

EFICACIA FOTOPROTECTORA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA FOTOPROTECTORA Y LA ANTIGENOTOXICIDAD
FRENTE A RADIACIÓN UVB DE COMPUESTOS NATURALES DE ORIGEN VEGETAL

DIEGO ARMANDO VILLAMIZAR MANTILLA
Biólogo

Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de
Magíster en Biología

Director
Dr. JORGE LUIS FUENTES LORENZO
Microbiólogo, Ph.D
Escuela de Biología

Universidad Industrial de Santander
Facultad de ciencias
Escuela de Biología
Maestría en Biología
Bucaramanga
2024

Agradecimientos

El autor agradece el financiamiento del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, el Ministerio de Educación, el Ministerio de Industria, Comercio y Turismo y el ICETEX, Programa Ecosistema Científico-Colombia Científica, del Fondo Francisco José de Caldas, Concesión RC-FP44842-212-2018.

Tabla de contenido

	Pág.
Introducción	9
1 Objetivos	12
1.1 Objetivo general:	12
1.2 Objetivos específicos:	12
2. Metodología	13
2.1 Compuestos Químicos usados.....	13
2.2 La eficacia de fotoprotección <i>in vitro</i> de los compuestos	13
2.3 Estimados de antigenotoxicidad contra la radiación UVB usando el SOS Chromotest	14
2.4 Animales.....	15
2.5 Determinación del eritema cutáneo inducido por UV en ratones albinos BALB/c	16
2.6 Eficacia de fotoprotección <i>in vivo</i>	17
2.7 Análisis Estadísticos.....	18
3. Resultados	18
3.1 Eficacia de fotoprotección <i>in vitro</i> de los compuestos.....	18
3.2 La antigenotoxicidad contra la radiación UVB se estima según el SOS Chromotest.....	25
3.3 Eritema cutáneo inducido por la radiación UVB en ratones albinos BALB/c.....	25
3.4 Eficacia de fotoprotección <i>in vivo</i>	28
4. Discusión.....	30
5. Conclusiones	36
Referencias	37
Apéndices	51

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1 Lista de los compuestos vegetales estudiados y su absorptividad molar (ϵ). Para cada compuesto se mostraron los siguientes índices: la eficacia de protección UVB (Porcentaje de inhibición a la genotoxicidad, SPF espectrofotométrico y la longitud de onda crítica (λ_c)).....	21
Tabla 2 Valores de eficacia de fotoprotección UVB (SPF espectrofotométrico y SPF en ratones) obtenidos para cada compuesto vegetal.....	28
Tabla 3 Informes sobre la eficacia fotoprotectora y/o actividades relacionadas de los compuestos vegetales estudiados	31

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Muestra el espectro de absorción UV de cada compuesto estudiado.	18
Figura 2. Correlación global entre la eficacia de protección UVB (SPF espectrofotométrico) y la concentración del compuesto	24
Figura 3. Caracterización del eritema inducido por radiación UVB en ratones albinos BALB/c	26
Figura 4. Curvas de dosis-respuesta combinadas a la radiación UVB obtenidas de un total de sesenta sujetos (n = 21 hembras + 21 machos)	27
Figura 5. Eficacia fotoprotectora UVB en ratones para cada compuesto estudiado.....	29

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A Correlaciones entre la eficacia de protección UVB ($SPF_{\text{espectrofotométrico}}$) y la concentración del compuesto. También se proporcionó la función de mejor ajuste para cada compuesto. A – Apigenina. B – Ácido cafeico. C – trans- β -cariofileno. D – Ácido clorogénico. E – Curcumina. F – EGCG. G – kaempferol. H – Pinocembrina. I – Quercitina. J – Resveratrol. K – Escualeno. L – Dióxido de titanio.	51
Apéndice B Correlaciones entre la eficacia de protección UVB ($SPF_{\text{espectrofotométrico}}$) y el porcentaje de inhibición a la antigenotoxicidad (%GI) de los compuestos. También se proporcionó la función de mejor ajuste para cada compuesto. A – Apigenina. B – Ácido cafeico. C – trans- β -cariofileno. D – Ácido clorogénico. E – Curcumina. F – EGCG. G – kaempferol. H – Pinocembrina. I – Quercitina. J – Resveratrol. K – Escualeno. L – Dióxido de titanio.....	54

Resumen

Título: Evaluación de la Eficacia Fotoprotectora y la Antigenotoxicidad Frente a Radiación UVB de Compuestos Naturales de Origen Vegetal

Autor: Diego Armando Villamizar Mantilla **

Palabras claves: Radiación UVB, método SPF_{espectrofotométrico}, eritema cutáneo, fotoprotección.

Descripción:

Este trabajo investigó la eficacia fotoprotectora (*in vitro/in vivo*) y la antigenotoxicidad frente a la radiación UVB, de compuestos presentes en plantas que crecen en Colombia. La eficacia de protección de los compuestos se evaluó utilizando los métodos *in vitro* de SPF_{espectrofotométrico} y λ_c , y la eficacia de protección *in vivo* midiendo el eritema cutáneo en ratones BALB/c albinos utilizando un colorímetro Mexameter MX18 MDD. Todos los compuestos estudiados (apigenina, ácido cafeico, *trans*- β -cariofileno, ácido clorogénico, curcumina, galato de epigallocatequina (EGCG), kaempferol, pinocembrina, quercetina, resveratrol y escualeno) resultaron en una eficacia de protección *in vitro* moderada y alta. La antigenotoxicidad de los compuestos frente a la radiación UVB se estudió mediante el SOS Chromotest. La eficacia de fotoprotección UVB (SPF_{espectrofotométrico}) y las estimaciones de antigenotoxicidad (%GI), estuvieron moderadamente correlacionada. El eritema inducido por los rayos UVB en la piel de los ratones se ajusta a una función cinética logarítmica natural tanto en hembras como en machos ($R = 0.59 - 0.61$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$), alcanzando una dosis de saturación de eritema (ESD) de 200 mJ/cm^2 . Las dosis mínimas de eritema (MED) en los ratones se calcularon gráficamente entre 39 y 80 mJ/cm^2 . Solo cinco compuestos (apigenina, ácido cafeico, EGCG, kaempferol y pinocembrina) resultaron en fotoprotección en ratones, lo que indica una baja predictividad del índice SPF_{espectrofotométrico} para la fotoprotección *in vivo* ($R = 0.25$, n.s.). Entre los compuestos estudiados, el ácido cafeico y el kaempferol fueron los más prometedores para reemplazar los filtros sintéticos durante la formulación de protectores solares. Nuestros hallazgos enfatizan la necesidad de reevaluar la utilidad de los métodos *in vitro* para las mediciones de fotoprotección de protectores solares. En este contexto, la medición del eritema en ratones parece ser una alternativa a los métodos humanos para evaluar la eficacia de protección *in vivo*.

* Trabajo de grado

**Facultad De Ciencias,
Escuela De Biología
Maestría en biología

Director: Jorge Luis Fuentes Lorenzo, Ph.D en ciencias agrícolas

Abstract

Title: Evaluation of the Photoprotective Efficacy and Antigenotoxicity Against UVB Radiation of Natural Compounds of Plant Origin

Author: Diego Armando Villamizar Mantilla **

Keywords: UVB radiation, SPF_{spectrophotometric} method, skin erythema, photoprotection.

Description:

This work investigated the photoprotective efficacy (*in vitro/in vivo*) of compounds present in plants growing in Colombia. The *in vitro* protection efficacy of the compounds was evaluated using the SPF_{spectrophotometric} and λ_c methods and the *in vivo* protection efficacy was measured by skin erythema in albino BALB/c mice using a Mexameter MX18 MDD colorimeter. All the studied compounds (apigenin, caffeic acid, *trans*- β -caryophyllene, chlorogenic acid, curcumin, epigallocatechin gallate (EGCG), kaempferol, pinocembrin, quercetin, resveratrol, and squalene) resulted in moderate and high *in vitro* protection efficacy. The compound antigenotoxicity against UVB radiation was studied using SOS Chromotest. The photoprotection efficacy (SPF_{spectrophotometric}) and the antigenotoxicity estimates were moderately correlated. UVB-induced erythema in mouse skin fits a natural logarithmic kinetic function in both females and males ($R = 0.59 - 0.61$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$), reaching an erythema saturation dose (ESD) of 200 mJ/cm². Minimal erythema doses (MED) in mice were graphically computed between 39 and 80 mJ/cm². Only five compounds (apigenin, caffeic acid, EGCG, kaempferol, and pinocembrin) resulted in photoprotection in mice, indicating low predictivity of the SPF_{spectrophotometric} index for *in vivo* photoprotection ($R = 0.25$, n.s.). Among the studied compounds, caffeic acid and kaempferol were the most promising for replacing synthetic filters during sunscreen formulation. Our findings emphasize the need to reevaluate the usefulness of *in vitro* methods for sunscreen photoprotection measurements. In this context, erythema measurement in mice appears to be an alternative to human methods for evaluating protection efficacy *in vivo*.

* Degree Work

**Facultad De Ciencias,

Escuela De Biología

Maestría en Biología

Director: Jorge Luis Fuentes Lorenzo, Ph.D en ciencias agrícolas

Introducción

Es bien conocido que la sobreexposición de la piel humana a la radiación solar constituye un problema de salud pública debido a su carcinogenicidad (Siegel, Miller, y Jemal, 2019; Islami et al., 2020). Los rayos solares causan daño al ADN (por ejemplo, dímeros de pirimidina ciclobutano o CPD) que inicia procesos cancerígenos e inflamatorios en la piel humana (Vink, y Roza, 2001). Las lesiones producidas por la radiación solar en la piel humana, ha sido evaluada principalmente utilizando mediciones de eritema (Schmalwieser, Wallisch, y Diffey, 2012). Young et al. (1998), mostraron una relación entre los CPD inducidos por los rayos UVB y el eritema cutáneo en la piel humana, y propusieron utilizar el eritema como indicador de este daño genético. Este hallazgo fue confirmado en ratones resultando en una correlación entre el espectro de acción del eritema, los CPD y las huellas genéticas UV en las zonas espectrales de UVB (280–320 nm) y UVA^{II} (320–340 nm), pero no para el rango espectral UVA^I (340–400 nm) (Ikehata et al., 2013).

Los métodos *in vivo* basados en mediciones de eritema (por ejemplo, el Factor de Protección Solar o SPF) han sido ampliamente utilizados para evaluar la fotoprotección en humanos (Sayre et al., 1979; Osterwalder, y Herzog, 2009); para los cuales se han establecido normas ISO estandarizadas (European Standard ISO 24444, 2010). Desafortunadamente, los métodos para evaluar la eficacia fotoprotectora en humanos son controvertidos por razones éticas, ya que ocasionalmente pueden causar daño en la piel de los voluntarios utilizados en los ensayos (Bendová et al., 2007; Pelizzo et al., 2012). Los métodos *in vitro* que miden la eficacia fotoprotectora son una alternativa popular porque son no invasivos, simples y económicos. El método SPF *in vitro* se basa en mediciones de transmitancia de las muestras y en datos de irradiación estandarizada (solar o artificial) y dosis mínima de eritema (MED) (Poon et al., 2003; Stanfield, Osterwalder, y Herzog,

2010). Este método fue descrito por primera vez para examinar la eficacia fotoprotectora de soluciones alcohólicas de protectores solares mediante la medición de la transmitancia de luz a través de la solución de muestra, utilizando un espectrofotómetro equipado con una esfera de reflectancia difusa (Sayre et al., 1979). Luego, las soluciones alcohólicas fueron reemplazadas por diferentes sustratos sólidos que simulan la piel humana (Pissavini et al., 2003; Springsteen et al., 2010). El método SPF *in vitro* también se simplificó a SPF_{espectrofotométrico}, midiendo la transmitancia por espectrofotometría sin una esfera de reflectancia difusa (Mansur et al., 1986). Sin embargo, algunos autores han demostrado que las variantes mencionadas del método SPF_{in vitro} sobreestiman la fotoprotección en humanos (Sayre et al., 1979; Bendová et al., 2007; Kaur y Saraf, 2010; Ácsóvá et al., 2021). La aceptación y aplicación de estas varían notablemente entre países (Young et al., 2017), y a la fecha, no existe un consenso armonioso en el mundo sobre el uso de las mismas.

