes presentes en los extractos etéreos de *Lippia graveolens*, hojas secadas en sol y sombra.

	Lippia (secado sol)			Lippia (secado sombra)			Cambio (%)		
alfa-pineno	1.0	±	0.03	0.97	±	0.3	-3.09	±	31.08
beta-mirceno	4.49	±	0.24	2.46	±	1.16	-82.52	±	48.15
3-careno	5.72	±	0.24	4.66	±	1.21	-22.75	±	26.47
1-metil-4-(1,3-ciclohexadieno)	2.10	±	0.08	1.52	±	0.44	-38.16	±	29.42
1-metil-4-(1-metiletil) benceno	7.54	±	0.51	8.24	±	2.49	8.50	±	30.85
Limoneno	3.03	±	0.15	2.41	±	0.67	-25.73	±	28.49
Eucaliptol	10.53	±	0.7	12.28	±	2.76	14.25	±	23.19
1-metil-4-(1,4-ciclohexadieno)	6.3	±	0.23	5.01	±	1.15	-25.75	±	23.41
Trans-sabineno hidrato	1.83	±	0.03	1.65	±	0.09	-10.91	±	5.75
(+)-4-careno	3.25	±	0.09	2.13	±	0.39	-52.58	±	18.79
3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol	7.26	±	0.3	7.8	±	1.17	6.92	±	15.49
Borneol	1.54	±	0.06	1.13	±	0.36	-36.28	±	32.30
4-metil-1-(1-metil)3-ciclohexen-1-ol	7.76	±	0.4	8.46	±	1.76	8.27	±	21.33
(+)-alfa-terpineol	3.16	±	0.04	3.84	±	0.93	17.71	±	24.24
Timol	4.67	±	0.87	10.18	±	3.17	54.13	±	32.29
Carvacrol	0.22	±	0.02	0.49	±	0.23	55.10	±	47.12
4-(1,1-dimetilpropil) fenol	0.92	±	0.07	1.08	±	0.21	14.81	±	20.50
Cariofileno	3.25	±	0.14	3.1	±	0.79	-4.84	±	25.88
alfa-cariofileno	2.01	±	0.13	1.95	±	0.79	-3.08	±	41.06
Cariofileno óxido	1.43	±	0.08	1.74	±	0.53	17.82	±	30.80
Decahidro-2-naftalen metanol	0.92	±	0.12	*	*	*	*	*	*
1,2,3,4,4a,2-naftalen metanol	1.45	±	0.22	2.21	±	0.77	34.39	±	36.24

Los resultados son la media de dos experimentos independientes con dos repeticiones ± DE.

* No identificado

VII. CONCLUSIONES

El aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) constituye una fuente de compuestos capaces de reducir la mutagenicidad inducida por 1-NP.

Debido al fuerte potencial antimicrobiano del aceite esencial de *Lippia graveolens*, el efecto antitopoisomerasa de éste, no puede ser evaluado utilizando como modelo las mutantes de *S. cerevisiae*.

Los monoterpenos carvacol y p-cimeno parecen ser sustancias prometedoras como agentes antitopoisomerasa.

Los compuestos fenólicos presentes en té de *Lippia graveolens* producen inhibición de las enzimas topoisomerasa, la cual es dependiente de la concentración de los mismos.

La composición química de *Lippia graveolens*, confiere gran importancia a esta planta, debido a la actividad biológica atribuida a algunos de los compuestos presentes, tales como p-cimeno y carvacrol, los cuales exhibieron propiedades que les permite ser considerados como agentes nutracéuticos.

El proceso de secado de las hojas de *Lippia graveolens* influye fuertemente en la composición de los extractos y por lo tanto en su actividad biológica.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Abe, F., Nagao, T., Okabe, H., 2002, Antiproliferative constituents in plants 9. Aerial parts of *Lippia dulcis* and *Lippia canescens*, *Biol. Pharm. Bull.* 25(7): 920-922.

Alani, E., Subbiah, S., and Kleckner, N., 1989, The yeast *rad50* gene encodes a predicted 153-kD protein containing a purine nucleotide-binding domain and two large heptad-repeat regions, *Gen. Soc. Am.* 122(1): 45-57.

Aliyiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., and Chinou, I. B., 2001, Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species, *J. Agric. Food Chem.* 49: 4168-4170.

Ames, B.N., 1971, The detection of chemical mutagens with enteric bacteria, in: A. Hollaender (Ed.). *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their detection*, Plenum, New York, 1: 267-282.

Ames, B.N., Lee, F. D., and Durston, W. E., 1973, An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70: 782-786.