Entre los métodos *in vivo* alternativo de creciente interés, están aquellos que utilizan modelos murinos (Gyöngyösi et al., 2016). Sayre et al. (1979), demostró que el método SPF en ratones predice con éxito la eficacia fotoprotectora en humanos. Aunque no existe un procedimiento estándar para evaluar la eficacia fotoprotectora en ratones, sí se han descrito procedimientos efectivos de reflectancia para medir eritema en este modelo (Amaro et al., 2013; Serafini et al., 2014). Además, el modelo murino cuenta con diferentes líneas isogénicas (por ejemplo, Swiss albino BALB/c, C57BL/6N, sin pelo, etc.) que permiten mediciones reproducibles de los efectos nocivos en la piel inducidos por los rayos UVB, tales como: alteraciones en el tejido (Cho et al., 2017; Sheng et al., 2022), carcinogénesis (García-Bores et al., 2017; Mirzoeva et al., 2018), inflamación e inmunosupresión (Lee et al., 2014; Martinez et al., 2016), y fotoenvejecimiento (Kong et al., 2015; Choi et al., 2021). Por lo tanto, el modelo murino también nos permite aclarar los mecanismos de acción de los filtros o moléculas utilizados en las formulaciones de protectores solares.

En este trabajo, evaluamos la actividad fotoprotectora *in vitro* e *in vivo* contra la radiación UVB de compuestos previamente identificados en plantas que crecen en Colombia y que han demostrado propiedades fotoprotectoras/antigenotóxicas *in vitro* (Fuentes et al., [2021](#); Fuentes et al., [2022](#)).

1 Objetivos

1.1 Objetivo general:

Evaluar el potencial de los compuestos vegetales como ingredientes activos para la formulación de protectores solares.

1.2 Objetivos específicos:

- Determinar el potencial de los compuestos vegetales como filtros solares útiles en fotoprotección.
- Evaluar el potencial antígeno tóxico de los compuestos vegetales frente a la radiación UVB
- Evaluar la capacidad de los compuestos vegetales promisorios para inhibir el eritema inducido por radiación UVB en ratones albinos BALB/c.

2. Metodología

2.1 Compuestos Químicos usados

Los compuestos vegetales (apigenina, ácido cafeico, *trans*- β -cariofileno, ácido clorogénico, curcumina, EGCG, kaempferol, pinocembrina, quercetina, resveratrol y escualeno) y el filtro estándar (dióxido de titanio) fueron comprados a la casa comercial Sigma-Aldrich Co. Inc. (Milwaukee, WI, EE. UU.). Los solventes utilizados para la preparación de las soluciones Stock de los compuestos vegetales fueron los siguientes: metanol para apigenina, curcumina, pinocembrina, resveratrol y dióxido de titanio; agua destilada para ácido cafeico, ácido clorogénico y EGCG; acetona para *trans*- β -cariofileno y escualeno; mientras que el kaempferol y la quercetina se disolvieron en etanol y dimetilsulfóxido (DMSO), respectivamente. La ketamina y la xilazina fueron adquiridas de OVER S.R.L (San Vicente, Argentina) y ERMA S.A. (Funza, Colombia).

2.2 La eficacia de fotoprotección *in vitro* de los compuestos

Los espectros de absorción UV ($\lambda = 200\text{--}400\text{ nm}$) de los compuestos fueron determinados espectrofotométricamente como se indicó previamente (Fuentes et al., [2022](#)). Los valores promedio

de absorbancia y sus errores estándar correspondientes fueron representados gráficamente utilizando el programa ggplot2 en la plataforma R (R Core Team, 2013). El factor de protección solar (SPF *in vitro*) fue determinado utilizando la fórmula de Mansur (Mansur et al., 1986):

$$\text{SPF}_{\text{espectrofotométrico}} = \text{CF} \times \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \times \text{I}(\lambda) \times \text{A}(\lambda); \text{ donde } \text{EE}(\lambda) - \text{El espectro de efecto eritemático a una longitud de onda. } \lambda, \text{ I}(\lambda) - \text{El espectro de intensidad solar a una longitud de onda } \lambda, \text{ A}(\lambda) - \text{la absorbancia de la solución del compuesto determinado por espectrofotometría UV a una longitud de onda } (\lambda) \text{ and CF es el factor de corrección (CF = 10). Los valores de EE } (\lambda) \times \text{I}$$

fueron constantes (Sayre et al., 1979). Los valores de SPF_{*in vitro*} fueron clasificados en categorías de acuerdo con las recomendaciones a tales fines de la Comisión Europea (2006) como sigue: sin protección ($0.0 \leq \text{SPF}_{\text{in vitro}} \leq 5.9$), protección baja ($6.0 \leq \text{SPF}_{\text{in vitro}} \leq 14.9$), protección media ($15.0 \leq \text{SPF}_{\text{in vitro}} \leq 29.9$), protección alta ($30.0 \leq \text{SPF}_{\text{in vitro}} \leq 59.9$), y protección muy alta ($\text{SPF}_{\text{in vitro}} \geq 60.0$). La longitud de onda crítica (Diffey, 1994), fue determinada con la siguiente formula: $\lambda_c = \int_{290}^{\lambda_c} A(\lambda) d\lambda = 0.9 \int_{290}^{400} A(\lambda) d\lambda$; donde A(λ) es la absorbancia a una longitud de onda específica λ , λ_c la longitud de onda crítica (nm) y $d\lambda$ es el paso de longitud de onda (1 nm). Las muestras con protección de amplio espectro fueron aquellas que mostraron valores de $\text{SPF} \geq 15$ y $\lambda_c > 370$ nm, según la normativa de la FDA (Food and Drug Administration, 2011).

2.3 Estimados de antigenotoxicidad contra la radiación UVB usando el SOS Chromotest

Antes de evaluar los efectos antigenotóxicos del extracto, su genotoxicidad fue investigada utilizando el SOS Chromotest (Quillardet et al., 1982), como fue descrito previamente por Quintero et al. (2017). El ensayo de antigenotoxicidad se llevó a cabo utilizando un procedimiento de co-incubación según lo descrito por Fuentes et al. (2006). Brevemente, las células fueron tratadas

simultáneamente con diferentes concentraciones de los compuestos (entre 4 y 25042 µg/mL) y una dosis de 100 mJ/cm² de radiación UVB, la cual conocemos induce adecuadamente la respuesta SOS en la cepa *Escherichia coli* PQ37 (Estévez et al., 2018). Luego, fueron cultivadas durante 2 horas a 37 °C y agitadas a 300 rpm en un aparato Thermomixer (Eppendorf, Sao Paulo, Brazil). En cada ensayo, se incluyeron controles negativos (agua destilada) y positivo (100 mJ/cm² de UVB). Se realizaron un mínimo de cuatro experimentos independientes por tratamiento, cada uno con dos réplicas internas. Las actividades de β-galactosidasa (βG) y fosfatasa alcalina (AP) se analizaron en placas de 96 pocillos (Brand-GMBH, Wertheim, Germany), como describieron previamente Fuentes et al. (2017). La antigenotoxicidad (la capacidad del compuesto vegetal para proteger contra el daño al ADN inducido por UV) se midió como una reducción significativa en el Factor de Inducción SOS (I) en la cepa *E. coli* PQ37; se expresó como un Porcentaje de la Inhibición de la Genotoxicidad de la siguiente manera: $\%GI = 1 - (I_{ct} - I_{nt}) / (I_{UVB} - I_{nt}) \times 100$, donde I_{ct} fue el factor de inducción SOS en el procedimiento de co-incubación; I_{nt} el factor de inducción SOS en células no tratadas, y I_{UVB} fue el factor de inducción SOS en células tratadas con UVB. Los valores negativos de %GI se consideraron como cero; por lo tanto, este parámetro varió de 0% a 100%. La concentración mínima que produce una significativa ($p \leq 0.05$) inhibición de la genotoxicidad (CGI) en las células de *E. coli* PQ37, se utilizó para comparar el potencial genoprotector de las muestras probadas.

2.4 Animales

Los ratones (machos y hembras) de 8 semanas de edad comprados a la Corporación para la Investigación Biológica (CIB, Medellín, Colombia), fueron mantenidos en una unidad

experimental ventilada Biorack de la marca ALESCO® (Alesco, São Paulo, Brazil) bajo condiciones controladas (luz, humedad y temperatura). El proyecto RC-FP44842-212-2018, en el marco del cual se desarrolló la presente tesis de Maestría, fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Científica (Acta N° 15–2017, Expediente N° 4110) de la Universidad Industrial de Santander. Los experimentos y el manejo de químicos se realizaron de acuerdo con la ley nacional (Resolución No. 008430-1993) del Ministerio de Salud de Colombia y el Manual Institucional de Gestión y Procesos Integrados (PGIR–PGGA.05).

2.5 Determinación del eritema cutáneo inducido por UV en ratones albinos BALB/c

Los ratones fueron rasurados 48 horas antes de la irradiación. Para esto, los ratones fueron anestesiados intramuscularmente utilizando 100 mg/kg de ketamina (50 mg/mL) y 10 mg/kg de xilazina (20 mg/mL); luego los animales fueron depilados utilizando una crema depilatoria VEET (Reckitt-Benckiser, Cali, Colombia) aplicada en toda el área dorsal. Los ratones anestesiados fueron irradiados en una cámara de irradiación (BS-02) equipada con un controlador de radiación UV UV-MAT (Dr. Grobel UV-Elektronik GmbH, Etlingen, Alemania). Este controlador de radiación midió continuamente la irradiancia y calculó la dosis de irradiación después de alcanzar la dosis objetivo. Funcionando al 100% de intensidad, las lámparas de UVB de este aparato tenían una irradiancia de 4 mW/cm². Las dosis de radiación aplicadas estuvieron entre 70 y 6000 mJ/cm².

Las mediciones de eritema en la piel de los ratones se realizaron como se indicó previamente (Amaro et al., 2013), con modificaciones menores. El eritema se midió inmediatamente después de la depilación (0 h), 24 h y 48 h después de la irradiación utilizando un colorímetro modelo Mexameter MX18 MDD (Courage–Khazaka Electronic, Cologne, Germany),

que mide la absorbancia/reflectancia a $\lambda = 568$ nm para hemoglobina (eritema). Las mediciones se realizaron en tres áreas dorsales (de 1 cm² cada una): dorso superior (cuello), dorso medio (medio), y dorso inferior (cola). La sonda del colorímetro contiene un resorte que proporciona una presión constante sobre la piel y permite la medición automática de la absorbancia/reflectancia en un diámetro de superficie de 5 mm. El eritema inducido por UVB en los ratones se calculó con respecto a la piel no irradiada de la siguiente manera: Índice de Eritema (IE) = Reflectancia en la piel irradiada / Reflectancia en la piel no irradiada. Para cada tratamiento (dosis), se calcularon los valores promedio de IE y los errores estándar correspondientes, y se graficaron utilizando el programa ggplot2 de la plataforma R (R Core Team, [2013](#)). El valor de la Dosis Mínima de Eritema (MED, de sus siglas en inglés) en ratones BALB/c se determinó gráficamente sobre la base de las curvas de dosis Log₁₀ – respuesta eritematosa (Poon et al., [2003](#)).

2.6 Eficacia de fotoprotección *in vivo*

Los compuestos fueron evaluados a concentraciones fotoprotectoras *in vitro* (ver abajo). Las muestras se prepararon en un 25% de glicerina (Laboratorios León S.A., Bucaramanga, Colombia), que se utilizó como vehículo humectante. Los ratones anestesiados se agruparon de la siguiente manera: A – ratones no tratados; B – ratones tratados con el vehículo (25% de glicerina en metanol); C – ratones irradiados a la dosis de saturación de eritema (ESD); y D – ratones tratados con el compuesto ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) e irradiados a la ESD hasta 60 ESD. La eficacia fotoprotectora *in vivo* se calculó utilizando la fórmula: $\text{SPF}_{in vivo} = (\text{ESD}_p)/(\text{ESD}_{np})$, donde ESD_p la dosis de saturación de eritema en la piel protegida y ESD_{np} es la dosis de saturación de eritema en la piel no protegida (Gyöngyösi et al., [2016](#)). Para comparación, se utilizaron siempre controles no protectores (25% de glicerina) y protectores (dióxido de titanio).

2.7 Análisis Estadísticos

Fueron calculados los valores promedio de $SPF_{in vitro}$, λ_c , IE, $SPF_{ratones}$, MED y ESD, y sus correspondientes errores estándar. Todos los datos pasaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov para normalidad y F-máxima para homogeneidad de varianza. Por lo tanto, los valores medios de los grupos de datos fueron comparados posteriormente utilizando la prueba paramétrica de Tukey. Se utilizaron análisis de correlación para examinar la relación entre las estimaciones de SPF *in vitro* e *in vivo*. Para todos los análisis estadísticos, se consideró un valor de significancia de $p < 0.05$. La plataforma R (R Core Team, [2013](#)), fue usada para todos los análisis.

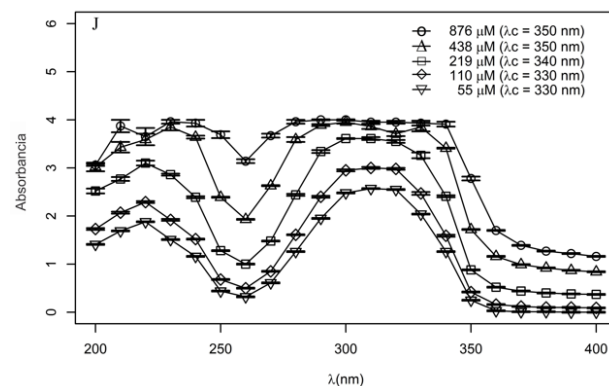
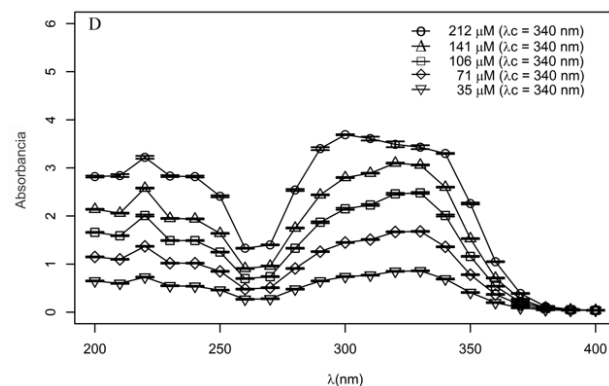
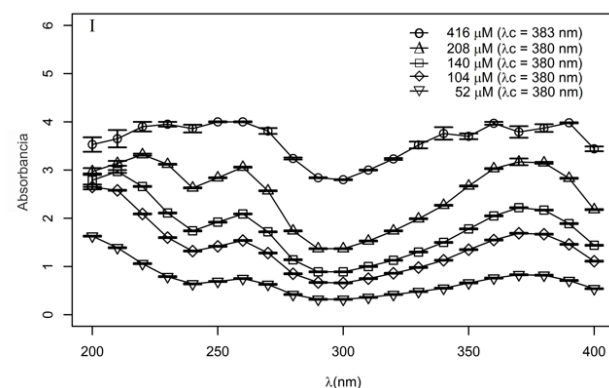
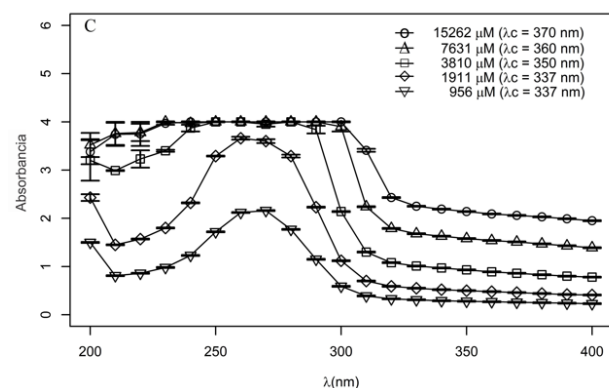
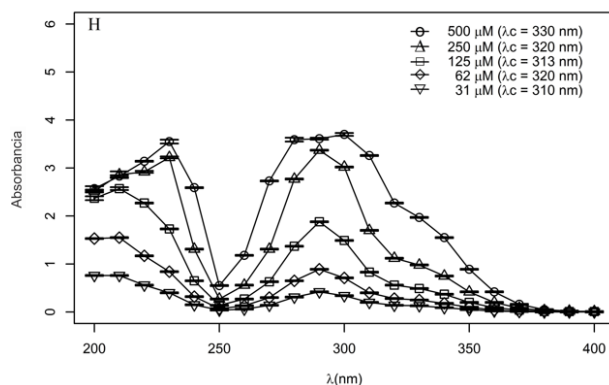
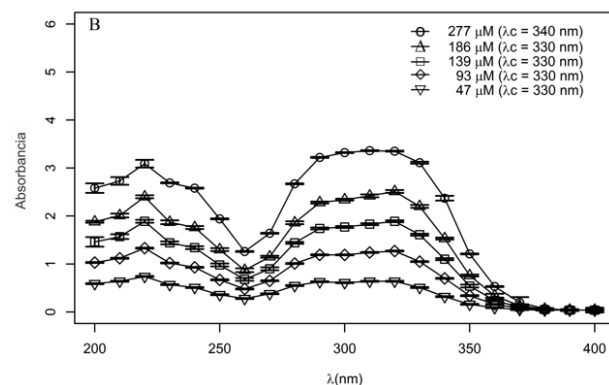
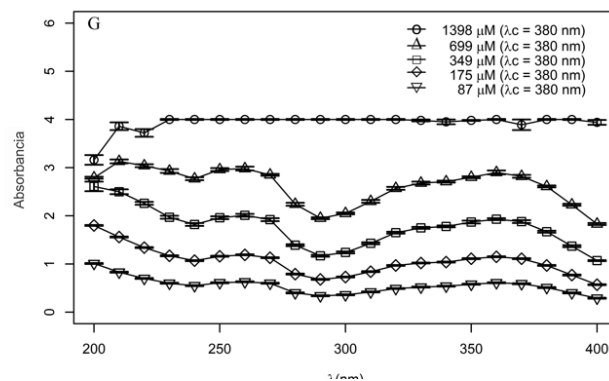
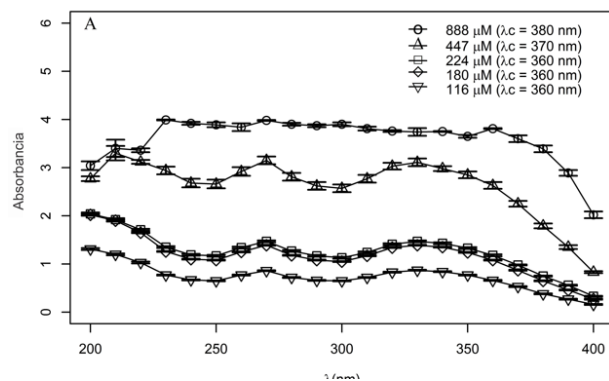
3. Resultados

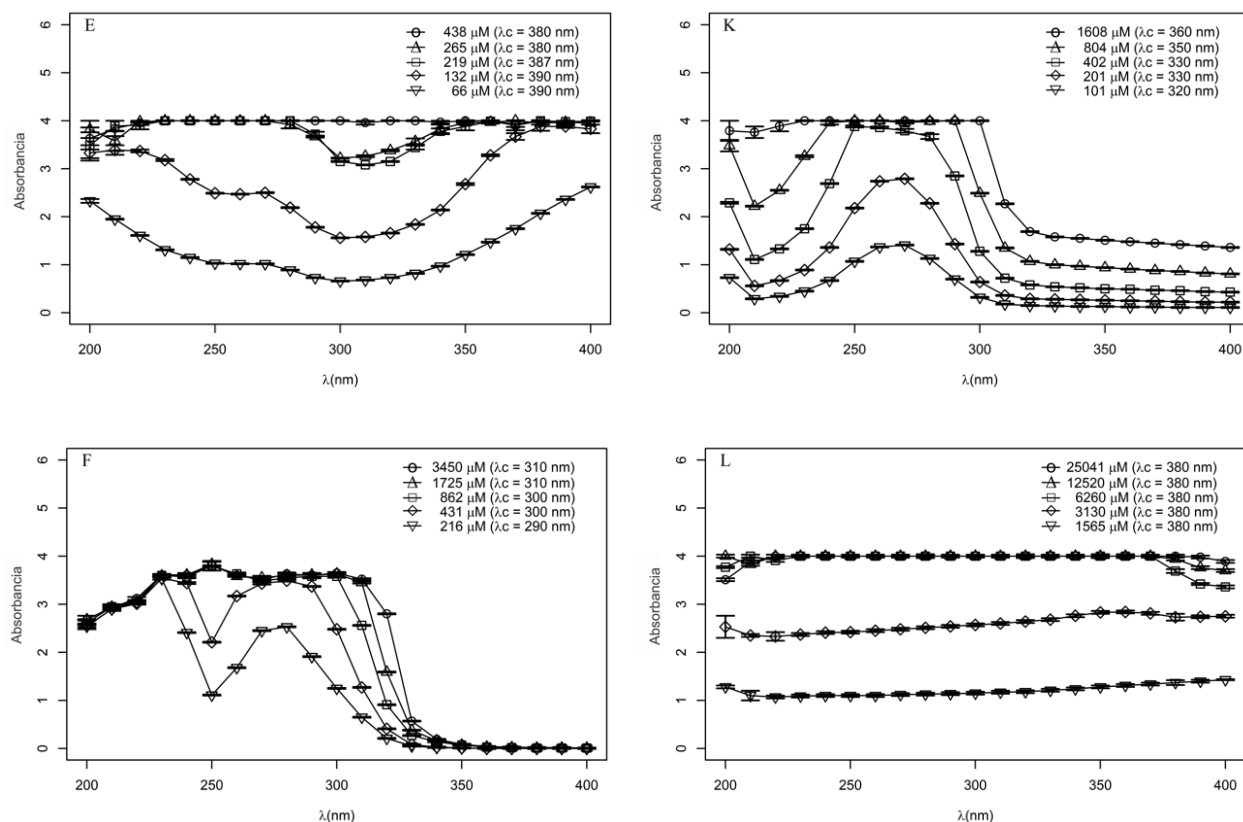
3.1 Eficacia de fotoprotección *in vitro* de los compuestos

Figura 1.

Muestra el espectro de absorción UV de cada compuesto estudiado.

EFICACIA FOTOPROTECTORA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL





Nota: Las barras de error indican el error estándar de la media para al menos tres experimentos independientes ($n = 3$). A – Apigenina. B – Ácido cafeico. C – *trans*- β -cariofileno. D – Ácido Clorogénico. E – Curcumina. F – EGCG. G – kaempferol. H – Pinocembrina. I – Quercitina. J – Resveratrol. K – Escualeno. L – Dióxido de Titanium.