Ames, B.N., McCann, J., Yamasaki, E., 1975, Method for detecting carcinogens and mutagens with *Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity test, *Mutat. Res.* 31: 347-364.

Andoh, T., and Ishida, R., 1998, Catalytic inhibitors of DNA topoisomerase II, *Biochimica et Biophysica Acta*: 155-171.

Arcila-Lozano, C.C., Loarca-Piña, G., Lecona-Urbe, S., González de Mejía, E., 2004, El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes, *Arch.Lat.Nutr.* 54.

- Baguley, Bruce C., and Ferguson, L. R., 1998, Mutagenic properties of topoisomerase-targeted drugs, Review, *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression*. 1400: 213-222.
- Bassole, I.H.N., Ouattara, A.S., Nebie, R., Ouattara, C.A.T., Kabore, Z.I., and Traore, S.A., 2003, Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso, *Phytochem*. 62: 209-212.
- Baker, B.S., Carpenter, A.T.C., Esposito, M.S., Esposito, R.E., and Sandler, L., 1976, The genetic control of meiosis, *Annu. Rev. Genet*. 10:53-134.
- Berger, James M., 1998, Structure of DNA topoisomerases, Review, *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression*. 1400:3-18.
- Berger, S.J., Gupta, S., Belfi, C.A., Gosky, D.M., and Mukhtar, H., 2001, Green tea constituent (2)-epigallocatechin-3-gallate inhibits topoisomerase I activity in human colon carcinoma cells, *Biochem. Biophys Res. Comm*. 288:101-105.
- Bravo, L., 1998, Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance, *Nutr. Rev*. 56(11): 317-333.
- Burden, D. A., and Osheroff, N., 1998, Mechanism of action of eucaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme, Review, *Biochimica et Biophysica Acta- Gene Structure and Expression*. 1400: 139-154.
- Burt, S.A., Reinders, R.D., 2003, Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7., *Lett App. Microbiol*. 36: 162-167.
- Buzzanell, P. J., Frey, G., and Dull, R., 1995, The spice market in the United States-Recent developments and prospects. Commercial and Agricultural Division,

Economic Research Service and U.S. Department of Agriculture. Agriculture bulletin number 709.

Cabrera, C., Jiménez, R., and López, M. C., 2003, Determination of tea components with antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.* 51:4427-4435.

Capranico, Giovanni and Binaschi, Monica, 1998, DNA sequence selectivity of topoisomerases and topoisomerase poisons, Review, *Biochimica et Biophysica Acta- Gene Structure and Expression.* 1400: 185-194.

Chen, A.Y., and Liu, L.F., 1994, DNA TOPOISOMERASES: Essential enzymes and lethal targets, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34: 191-218.

Choi, J.S., Park, K.Y., Moon, S.H., Rhee, S.H., and Young, H.S., 1994, Antimutagenic effect of plant flavonoids in the Salmonella assay system, *Arch. Pharm. Res.* 17(2): 71-75.

Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., and Palma, F., 1999, In-vitro antimicrobial activity and composition of Sardinian *Thymus* essential oils, *Lett. Appl. Microbiol.* 29: 130-135.

Costa, S. M. O., Lemos, T. L. G., Pessoa, O. D., Pessoa, C., Montenegro, R. C., Braz-Filho, R., 2001, Chemical constituents from *Lippia sidoides* and cytotoxic activity. *J. Nat. Prod.* 64: 792-795.

D'antuono, L.F., Galletti, G.C., Bocchini, P., 2000, Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. Populations from a north mediterranean area (Liguria region, north Italy), *Ann. Bot.* 86: 471-478.

De-Oliveira, A. C. A. X., Ribeiro-Pinto L. F., Paumgarten, F. J. R., 1999, In vitro inhibition of CYP2B1 monooxygenase by β -myrcene and other monoterpenoid compound, *Tox Lett.* 92: 39-46.

Dewick, P.M., 1997, Medicinal natural products. A biosynthetic approach. John Wiley & sons. Chap. 5: 152-213.

Domínguez, X, A., 1979, Métodos de investigación fitoquímica, Limusa, México, p. 229.

Economakis, C., Skaltsa, H., Demetzos, C., Sokovic, M., Thanos, C.A., 2002, Effect of phosphorus concentration of nutrient solution on the volatile constituents of leaves and bracts of *Origanum dictamnus*, J. Agric. Food Chem. 50: 6276-6280.

Edenharder, R., and Tang, X., 1997, Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by flavonoids, coumarins, quinones and other phenolic compounds, Food Chem. Toxicol. 35(3-4): 357-372.