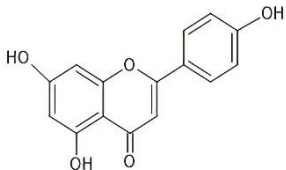
A las concentraciones más altas, la curcumina y el kaempferol mostraron un patrón constante de absorción UV de 200 a 400 nm, similar al observado con el filtro estándar (dióxido de titanio). Los compuestos apigenina, *trans*- β -cariofileno, EGCG y escualeno, mostraron un patrón constante de absorción UV entre los 200 y 300 nm. Los compuestos restantes (ácido cafeico, ácido clorogénico, pinocembrina, quercetina y resveratrol), mostraron dos picos prominentes de absorción en las zonas de UVC (200–240 nm) y UVB-UVA (280–340 nm), cuya longitud de onda

varió dependiendo del compuesto. En todos los casos, los espectros de absorción UV dependen de la concentración del compuesto.

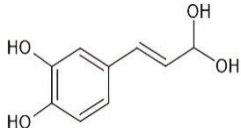
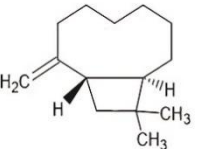
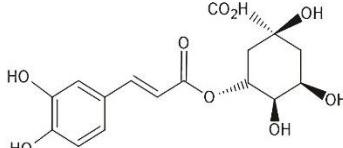
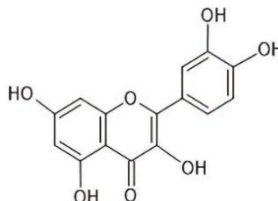
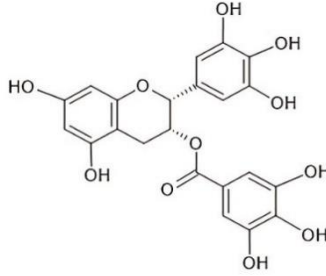
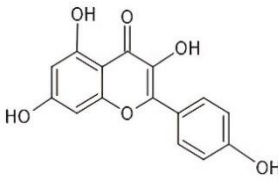
En la Tabla 1 se presentan los valores de $SPF_{\text{espectrofotométrico}}$ calculado para cada concentración del compuesto. La eficacia de fotoprotección UVB ($SPF_{\text{espectrofotométrico}}$) de los compuestos estudiados fue la siguiente: apigenina, ácido cafeico, ácido clorogénico, curcumina, kaempferol, pinocembrina, resveratrol, escualeno, y dióxido de titanio, resultaron con protección alta ($30.0 \leq SPF_{\text{espectrofotométrico}} \leq 59.9$); mientras que *trans*- β -cariofileno, EGCG, y quercetina, mostraron protección media ($15.0 \leq SPF_{\text{espectrofotométrico}} \leq 29.9$). Además, los compuestos apigenina, *trans*- β -cariofileno, curcumina, kaempferol, quercetina, escualeno y dióxido de titanio, mostraron eficacia de fotoprotección de amplio espectro ($\lambda_c \geq 370$ nm), generalmente a las concentraciones más altas ensayadas.

Tabla 1

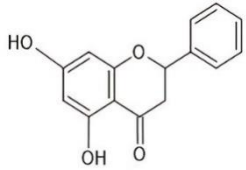
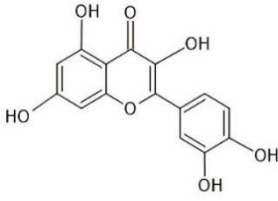
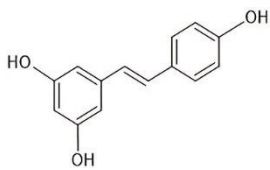
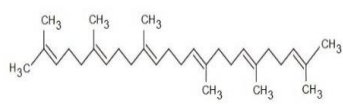
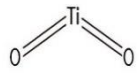
Lista de los compuestos vegetales estudiados y su absortividad molar (ϵ). Para cada compuesto se mostraron los siguientes índices: la eficacia de protección UVB (Porcentaje de inhibición a la genotoxicidad, $SPF_{\text{espectrofotométrico}}$ y la longitud de onda crítica (λ_c).

Compuestos	Absortividad molar (ϵ)	Conc. (μM)	%GI	$SPF_{\text{espectrofotométrico}}$	λ_c
	$\epsilon_{295\text{nm}} = 2270 \pm 13$ $\epsilon_{315\text{nm}} = 2430 \pm 13$	0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
		7	36 ± 8	1 ± 0	350 ± 0
		14	59 ± 6	1 ± 0	360 ± 0
		29	65 ± 5	2 ± 0	360 ± 0
		58	69 ± 4	4 ± 0	360 ± 0
		116	81 ± 3	7 ± 0	360 ± 0
		180	NE	11 ± 0	360 ± 0
		224	NE	12 ± 0	360 ± 0
		447	NE	27 ± 1	370 ± 0
		888	NE	39 ± 0	380 ± 0

EFICACIA FOTOPROTECTORA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL

Ácido Cafeico 	$\epsilon_{295\text{nm}} = 15728 \pm 27$ $\epsilon_{315\text{nm}} = 15838 \pm 20$	0 23 47 93 139 186 277	0 ± 0 3 ± 3 8 ± 7 12 ± 8 11 ± 7 10 ± 3 10 ± 7	0 ± 0 3 ± 0 6 ± 0 12 ± 1 18 ± 1 24 ± 2 33 ± 1	0 ± 0 327 ± 0 330 ± 0 330 ± 0 330 ± 0 330 ± 0 340 ± 0
<i>trans</i>-β-Cariofeleno 	$\epsilon_{295\text{nm}} = 127 \pm 0$ $\epsilon_{315\text{nm}} = 121 \pm 0$	0 956 1911 3810 7631 15262	0 ± 0 6 ± 6 21 ± 9 30 ± 11 57 ± 4 NE	0 ± 0 NE 4 ± 0 5 ± 0 15 ± 0 19 ± 0	0 ± 0 NE 360 ± 0 367 ± 0 370 ± 0 380 ± 0
Ácido clorogénico 	$\epsilon_{295\text{nm}} = 16920 \pm 9$ $\epsilon_{315\text{nm}} = 16944 \pm 15$	0 18 35 71 106 141 212	0 ± 0 13 ± 8 5 ± 6 9 ± 5 13 ± 7 10 ± 6 33 ± 6	0 ± 0 4 ± 0 8 ± 0 15 ± 0 22 ± 0 28 ± 0 36 ± 0	0 ± 0 340 ± 0 340 ± 0 340 ± 0 340 ± 0 340 ± 0 340 ± 0
Curcumina 	$\epsilon_{295\text{nm}} = 19644 \pm 11$ $\epsilon_{315\text{nm}} = 18657 \pm 12$	0 4 8 17 33 66 132 219 265 438	0 ± 0 4 ± 4 8 ± 5 22 ± 8 32 ± 8 43 ± 6 67 ± 2 NE 85 ± 1 NE	0 ± 0 1 ± 0 2 ± 0 4 ± 0 5 ± 0 7 ± 0 16 ± 0 31 ± 0 32 ± 0 40 ± 0	0 ± 0 390 ± 0 390 ± 0 390 ± 0 390 ± 0 390 ± 0 390 ± 0 387 ± 6 380 ± 0 380 ± 0
Epigallocatequina galato (EGCG) 	$\epsilon_{295\text{nm}} = 6825 \pm 3$ $\epsilon_{315\text{nm}} = 1913 \pm 2$	0 13 27 54 108 216 431 862 1725 3450	0 ± 0 22 ± 14 15 ± 11 22 ± 9 27 ± 8 46 ± 9 53 ± 6 81 ± 4 97 ± 4 100 ± 0	0 ± 0 1 ± 0 1 ± 0 2 ± 0 5 ± 0 10 ± 0 19 ± 0 30 ± 0 34 ± 0 35 ± 0	0 ± 0 270 ± 0 270 ± 0 280 ± 0 290 ± 0 290 ± 0 300 ± 0 300 ± 0 310 ± 0 310 ± 0
Kaempferol 	$\epsilon_{295\text{nm}} = 2837 \pm 30$ $\epsilon_{315\text{nm}} = 3492 \pm 35$	0 22 44 87 175 219 349 439	0 ± 0 43 ± 2 53 ± 2 63 ± 1 75 ± 2 NE 92 ± 1 NE	0 ± 0 1 ± 0 2 ± 0 4 ± 0 8 ± 0 11 ± 2 13 ± 0 14 ± 4	0 ± 0 370 ± 0 377 ± 0 380 ± 0 380 ± 0 380 ± 0 380 ± 0 380 ± 0

EFICACIA FOTOPROTECTORA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL

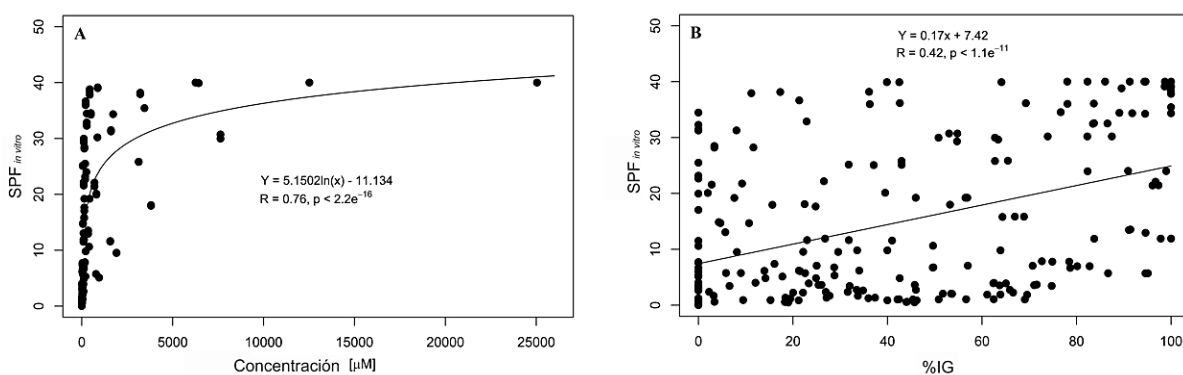
		699	97 ± 0	22 ± 0	380 ± 0
		1398	NE	40 ± 0	380 ± 0
Pinocembrina	 $\epsilon_{295\text{nm}} = 13475 \pm 11$ $\epsilon_{315\text{nm}} = 5447 \pm 4$	0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
		8	20 ± 10	1 ± 0	310 ± 0
		16	28 ± 7	3 ± 0	310 ± 0
		31	48 ± 0	6 ± 0	310 ± 0
		62	92 ± 3	10 ± 0	320 ± 0
		125	96 ± 7	12 ± 0	313 ± 0
		250	91 ± 6	24 ± 0	320 ± 0
		500	87 ± 5	34 ± 0	330 ± 0
Quercitina	 $\epsilon_{295\text{nm}} = 2739 \pm 8$ $\epsilon_{315\text{nm}} = 2583 \pm 8$	0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
		6	22 ± 12	0 ± 0	380 ± 0
		13	28 ± 15	1 ± 0	380 ± 0
		26	37 ± 16	2 ± 0	380 ± 0
		52	38 ± 14	3 ± 0	380 ± 0
		104	51 ± 12	7 ± 0	380 ± 0
		140	NE	9 ± 0	380 ± 0
		208	NE	14 ± 0	380 ± 0
		416	NE	29 ± 0	383 ± 0
Resveratrol	 $\epsilon_{295\text{nm}} = 4362 \pm 72$ $\epsilon_{315\text{nm}} = 4408 \pm 55$	0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
		7	11 ± 9	13 ± 0	330 ± 0
		14	8 ± 5	25 ± 0	330 ± 0
		27	23 ± 7	26 ± 0	330 ± 0
		55	37 ± 5	27 ± 0	330 ± 0
		110	56 ± 5	29 ± 1	340 ± 0
		219	77 ± 4	36 ± 0	340 ± 0
		438	98 ± 4	39 ± 0	350 ± 0
		876	100 ± 2	40 ± 0	350 ± 0
Escualeno	 $\epsilon_{295\text{nm}} = 3965 \pm 24$ $\epsilon_{315\text{nm}} = 1215 \pm 1$	0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
		25	18 ± 2	1 ± 0	320 ± 0
		50	14 ± 10	3 ± 0	320 ± 0
		101	12 ± 0	5 ± 0	330 ± 0
		201	10 ± 8	11 ± 0	330 ± 0
		402	19 ± 4	20 ± 0	350 ± 0
		804	15 ± 10	23 ± 0	350 ± 0
		1608	8 ± 6	31 ± 0	360 ± 0
		3215	22 ± 8	39 ± 0	370 ± 0
		6430	49 ± 0	40 ± 0	380 ± 0
Dióxido de Titanio	 $\epsilon_{295\text{nm}} = 816 \pm 0$ $\epsilon_{315\text{nm}} = 836 \pm 1$	0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
		626	NE	6 ± 0	380 ± 0
		783	16 ± 6	6 ± 0	390 ± 0
		1252	NE	11 ± 0	390 ± 0
		1565	32 ± 6	12 ± 0	390 ± 0
		3130	57 ± 7	26 ± 0	390 ± 0
		6260	82 ± 3	40 ± 0	380 ± 0
		12521	100 ± 2	40 ± 0	380 ± 0
		25042	93 ± 4	40 ± 0	380 ± 0

Nota: La absorbancia molar (ϵ) se calculó de la siguiente manera: $\epsilon\lambda = (A/c) \times d$; donde $\epsilon\lambda$ es el coeficiente de absorción molar ($L \times mol^{-1} \times cm^{-1}$) de los compuestos a una longitud de onda específica λ , A es la absorbancia, c es la concentración molar del compuesto (mol/L), y d es el ancho de la cubeta (generalmente 1 cm). Los valores de $SPF_{in vitro}$ se clasificaron en las siguientes categorías: sin protección ($0.0 \leq SPF_{in vitro} \leq 5.9$), protección baja ($6.0 \leq SPF_{in vitro} \leq 14.9$), protección media ($15.0 \leq SPF_{in vitro} \leq 29.9$), alta protección ($30.0 \leq SPF_{in vitro} \leq 59.9$), y protección muy alta ($SPF_{in vitro} \geq 60.0$). A $\lambda_c > 370$ nm define una protección de amplio espectro. NE, no evaluado.

En promedio, los valores de $SPF_{espectrofotométrico}$ mostraron una clara dependencia de la concentración ($R = 0.76$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$, Figura 2A), siguiendo una función logarítmica natural. Las cinéticas (función lineal o logarítmica natural) y las correlaciones de cada compuesto por separado, se muestran en el Apéndice A.

Figura 2.

Correlación global entre la eficacia de protección UVB ($SPF_{espectrofotométrico}$), la concentración del compuesto y el porcentaje de inhibición a la antigenotoxicidad.



Nota: Correlación entre la eficacia de protección UVB ($SPF_{espectrofotométrico}$) y la concentración del compuesto (A). Correlación entre la eficacia de protección UVB ($SPF_{espectrofotométrico}$) y el porcentaje de inhibición a la antigenotoxicidad (B).

3.2 La antigenotoxicidad contra la radiación UVB se estima según el SOS Chromotest

La genotoxicidad directa de cada compuesto se ensayó antes de investigar su efecto antigenotóxico. A las concentraciones probadas, los compuestos no aumentaron el valor I en la cepa de *E. coli* PQ37; por lo tanto, estos compuestos se consideraron no genotóxicos en para este modelo experimental (datos no mostrados).

El potencial antigenotóxico de los compuestos estudiados, se muestra en la Tabla 1. Los valores de %GI aumentaron con la concentración del compuesto, sugiriendo que estos compuestos tienen un modo de acción antigenotóxico directo. Basándose en la concentración mínima que produce una inhibición significativa ($p < 0,05$) de la genotoxicidad, la potencia antigenotóxica de los compuestos fue la siguiente: apigenina (7 μM) > pinocembrina (16 μM) > kaempferol (22 μM) > quercetina (26 μM) > curcumina (33 μM) > resveratrol (55 μM) > EGCG (108 μM) > ácido clorogénico (212 μM) > óxido de titanio (1565 μM) > esqualeno (6430 μM) > *trans*- β -cariofileno (1911 μM). A las concentraciones estudiadas, el ácido cafeico no mostró un efecto antigenotóxico significativo contra la radiación UVB.

Adicionalmente, la eficacia de fotoprotección UVB ($\text{SPF}_{\text{espectrofotométrico}}$) y las estimaciones de antigenotoxicidad (%GI), estuvieron moderadamente correlacionada ($R = 0.42$, $p < 1.1 \times 10^{-11}$, Figura 2B). Las cinéticas (función lineal, logarítmica natural o exponencial) y las correlaciones para cada compuesto por separado, se pueden encontrar en la Apéndice B.

3.3 Eritema cutáneo inducido por la radiación UVB en ratones albinos BALB/c

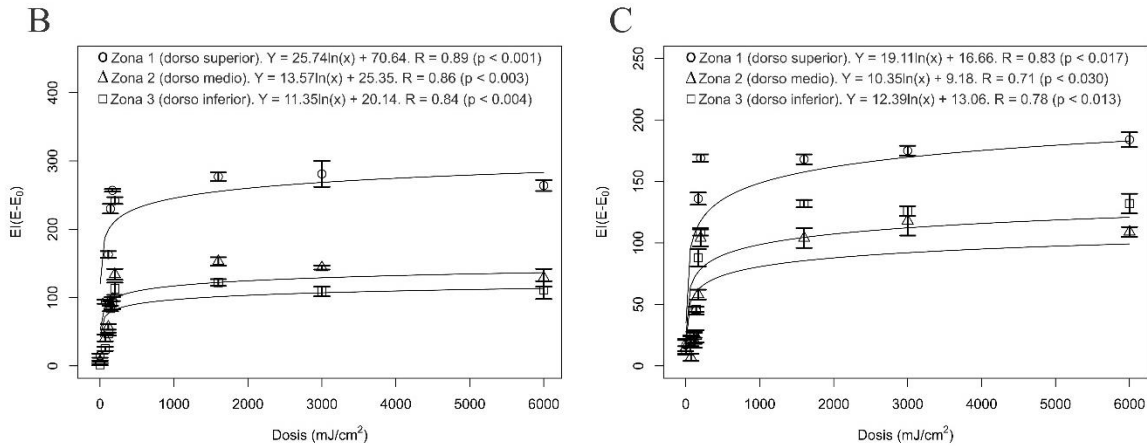
Se estudió el eritema cutáneo inducido por la radiación UVB en ratones BALB/c. Los tipos de daños cutáneos visibles en piel de ratones irradiados con UVB (Figura 3A), se contabilizaron de la siguiente manera: Hembras – eritema (71%), quemaduras (20%) y pigmentación (9%). Machos – eritema (62%), quemaduras (30%) y pigmentación (8%). Entre las áreas dorsales de los ratones evaluadas, el área superior (cuello) fue la más sensible a la radiación UVB. El eritema fue claramente evidente, tanto cuantitativamente como visualmente, a las 48 horas después de la irradiación.

La Figura 3 también muestra la relación dosis-respuesta entre las dosis de UVB y el eritema. La cantidad de eritema aumentó con la dosis de UVB hasta cerca de 200 mJ/cm^2 , donde se satura la respuesta tanto en ratones hembras (Figura 3B) como en machos (Figura 3C). En general, el grado de eritema inducido por UVB fue mayor en ratones hembras que en ratones machos, pero en ambos sexos, siguió una función logarítmica natural.

Figura 3.

Caracterización del eritema inducido por radiación UVB en ratones albinos BALB/c



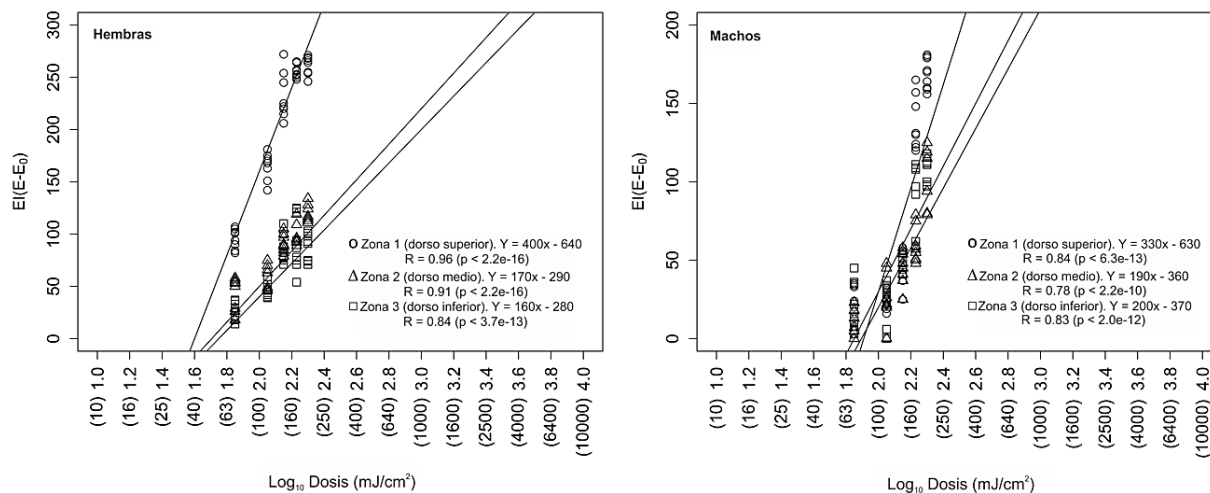


Nota: Lesiones inducidas por UVB en la piel de ratones BALB/c (A). También se proporcionaron cinéticas de inducción de eritema tanto en hembras (B) como en machos (C) ($n = 30$ hembras + 30 machos).

Un método gráfico lineal basado en curvas de dosis logarítmicas y respuesta eritematosa, permitió estimar la dosis umbral (intercepción del eje X) o MED (Figure 4). Los valores de MED variaron dependiendo del sexo y las áreas dorsales de la siguiente manera: Hembras – dorso superior (39 mJ/cm^2) < dorso medio (51 mJ/cm^2) < dorso inferior (57 mJ/cm^2). Machos – dorso inferior (71 mJ/cm^2) < dorso medio (77 mJ/cm^2) < dorso superior (80 mJ/cm^2). Esto confirmó que los ratones hembras eran más sensibles a la radiación UVB que los machos.

Figura 4.

Curvas de dosis-respuesta combinadas a la radiación UVB obtenidas de un total de cuarenta y dos sujetos ($n = 21$ hembras + 21 machos).



3.4 Eficacia de fotoprotección *in vivo*

Para determinar la utilidad del modelo de ratón para evaluar la eficacia protectora *in vivo*, estudiamos la cinética de inducción de eritema en presencia y ausencia de compuestos vegetales o un filtro estándar (dióxido de titanio). Como se esperaba, la glicerina al 25% utilizada como vehículo humectante para aplicar las muestras no mostró protección (Table 2).

Tabla 2

Valores de eficacia de fotoprotección UVB ($SPF_{\text{espectrofotométrico}}$ y $SPF_{\text{en ratones}}$) obtenidos para cada compuesto vegetal.

Componentes (masa) [†]	$SPF_{\text{espectrofotométrico}}$	SPF_{ratones}
Glicerina 25% (solvente)	0 ± 0	0 ± 0
Apigenina (48.6 μg)	11 ± 0	2 ± 0
Ácido cafeico (80.7 μg)	36 ± 1	4 ± 0
β -Cariofileno (3119 μg)	19 ± 0	0 ± 0

Ácido clorogénico (74.4 µg)	36 ± 0	0 ± 0
Curcumina (17.7 µg)	5 ± 0	0 ± 0
EGCG (198 µg)	19 ± 0	1 ± 0
Kaempferol (100 µg)	12 ± 0	3 ± 0
Pinocembrina (24.5 µg)	10 ± 0	2 ± 0
Quercetina (42.3 µg)	9 ± 0	0 ± 0
Resveratrol (15.5 µg)	27 ± 0	0 ± 0
Escualeno (333 µg)	27 ± 0	0 ± 0
Dióxido de Titanio (500 µg) [‡]	40 ± 0	3 ± 0

(R = 0.25, p = 0.38, n.s.)