Elgayyar, M., Draughon, F.A., Golden, D.A., Mount, J.R., 2001, Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms, J. Food Prot. 64(7): 1019-1024.

Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I.P., Troganis, A., Boskou, D., 2002, Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from greek oregano, greek sage, and summer savory, J. Agric. Food Chem. 50: 5294-5299.

Fahey, J. W., and Stephenson, K. K., 2002, Pinostrobin from honey and thai ginger (*Boesenbergia pandurata*): A potent flavonoid inducer of mammalian phase 2 chemoprotective and antioxidant enzymes, J.Agric. Food Chem. 50:7472-7476.

Freudenreich, C.H., and Kreuzer, K.N., 1994, Localization of an aminoacridine antitumor agent in a type II topoisomerase-DNA complex, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 11007-11011.

Gerothanassis, I.P., Exarchou, V., Lagouri, V., Troganis, A., Tsimidou, M., Boskou, D., 1998, Methodology for identification of phenolic acids in complex phenolic mixtures by High-Resolution Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance. Application to methanolic extracts of two Oregano species., J. Agric. Food Chem. 46: 4185-4192.

González de Mejía, E., and Ramírez-Mares, M.V., 2002, Leaf extract from *Ardisia compressa* protects against 1-nitropyrene-induced cytotoxicity and its antioxidant defense disruption in cultured rat hepatocytes, Toxicology. 179: 151-162.

Goto, T., and Wang, J.C., 1985, Cloning of yeast TOP1, the gene encoding DNA topoisomerase I, and construction of mutants defective in both DNA topoisomerase I and DNA topoisomerase II, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 7178-7182.

He, L., Mo, H., Hadisusilo, S., Quresh, A. A., Elson, C.E., 1997, Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas in vitro and in vivo. Am. Soc. Nutr. Sci. 127(5): 668-673.

Heck, M. M., Earnshaw, W. C. J., 1986, Topoisomerase II: A specific marker for cell proliferation, Cell. Biol., 103: 2569-2581.

Heo, M.Y., Sohn, S.J., Au W.W., 2001, Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate, Review, Mutat. Res. 488 : 135-150.

Hernández, N.E., Tereschuk, M.L. and Abdala, L.R., 2000, Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi del Valle (Tucumán, Argentina), Short communication, J. Ethnopharma. 73: 317-322.

Ho, C., 1992, Phenolic compounds in food, Chap. 1. In: Phenolic compounds in food and their effects on health I: Analysis, occurrence & chemistry. Ho, C., Lee, C.Y. and Huang, M.T., Ed. American Chemical Society, Washington, D.C. pp. 1-7.

Hour, T-C., Liang, Y-C., Chu, I-S., and Lin, J-K., 1999, Inhibition of eleven mutagens by various tea extracts, epigallocatechin-3-gallate, gallic acid and caffeine, *Food Chem. Toxicol.* 37: 569-579.

Huang, H., and Ferraro, T., 1992, Phenolic compounds in food and cancer prevention, Chap. 2. In: *Phenolic compounds in food and their effects on health I: Analysis, Occurrence & Chemistry*. Ho, C., Lee, C.Y. and Huang, M.T., Ed. American Chemical Society, Washington, D.C. pp. 8-35.

Hutchings, A., van Staden, J., 1994, Plants for stress-related ailments in traditional Zulu, Xhosa and Sotho medicine. Part 1: Plants used for headaches. *J. Ethnopharmacol.* 43(2): 89-124.

Isman, M., 2000, Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.* 19: 603-608.

Justesen, U., Knuthsen, P., 2001, Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes, *Food Chem.* 73: 245-250.

Kado, N. Y., Langley, D., and Eisenstadt, E., 1983, A simple modification of the *Salmonella* liquid-incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine, *Mutat. Res.* 121: 25-32.

Kado, N. Y., Guirguis, G. N., Flessel, C. P., Chan, R. C., Chang, K., and Wesolowski, J. J., 1986, Mutagenicity of fine (< 2.5 μm) airborne particles: Diurnal variation in community air determined by *Salmonella* micro preincubation (Microsuspension) procedure, *Environmental Mutagenesis.* 8: 53-66.

Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vourela, H.J., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., Kujala, T., and Heinonen, M., 1999, Antioxidant activity of plants extracts containing phenolic compounds, *J. Agric. Food Chem.* 47: 3954-3962.