Nota:

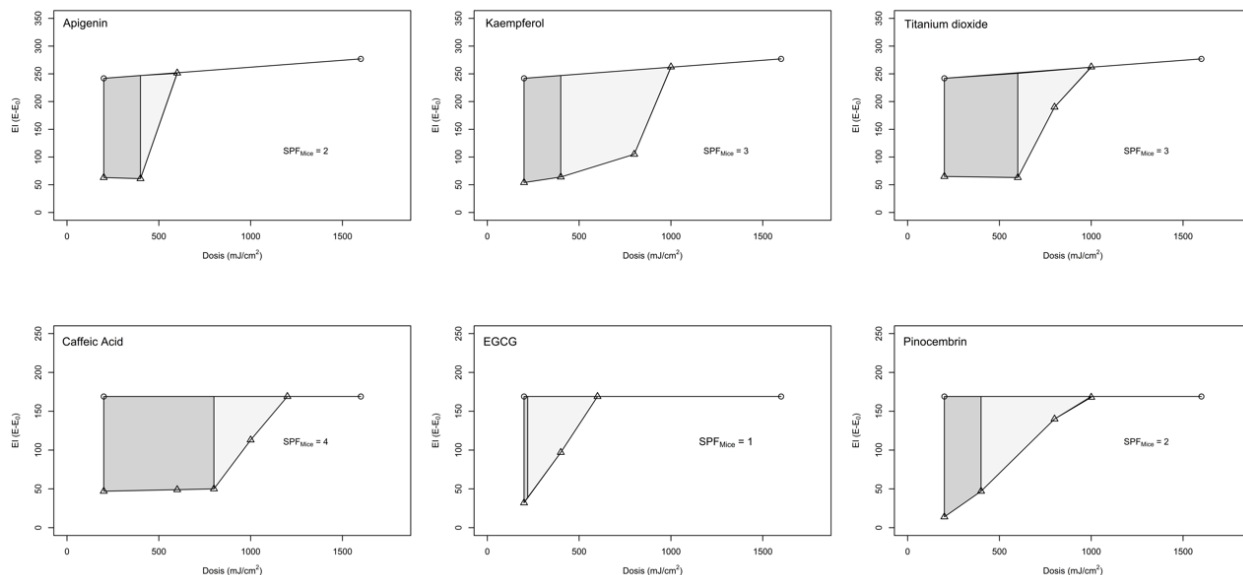
[†], Masa del compuesto que es no citotóxica en células de fibroblastos humanos (Flórez et al., 2024).

[‡], Masa del filtro UV más utilizados para la preparación comercial de protectores solares según la FDA (Jansen et al., 2013).

Solo mostraron fotoprotección *in vivo* los compuestos apigenina (SPF_{ratón} = 2 ± 0), ácido cafeico (SPF_{ratón} = 4 ± 0), EGCG (SPF_{ratón} = 1 ± 0), kaempferol (SPF_{ratón} = 3 ± 0), y pinocembrina (SPF_{ratón} = 2 ± 0). El ácido cafeico y el kaempferol son los compuestos más fotoestables en el rango de dosis estudiado (Figura 5).

Figura 5.

Eficacia fotoprotectora UVB en ratones para cada compuesto estudiado.



A bajas concentraciones, los compuestos ácido cafeico y kaempferol mostraron valores de SPF superiores o iguales a los obtenidos con el filtro estándar (dióxido de titanio), lo que respalda su potencial en formulaciones de protector solar. En contraste, varios compuestos que mostraron fotoprotección *in vitro* (*trans*- β -cariofileno, ácido clorogénico, curcumina, quercitina, resveratrol, y escualeno), no mostraron fotoprotección *in vivo*. Es decir, la fotoprotección de los compuestos *in vitro* e *in vivo* coincidieron solo en el 50% de los casos, y estas estimaciones no estuvieron correlacionadas ($R = 0.25$, $p = 0.38$, n.s.).

4. Discusión

En estudios previos, se ha demostrado que los extractos obtenidos de plantas que crecen en Colombia tienen propiedades fotoprotectoras/antigenotóxicas *in vitro* (Fuentes et al., 2021; Fuentes et al., 2022). Aquí hemos mostrado que varios de los compuestos presentes en estas plantas (apigenina, ácido cafeico, *trans*- β -cariofileno, ácido clorogénico, curcumina, EGCG, kaempferol, pinocembrina, quercetina, resveratrol y escualeno), actúan como filtros UV. Este fue el primer informe de fotoprotección *in vitro* para los compuestos *trans*- β -cariofileno, curcumina y escualeno.

Las estimaciones de fotoprotección *in vitro* calculadas para los compuestos estudiados fueron consistentes con las publicadas previamente (Tabla 3).

El índice $SPF_{\text{espectrofotométrico}}$ (Mansur et al., 1986) se correlacionó con la concentración ($R = 0,76$, $p < 2,2 \times 10^{-16}$) y la antigenotoxicidad ($R = 0,42$, $p < 1,1 \times 10^{-11}$) de los compuestos, como se observó previamente en nuestro estudio con los extractos de plantas (Fuentes et al., 2021; Fuentes et al., 2022).

Aquí demostramos que la curva dosis-respuesta del eritema en la piel de ratón se ajusta a una función logarítmica natural (Figura 3BC). Hasta alcanzar la dosis de UVB de 200 mJ/cm^2 , estas cinéticas fueron lineales y similares a las reportadas previamente para la piel humana (Wan et al., 1983; Harrison y Young, 2002).

Las curvas de dosis- $\log_{10}$ respuesta eritematosa (Figura 4), permitieron el cálculo de la dosis umbral (intercepción del eje X) o MED, como se describió previamente para la piel humana (Poon et al., 2003; Diffey et al., 1987). Los valores de MED ($39\text{--}80 \text{ mJ/cm}^2$) obtenidos para ratones BALB/c, fueron ligeramente más bajos pero comparables, a los valores reportados evaluando visualmente el eritema en la piel de ratones ($41\text{--}92 \text{ mJ/cm}^2$) (Serafini et al., 2014). Nuestros resultados claramente evidenciaron que el eritema inducido por UVB fue mayor en ratones hembras que en machos y que esto variaba dependiendo de las áreas dorsales, posiblemente relacionado con diferencias en los niveles de vascularización de estas áreas. Se ha evidenciado previamente una relación entre el eritema y el incremento de la vascularización en ratones (Hirakawa et al., 2005).

Tabla 3

Informes sobre la eficacia fotoprotectora y/o actividades relacionadas de los compuestos vegetales estudiados.

Componentes	Valores SPF (Fuentes)	Otras actividades relacionadas con la fotoprotección (Fuentes)
Apigenina	SPF _{in vitro} = 7.3 – 28.8 (Choquenot et al., 2009; Stevanato et al., 2014)	Previene la carcinogénesis inducida por los rayos UVB en la piel de ratones (Birt et al., 1997; Mirzoeva et al., 2018) Previene la carcinogénesis inducida por los rayos UVB en las células de la piel de ratones (Lepley et al., 1996; Tong et al., 2007; van Dross et al., 2007) y humanos (Lepley y Pelling, 1997; McVean et al., 2000) Previene la genotoxicidad inducida por los rayos UVB y promueve la reparación del daño al ADN en las células de la piel y de riñones humanos (Das et al., 2013; García Forero et al., 2019). Previene el envejecimiento inducido por los rayos UVB en las células de la piel humana (Hwang et al., 2011).
Ácido cafeico	SPF _{in vitro} = 6.2 – 28.8 (Choquenot et al., 2009; Stevanato et al., 2014)	Previene la carcinogénesis inducida por los rayos UVB en la piel de ratones (Lu et al., 2002; Kang et al., 2009). Prevención de la inflamación y el estrés oxidativo inducido por los rayos UVB en la piel humana (Saija et al., 1999, 2000). Prevención del daño al ADN y del estrés oxidativo inducido por los rayos UVB en células de linfocitos humanos (Prasad et al., 2009).
Ácido clorogénico	SPF _{in vitro} = 10.1 (Choquenot et al., 2009)	Prevención de la inflamación (eritema) inducida por los rayos UVB en la piel de cobayos (Kitagawa et al., 2011).
Curcumina	-	Previene la formación de tumores inducidos por los rayos UVB en la piel de ratones (Phillips et al., 2013). Previene el estrés oxidativo inducido por los rayos UVA en la piel de ratones (Ishizaki et al., 1996; Oguro et al., 2001). Previene la carcinogénesis y el envejecimiento inducido por los rayos UVB en la piel humana (Heng, 2010). Previene la inflamación y el estrés oxidativo inducidos por los rayos UVB en células de la piel humana (Chan et al., 2003; Cho et al., 2005).
EGCG	SPF _{in vitro} = 7.3 (Stevanato et al., 2014)	Prevención de la carcinogénesis (Gensler et al., 1996; Lu et al., 2002; Mittal et al., 2003), fotoenvejecimiento (Kim et al., 2001), e inmunosupresión (Schwarz et al., 2005; Meeran et al., 2006), inducida por los rayos UVB en la piel de ratones.

EFICACIA FOTOPROTECTORA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL

		Previene el eritema (Katiyar et al., 1999; Elmetts et al., 2001) y el estrés oxidativo (Katiyar y Mukhtar, 2001a, 2001b), inducido por los rayos UVB en la piel humana Previene la inflamación inducida por los rayos UVB (eritema) y el estrés oxidativo en la piel de cobayos (Kim et al., 2001). Previene la carcinogénesis inducida por los rayos UVB en las células de la piel humana (Barthelman et al 1998; Afaq et al., 2003; Nihal et al., 2005). Previene el envejecimiento y genotoxicidad inducido por los rayos UVB en células de piel humana (Kim et al., 2001; Morley et al, 2005).
Kaempferol	SPF _{in vitro} = 24.9 (Stevanato et al., 2014)	Prevención de la inflamación inducida por los rayos UVB (expresión de la ciclooxygenasa-2) en las células de la piel de ratones (Lee et al., 2010).
Pinocembrina	SPF _{in vitro} = 16.0 (Stevanato et al., 2014)	Previene la genotoxicidad inducida por los rayos UVB y promueve la reparación del daño al ADN en las células renales humanas (García Forero et al, 2019).
Quercetina	SPF _{in vitro} = 10.3 (Choquenot et al., 2008; Stevanato et al., 2014)	Previene el estrés oxidativo inducido por los rayos UVB en la piel de ratones (Casagrande et al., 2006). Prevención de la inflamación inducida por los rayos UVB (producción de citocinas) en células de la piel humana (Vicentini et al., 2011).
Resveratrol	SPF_{in vitro} = 7.0 – 19.2 (Polonini et al., 2013; Stevanato et al., 2014) SPF_{spectrophotometric} = 9.2 (Bhattacharya y Sherie, 2020)	Prevención de la carcinogénesis (Afaq et al., 2003; Reagan-Sham et al., 2004; Aziz et al, 2005ab) y la inflamación (Adhami et al., 2003) inducida por los rayos UVB en la piel de ratones. Previene la carcinogénesis inducida por los rayos UVB en las células de la piel humana (Back et al., 2012).

Nota:

SPF_{in vitro} – Calculado según Diffey y Robson, (1989).

SPF_{espectrofotométrico} – Calculado según Mansur et al., (1986).

La dosis mínima de eritema (MED) varía según el tipo de piel en los seres humanos (Harrison y Young, 2002; Dornelles et al., 2004; Valbuena et al., 2020) y con la base genética de los ratones (Gyöngyösi et al. 2016), lo que lo convierte en un indicador pobre para su uso en fotoprotección. Aquí, revelamos diferencias en cómo responde la piel de los ratones de diferentes sexos a la radiación UVB. Considerando cuestiones prácticas durante la experimentación, decidimos introducir un nuevo término ($ESD = 200 \text{ mJ/cm}^2$) que produjo resultados similares en ambos sexos y fue constante hasta que se aplicó una dosis de radiación de 6000 mJ/cm^2 (Figure 3BC). Esta dosis es relevante porque produce inflamación cutánea significativa en los ratones BALB/c (Lee et al., 2013) y una dosis de referencia para estudiar la fotoestabilidad *in vivo* de las muestras promisorias (Figura 5). La dosis de saturación de eritema (ESD) fue mayor que la MED en ratones BALB/c (entre 2.5 y 5.1 veces), permitiendo un cálculo más eficiente de los valores de SPF en este modelo.

Para cada compuesto, calculamos los valores de SPF en ratones ($SPF_{\text{ratón}}$) basados en la reducción del valor de ESD con respecto al valor de ESD observado en su ausencia (Tabla 2). Solo cinco compuestos (apigenina, ácido cafeico, EGCG, kaempferol, y pinocembrina) resultaron **con** fotoprotección en ratones, lo que indica que el índice de $SPF_{\text{espectrofotométrico}}$ es poco predictivo de la fotoprotección *in vivo* ($R = 0.25$, n.s.). Esta sobreestimación de fotoprotección *in vivo* utilizando el método $SPF_{\text{espectrofotométrico}}$, coincide con hallazgos previos que comparan estimados de SPF *in vitro* e *in vivo* (Sayre et al., 1979; Bendová et al., 2007; Kaur y Saraf, 2010; Ácsová et al., 2021), pero contrastan con otros estudios (Mansur et al., 1986; Herzog, 2002; Yang et al., 2018). Ácsová *et al.* (2021), indicó que las estimaciones de $SPF_{\text{espectrofotométrico}}$ están influenciadas por el uso de diferentes solventes, concentraciones de muestra $> 2 \text{ mg mL}^{-1}$, y la ausencia de controles con filtros UV estándar. Nosotros creemos, que el solvente usado es crítico porque generalmente se usan

diferentes solventes para disolver los filtros UV orgánicos (ver Material y Métodos). Cuando existen diferentes polaridades en los solventes y vehículos humectante usados para la formulación del protector solar (*e.g.*, acetone & glycerin), esto puede afectar la distribución uniforme de los filtros UV en la piel y, por consiguiente, afectar las mediciones de fotoprotección. En resumen, este trabajo respalda la hipótesis de que los métodos de SPF *in vitro* sobreestiman la fotoprotección *in vivo*; por lo tanto, recomendamos el uso del índice de SPF_{espectrophotométrico} solo para los escrutinios iniciales de los fotoprotectores. La evaluación de la fotoprotección *in vivo* es necesaria para las pruebas de formulación de protectores solares.

A pesar del creciente interés en especies vegetales que pueden ser fuentes de filtros UV (Kaur y Saraf, 2010; Ácsová et al., 2021; Fuentes et al., 2021, 2022; Morocho-Jácome et al. 2021), hay muy pocos estudios sobre los compuestos vegetales en su forma pura (Elmets et al., 2001; Wang et al., 2001; Morocho-Jácome et al. 2021). Aquí mostramos nuevos datos sobre la eficacia fotoprotectora *in vivo* de cinco compuestos vegetales (apigenina, ácido cafeico, EGCG, kaempferol y pinocembrina). El ácido cafeico y el kaempferol son compuestos transparentes que mostraron propiedades de filtro UV comparables con las del dióxido de titanio (Tabla 2), soportando su potencial uso para la formulación de protectores solares. Varios de estos compuestos son moléculas polifuncionales que también actúan contra la radiación UV como agentes anticarcinógenos, antiinflamatorios, antioxidantes y quimiopreventivos (Tabla 3); la apigenina, el ácido cafeico y el EGCG, son los más estudiados. Sin embargo, otros compuestos que han sido menos estudiados, como el kaempferol y la pinocembrina, especialmente el primero, son moléculas muy prometedoras para su uso en formulaciones de protectores solares. Por otro lado, los compuestos que no lograron proteger la piel de los ratones (*trans*- β -cariofileno, ácido clorogénico, curcumina, quercetina, resveratrol y escualeno) requerirán estudios adicionales y más detallados. Como se indicó

anteriormente, varios factores pueden afectar la eficacia de la fotoprotección, especialmente la solubilidad del compuesto y la compatibilidad del solvente y el vehículo.

5. Conclusiones

Varios compuestos (apigenina, ácido cafeico, *trans*- β -cariofileno, ácido clorogénico, curcumina, EGCG, kaempferol, pinocembrina, quercetina, resveratrol y escualeno) presentes en plantas que crecen en Colombia, actúan como filtros UV *in vitro*. El eritema inducido por la radiación UVB en la piel de ratón, se ajusta a una función logarítmica natural, alcanzando saturación de eritema a 200 mJ/cm². Cinco compuestos (apigenina, ácido cafeico, EGCG, kaempferol y pinocembrina), producen fotoprotección en la piel de ratones, siendo el ácido cafeico y el kaempferol los más promisorios como filtros UV; por tanto, para la formulación de protectores solares. El índice SPF_{espectrofotométrico} sobrestima la fotoprotección *in vivo*, enfatizando la necesidad de reevaluar la utilidad de los métodos *in vitro* para medir la eficacia fotoprotectora de los protectores solares. El método SPF en ratones parece ser una alternativa a los métodos humanos para evaluar la eficacia de protección *in vivo*.

Referencias

- Ácssová, A., J. Hojerová, L. Janotková, H. Bendová, L. Jedličková, V. Hamranová, and S. Martiniaková (2021) The real UVB photoprotective efficacy of vegetable oils: *in vitro* and *in vivo* studies. *Photochem. Photobiol. Sci.* 20(1), 139–151.
- Adhami, V.M., F. Afaq, and N. Ahmad (2003) Suppression of ultraviolet B exposure-mediated activation of NF-kappaB in normal human keratinocytes by resveratrol. *Neoplasia*. 5(1), 74–82.
- Afaq, F., V.M. Adhami, and N. Ahmad (2003) Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 186(1), 28–37.
- Afaq, F., V.M. Adhami, N. Ahmad, and H. Mukhtar (2003) Inhibition of ultraviolet B-mediated activation of nuclear factor kappaB in normal human epidermal keratinocytes by green tea Constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Oncogene*. 22(7), 1035–1044.
- Amaro-Ortiz, A., J.C. Vanover, T.L. Scott, and J.A. D'Orazio (2013) Pharmacologic induction of epidermal melanin and protection against sunburn in a humanized mouse model. *J. Vis. Exp.* 79, e50670.
- Aziz, M.H., F. Afaq, N. Ahmad (2005a) Prevention of ultraviolet-B radiation damage by resveratrol in mouse skin is mediated via modulation in survivin. *Photochem. Photobiol.* 81(1), 25–31.
- Aziz, M.H., S. Reagan-Shaw, J. Wu, B.J. Longley, and N. Ahmad (2005b) Chemoprevention of skin cancer by grape constituent resveratrol: relevance to human disease? *FASEB J.* 19(9), 1193-1195.

- Back, J.H., Y. Zhu, A. Calabro, C. Queenan, A.S. Kim, J. Arbesman, and A.L. Kim (2012) Resveratrol-mediated downregulation of Rictor attenuates autophagic process and suppresses UV-induced skin carcinogenesis. *Photochem. Photobiol.* 88(5), 1165–1172.
- Barthelman, M., W.B. Bair, K.K. Stickland, W. Chen, B.N. Timmermann, S. Valcic, Z. Dong, and G.T. Bowden (1998) (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibition of ultraviolet B-induced AP-1 activity. *Carcinogenesis*. 19(12), 2201–2204.
- Bendová, H., J. Akrman, A. Krejčí, L. Kubáč, D. Jírová, K. Kejlová, H. Kolářová, M. Brabec, and M. Malý (2007) *In vitro* approaches to evaluation of Sun Protection Factor. *Toxicology in Vitro* 21, 1268–1275.
- Bhattacharya, S., and A.P. Sherje (2020) Development of resveratrol and green tea sunscreen formulation for combined photoprotective and antioxidant properties. *J. Drug. Deliv. Sci. Technol.* 60,102000.
- Birt, D.F., D. Mitchell, B. Gold, P. Pour and H.C. Pinch (1997) Inhibition of ultraviolet light induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by apigenin, a plant flavonoid. *Anticancer Res.* 17, 85–91.
- Casagrande, R., S.R. Georgetti, W.A. Verri, D.J. Dorta, A.C. dos Santos, and M.J. Fonseca (2006) Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. *J. Photochem. Photobiol. B.* 84(1), 21–27.
- Chan, W.H., C.C. Wu, and J.S. Yu (2003) Curcumin inhibits UV irradiation-induced oxidative stress and apoptotic biochemical changes in human epidermoid carcinoma A431 cells. *J. Cell Biochem.* 90(2), 327–338.
- Cho, B.O., D.N. Che, J.Y. Shin, H.J. Kang, J.H. Kim, H.Y. Kim, W.G. Cho, and S.I. Jang (2017) Ameliorative effects of *Diospyros lotus* leaf extract against UVB-induced skin damage in BALB/c mice. *Biomed. Pharmacother.* 95, 264–274.

- Cho, J.W., K. Park, G.R. Kweon, B.C. Jang, W.K. Baek, M.H. Suh, C.W. Kim, K.S. Lee, and S.I. Suh (2005) Curcumin inhibits the expression of COX-2 in UVB-irradiated human keratinocytes (HaCaT) by inhibiting activation of AP-1: p38 MAP kinase and JNK as potential upstream targets. *Exp. Mol. Med.* 37(3), 186–192.
- Choi, S.I., H.S. Han, J.M. Kim, G. Park, Y.P. Jang, Y.K. Shin, H.S. Ahn, S.H. Lee, and K.T. Lee (2021) *Eisenia bicyclis* extract repairs UVB-induced skin photoaging *in vitro* and *in vivo*: Photoprotective effects. *Mar. Drugs* 19(12), 693.
- Choquenot, B., C. Couteau, E. Paparis, and I.J. Coiffard (2008) Quercetin and rutin as potential sunscreen agents: Determination of efficacy by an *in vitro* method. *J. Nat. Prod.* 71, 1117–1118.
- Choquenot, B., C. Couteau, E. Paparis, and L.J. Coiffard (2009) Flavonoids and polyphenols, molecular families with sunscreen potential: determining effectiveness with an *in vitro* method. *Nat. Prod. Commun.* 4(2), 227–230.
- Das, S., J. Das, A. Paul, A. Samadder, A.R. Khuda-Bukhsh (2013) Apigenin, a bioactive flavonoid from *Lycopodium clavatum*, stimulates nucleotide excision repair genes to protect skin keratinocytes from ultraviolet B-induced reactive oxygen species and DNA damage. *J. Acupunct. Meridian Stud.* 6(5), 252–262.
- Diffey, B.L. (1994) A method for broad spectrum classification of sunscreens. *Int. J. Cosmet. Sci.* 16, 47–52.
- Diffey, B.L., and J. Robson (1989) A new substrate to measure sunscreen protection factors throughout the ultraviolet spectrum. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 40, 127–133.
- Diffey, B.L., P.M. Farr, and A.M. Oakley (1987) Quantitative studies on UVA-induced erythema in human skin. *Br. J. Dermatol.* 117(1), 57–66.