- Kanazawa, K., Kawasaki, H., Samejima, K., Ashida, H., and Danno, G., 1995, Specific desmutagens (Antimutagens) in oregano against a dietary carcinogen, Trp-P-2, are galangin and quercetin, *J. Agric. Food Chem.* 43(2): 404-409.
- Khan, S.I., Nimrod, A.C., Mehrpooya, M., Nitiss, J.L., Walker, L.A., and Clark, A.M., 2002, Antifungal activity of eupolauridine and its action on DNA topoisomerase, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46(6): 1785-1792.
- Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E., and Etherton, T.D., 2002, Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer, *Am. J. Med.* 113: 71-88.
- Kokkini, S., Karousou, R., Dardioti, A., Krigas, N., and Lanaras, T., 1997, Autumn essential oils of greek oregano. *Phytochem.* 44(5): 883-886.
- Lam, L.K.T., and Zheng, B., 1991, Effects of essential oils on Glutathione S-transferase activity in mice, *J. Agric. Food Chem.* 39: 660-662.
- Lamiri, A., Lhaloui, S., Benjilali, B., Berrada, M., 2001, Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly, *Mayetiola destructor* (Say), *Field Crops Res.* 71: 9-15.
- Lawrence, B.M., 1984, The botanical and chemical aspects of Oregano, *Perfum. Flavor.* 9(5):41-51.
- Loza-Tavera H., 1999, Monoterpenes in essential Oils. Biosynthesis and properties, *Adv. Exp. Med. Biol.* 464: 49-62.
- Maron, D.M., and Ames B.N., 1983, Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat. Res.* 113.

Martínez Tomé, M., Jiménez, A. M., Ruggieri, S., Frega, N., Strabbioli, R., and Murcia, M. A., 2001, Antioxidant properties of mediterranean spices compared with common food additives, *J. Food Prot.* 64(9): 1412-1419.

Mathews, C.K., y van Holde, K.E., 1998, *Bioquímica*, Edit. McGraw-Hill Interamericana, 2º ed. España, pp. 982-885.

Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., and van Beek, T.A., 2004, Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic extracts, *Food Chem.* 85: 231-237.

Milos, M., Mastelic, J., Jerkovic, I., 2000, Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*), *Food Chem.* 71: 79-83.

Morrissey, B., 2002, in: *Functional foods. Biochemical and processing aspects*, Vol. 2. Shi, J., Mazza, G., and Marc Le Maguer, Eds. CRC Press. USA. pp. 5.

Mockute, D., Bernotiene, G., Judzentiene, A., 2001, The essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* growing wild in Vilnius district (Lithuania), *Phytochem.* 57: 65-69.

Nakatani, N., 1992, Natural antioxidants from spices. In: Ho, C., Lee, C. Y., and Huang, M. Phenolic compounds in food and their effects on health II, American Chemical Society. Chap. 6: 72-85.

Nitiss, J. L., 1998, Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells, *Biochimica et Biophysica Acta- Gene Structure and Expression.* 1400: 63-81.

Nitiss, J. L., Wang, J. C., 1988, DNA topoisomerase targeting antitumor drugs can be studied in yeast, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85: 7501-7505.

Nurmi, K., Ossipov, V., Huakioja, E., Pihlaja, K., 1996, Variation of total phenolic content and individual low-molecular-weight phenolics in foliage of mountain birch trees (*Betula pubescens* ssp. *tortuosa*), *J. Chem. Ecol.* 22: 2023-2040.

Oladimeji, F.A., Orafidiya, O.O., Ogunniyi, T.A.B., Adewunmi, T.A., 2000, Pediculocidal and scabicial properties of *Lippia multiflora* essential oil, *J. Ethnopharmacol.* 72: 305-311.

Osheoff, N., 1998, DNA Topoisomerases, *Biochimica et Biophysica Acta- Gene Structure and Expression.* 1400: 1-2.

Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J. S., and Codina, C., 2002, Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled mediterranean herbs and aromatic plants, *J. Agric. Food Chem.* 50: 6882-6890.

Pascual, M.E., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez Mata, D., and Villar, A., 2001, *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review, *J. Ethnopharmacol.* 76: 201-214.

Pierce, A., 1999, Practical guide to natural medicines. The American Pharmaceutical Association. A Stonesong Press Book. William Morrow and Company, Inc. New York. p 728.

Pommier, Y., Pourquier, P., Fan, Y., Stumberg, D., 1998, Mechanism of action of eucayotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme, *Biochimica et Biophysica Acta- Gene Structure and Expression.* 1400: 83-106.

Prates, H. T., Santos, J. P., Waquil, J. M., Fabris, J. D., Oliveira, A. B., Foster, J. E., 1998, Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbs), *J. Stored Prod. Res.* 34(4): 243-249.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., and Pridham, J.B., 1995, The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids, *Free Rad. Res.* 22: 375-383.

Rastrelli, L., Caceres, A., Morales, C., De Simone, F., and Aquino, R., 1998, Iridoids from *Lippia graveolens*, *Phytochem.* 20(6): 1829-1832.

Reid, R.J.D., Benedetti, P., Bjonsti, M-A., 1998, Yeast as a model organism for studying the actions of DNA topoisomerase-targeted drugs, *Biochimica et Biophysica Acta- Gene Structure and Expression.* 1400: 289-300.

Robbers, J.E., Speedie, M.K., Tyler, V.E., 1996, *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology.* MD: Williams and Wilkins, Baltimore, Chap. 6: 80-107.

Ruberto, G., Baratta, M.T., Sari, M., and Kaâbeche, M., 2002, Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf., *Flavour Fragr. J.* 17:251-254.

Russo, M., Galletti, G.C., Bocchini, P., Carnacini, A., 1998, Essential oil chemical composition of wild populatios of italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) letsvaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. inflorescences, *J. Agric. Food Chem.* 46: 3741-3746.

San, R.H., and Chan, R.I., 1987, Inhibitor effect of phenolic compounds on aflatoxin B1 metabolism and induced mutagenesis, *Mutat. Res.* 177(2): 229-239.

She, Q-B., Ma, W-Y., Wang, M., Kaji, A., Ho, C-T., and Dong, Z., 2003, Inhibition of cells tansformation by resveratrol and its derivatives: differential effects and mechanisms involved, *Oncogene.* 22: 2143-2150.

Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M., 1996, Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils, J. Agric. Food Chem. 44: 1202-1205.

Skuola, M., Gotsiou, P., Naxakis, G., Johnson, C.B., 1999, A chemosystematic investigation on the mono- and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (Labiatae), Phytochem. 52: 649-657.

So, F.V., Guthrie, N., Chambers, A.F., and Carroll, K.K., 1997, Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen, Cancer Lett. 112: 127-133.

Steinmetz, K. A., and Potter, J. D., 1996, Vegetables, fruit and cancer prevention: a review. J. Am. Diet Assoc. 96: 1027-1039.

Suhr, Y-J., 1999, Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances, Mutat. Res. 428: 305-327.

Sun, R., Sacalis, J. N., Chin C-K., and Still C. C., 2001, Bioactive aromatic compounds from leaves and stems of *Vanilla fragrans*, J. Agric. Food Chem. 49: 5161-5164.

Teel, R.W., and Castonguay, A., 1992, Antimutagenic effects of polyphenolic compounds, Cancer Lett. 66(2):107-113.

Thrash, C., Bankier, A.T., Barrell, B.G., and Sternglanz, R., 1985, Cloning, characterization, and sequence of the yeast DNA topoisomerase I gene, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 4374-4378.

Thompson, D.P., 1989, Fungitoxic activity of essential Oil components on food storage fungi, Mycologia. 81(1): 151-153.

Traboulsi, A.F., Taoubi, K., El-Haj, S., Bessiere, J.M., Rammal, S., 2002, Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae), *Pest Management Sci.* 58: 491-495.

Ultee, A., Kets, E.P.W., Alberda, M., Hoekstra, F.A., Smid, E.J., 2000, Adaptation of food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol, *Arch. Microbiol.* 174: 233-238.

Valentin, A., Pélissier, Y., Benoit, F., Marion, C., Kone, D., Mallie, M., Bastide, J.-M., Bessière, J.-M., 1995, Composition and antimalarial activity in vitro of volatile components of *Lippia multiflora*, *Phytochem.* 40(5): 1439-1442.

van Sumere, C. F., 1989, Methods in plant biochemistry, In: *Plant Phenolics*, Harborne, J. B., Ed. Academic Press: London, UK. 1: 29-73.

Wagner, K. H., Elmadfa, I., 2003, Biological relevance of terpenoids. Overview focusing on mono-, di- and tetraterpenes, *Ann. Nutr. Metabol.* 47 (3-4): 95-106.

Zheng, W., and Wang, S. Y., 2001, Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs, *J. Agric. Food Chem.* 49: 5165-5170.

Zhu, Q. Y., Hackman, R.M., Ensunsa, J. L., Holt, R. R., and Keen C. L., 2002, Antioxidative activities of oolong tea, *J. Agric. Food Chem.* 50: 6929-6934.

<http://www.sfc.ucdavis.edu/>

http://www-ang.kfunigraz.ac.at/~katzner/engl/Orig_vul.html