- Dornelles, S., J. Goldl, and T. Cestari (2004) Determination of the minimal erythema dose and colorimetric measurements as indicators of skin sensitivity to UVB radiation. *Photochem. Photobiol.* 79(6), 540–544.
- Elmets, C.A., D. Singh, K. Tubesing, M. Matsui, S. Katiyar, and H. Mukhtar (2001) Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. *J. Am. Acad. Dermatol.* 44(3), 425–432.
- Estévez-Castro, C.F., J.H. Serment-Guerrero, J.L. Fuentes (2018) Influence of the *uvrA*, *recJ* and *recN* gene mutations on the nucleoid reorganization in UV-treated *Escherichia coli* cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 365(11), fny110.
- European Commission. 2006. Commission Recommendation of 22 September 2006 on the efficacy of sunscreen products and the claims made relating thereto. *Off. J. Eur. Union* 265, 39–43.
- European Standard ISO 24444 (2010). Cosmetics - Sun protection test methods - *In vivo* determination of the sun protection factor (SPF) (ISO 24444:2010). European Committee for Standardization, ISO copyright office, Switzerland.
- Flórez-González, S.J., E.E. Stashenko, R.E. Ocazonez, M.P. Vinardell, and J.L. Fuentes (2024) *In vitro* safety assessment of extracts and compounds from plants as sunscreen ingredients. *Int. J. Toxicol.* (OnlineFirst). <https://doi.org/10.1177/10915818231225661>
- Food and Drug Administration (2011). Labeling and Effectiveness Testing; Sunscreen Drug Products for Over-the-Counter Human Use; Final Rule Federal Register, 21 CFR Parts 201 and 310 [Docket No. FDA–1978–N–0018-0698]; Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA): Silver Spring, MD, USA, 76(117), 35620–35665.

- Fuentes, J.L., A. Alonso, E. Cuétara, M. Vernhe, N. Alvarez, A. Sánchez-Lamar, and M. Llagostera (2006) Usefulness of the SOS Chromotest in the study of medicinal plants as radioprotectors. *Int. J. Radiat. Biol.* 82(5), 323–329.
- Fuentes, J.L., A. García-Forero, N. Quintero-Ruiz, C.A. Prada-Medina, N. Rey-Castellanos, D.A. Franco-Niño, D.A. Contreras-García, Y. Cordoba-Campo, and E.E. Stashenko (2017) The SOS Chromotest applied for screening plant antigenotoxic agents against ultraviolet radiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* 16 (9), 1424–1434.
- Fuentes, J.L., C.A. Pedraza-Barrera, D.A. Villamizar-Mantilla, S.J. Flórez-González, L.J. Sierra, R.E. Ocazonez, and E.E. Stashenko (2022) Flower extracts from ornamental plants as sources of sunscreen ingredients: Determination by *in vitro* methods of photoprotective efficacy, antigenotoxicity and safety. *Molecules* 27(17), 5525.
- Fuentes, J.L., D.A. Villamizar-Mantilla, S.J. Flores-González, L.A. Núñez, and E.E. Stashenko (2021) Plants growing in Colombia as sources of active ingredients for sunscreens. *Int. J. Radiat. Biol.* 97(12), 1705–1715.
- García-Bores, A.M., A.M. Espinosa-González, A. Reyna-Campos, S. Cruz-Toscano, J.C. Benítez-Flores, C.T. Hernández-Delgado, S. Flores-Maya, M. Urzúa-Meza, I. Peñalosa-Castro, C.L. Céspedes-Acuña, and J.G. Avila-Acevedo (2017) *Lippia graveolens* photochemopreventive effect against UVB radiation-induced skin carcinogenesis. *J. Photochem. Photobiol. B* 167, 72–81.
- García-Forero, A., D.A. Villamizar-Mantilla, L.A. Núñez, R.E. Ocazonez, E.E. Stashenko, and J.L. Fuentes (2019) Photoprotective and antigenotoxic effects of the flavonoids apigenin, naringenin and pinocembrin. *Photochem. Photobiol.* 95(4), 1010–1018.

- Gensler, H.L., B.N. Timmermann, S. Valcic, G. A. Wächter, R. Dorr, K. Dvorakova, and D.S. Alberts (1996) Prevention of photocarcinogenesis by topical administration of pure epigallocatechin gallate isolated from green tea. *Nutr. Cancer*. 26(3), 325–335.
- Gyöngyösi, N., K. Lőrincz, A. Keszeg, D. Haluska, A. Bánvölgyi, E. Tátrai, S. Kárpáti, and N.M. Wikonkál (2016) Photosensitivity of murine skin greatly depends on the genetic background: Clinically relevant dose as a new measure to replace minimal erythema dose in mouse studies. *Exp. Dermatol.* 25, 519–525.
- Harrison, G.A., and A.R. Young (2002) Ultraviolet radiation-induced erythema in human skin. *Methods* 28, 14–19.
- Heng, M.C. (2010) Curcumin targeted signaling pathways: basis for anti-photoaging and anti-carcinogenic therapy. *Int. J. Dermatol.* 49(6), 608–622.
- Herzog, B. (2002) Prediction of sun protection factors by calculation of transmissions with a calibrated step film model. *J. Cosmet. Sci.* 53(1), 11–26.
- Hirakawa S, Fujii S, Kajiya K, Yano K, Detmar M. (2005) Vascular endothelial growth factor promotes sensitivity to ultraviolet B-induced cutaneous photodamage. *Blood*. 105(6), 2392–2399.
- Hwang, Y.P., K.N. Oh, H.J. Yun, and H.G. Jeong (2011) The flavonoids apigenin and luteolin suppress ultraviolet A-induced matrix metalloproteinase-1 expression via MAPKs and AP-1-dependent signaling in HaCaT cells. *J. Dermatol. Sci.* 61(1), 23–31.
- Ikehata, H., S. Higashi, S. Nakamura, Y. Daigaku, Y. Furusawa, Y. Kamei, M. Watanabe, K. Yamamoto, K. Hieda, N. Munakata, and T. Ono (2013) Action spectrum analysis of UVR genotoxicity for skin: The border wavelengths between UVA and UVB can bring serious mutation loads to skin. *J. Invest. Dermatol.* 133, 1850–1856.

- Ishizaki, C., T. Oguro, T. Yoshida, C.Q. Wen, H. Sueki, and M. Iijima (1996) Enhancing effect of ultraviolet A on ornithine decarboxylase induction and dermatitis evoked by 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate and its inhibition by curcumin in mouse skin. *Dermatology*. 193(4), 311–317.
- Islami, F., A.G. Sauer, K.D. Miller, S.A. Fedewa, A.K. Minihan, A.C. Geller, J.L. Lichtenfeld, and A. Jemal (2020) Cutaneous melanomas attributable to ultraviolet radiation exposure by state. *Int. J. Cancer*. 147, 1385–1390.
- Jansen, R., U. Osterwalder, S.Q. Wang, M. Burnett, and H.W. Lim (2013) Photoprotection part II. Sunscreen: Development, efficacy, and controversies. *J. Am. Acad. Dermatol.* 69(6), 867.e1-e14.
- Kang, N.J., K.W. Lee, B.J. Shin, S.K. Jung, M.K. Hwang, A.M. Bode, Y.S. Heo, H.J. Lee, and Z. Dong (2009) Caffeic acid, a phenolic phytochemical in coffee, directly inhibits Fyn kinase activity and UVB-induced COX-2 expression. *Carcinogenesis*. 30(2), 321–330.
- Katiyar, S.K., and H. Mukhtar (2001b) Green tea polyphenol (2)-epigallocatechin-3-gallate treatment to mouse skin prevents UVB-induced infiltration of leukocytes, depletion of antigen-presenting cells, and oxidative stress. *J. Leukoc. Biol.* 69(5), 719–726.
- Katiyar, S.K., F. Afaq, A. Perez, and H. Mukhtar (2001a) Green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. *Carcinogenesis*. 22(2), 287–294.
- Katiyar, S.K., M.S. Matsui, C.A. Elmet, and H. Mukhtar (1999) Polyphenolic antioxidant (–)-epigallocatechin-3-gallate from green tea reduces UVB-induced inflammatory responses and infiltration of leukocytes in human skin. *Photochem. Photobiol.* 69(2), 148–153.
- Kaur, C.D., and S. Saraf (2010) *In vitro* sun protection factor determination of herbal oils used in cosmetics. *Pharmacogn. Res.* 2(1), 22–25.

- Kim, J., J.S. Hwang, Y.K. Cho, Y. Han, Y.J. Jeon, K.H. Yang, (2001) Protective effects of epigallocatechin-3-gallate on UVA and UVB-induced skin Damage. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 14, 11–19.
- Kitagawa, S., K. Yoshii, S.Y. Morita, and R. Teraoka (2011) Efficient topical delivery of chlorogenic acid by an oil-in-water microemulsion to protect skin against UV-induced damage. *Chem. Pharm. Bull.* 59(6), 793–796.
- Kong, S.Z., H.M. Chen, X.T. Yu, X. Zhang, X.X. Feng, X.H. Kang, W.J. Li, N. Huang, H. Luo, and Z.R. Su (2015) The protective effect of 18 β -glycyrrhetic acid against UV irradiation induced photoaging in mice. *Exp. Gerontol.* 61, 147–155.
- Lee C, Park GH, Ahn EM, Kim BA, Park CI, Jang JH. (2013) Protective effect of *Codium fragile* against UVB-induced pro-inflammatory and oxidative damages in HaCaT cells and BALB/c mice. *Fitoterapia.* 2013 86,54–63.
- Lee, K.M., K.W. Lee, S.K. Jung, E.J. Lee, Y.S. Heo, A.M. Bode, R.A. Lubet, H.J. Lee, and Z. Dong (2010) Kaempferol inhibits UVB-induced COX-2 expression by suppressing Src kinase activity. *Biochem. Pharmacol.* 80(12), 2042–2049.
- Lee, T.H., M.H. Do, Y.L. Oh, D.W. Cho, S.H. Kim, and S.Y. Kim (2014) Dietary fermented soybean suppresses UVB-induced skin inflammation in hairless mice via regulation of the MAPK signaling pathway. *J. Agric. Food Chem.* 62, 8962–8972.
- Lepley, D.M., and J.C. Pelling (1997) Induction of p21/WAF1 and G1 cell-cycle arrest by the chemopreventive agent apigenin. *Mol. Carcinog.* 19(2), 74–82.
- Lepley, D.M., B. Li, D.F. Birt, and J.C. Pelling (1996) The chemopreventive flavonoid apigenin induces G2/M arrest in keratinocytes. *Carcinogenesis.* 17(11), 2367–2375.
- Lu, Y.P., Lou, Y.R., Xie, J.G., Peng, Q.Y., Liao, J., Yang, C.S., Huang, M.T., & Conney, A.H. (2002). Topical applications of caffeine or epigallocatechin gallate (EGCG) inhibit

carcinogenesis and selectively increase apoptosis in UVB-induced skin tumors in mice.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(19), 12455–12460.

Lu, Y.P., Y.R. Lou, J.G. Xie, Q.Y. Peng, J. Liao, C.S. Yang, M.T. Huang, and A.H. Conney (2002)

Topical applications of caffeine or epigallocatechin gallate (EGCG) inhibit carcinogenesis and selectively increase apoptosis in UVB-induced skin tumors in mice. *PNAS* 99(19), 12455–12460.

Mansur, J.S., M.N. Rodrigues-Breder, M.C.A. Mansur, and R.D. Azulay (1986) Determinação do

fator de proteção solar por espectrofotometria. *An. Bras. Dermatol.* 61(3), 121–124.

Mansur, J.S., M.N. Rodrigues-Breder, M.C.A. Mansur, and R.D. Azulay (1986) Correlação entre

a determinação do factor de proteção solar em seres humanos e por espectrofotometria. *An. Bras. Dermatol.* 61(4), 167–172.

Martinez, R.M., F. Pinho-Ribeiro, V. Steffen, T. Silva, C. Caviglione, C. Bottura, M. Fonseca, F.

Vicentini, J. Vignoli, M. Baracat, S. Georgetti, W. Verri, and R. Casagrande (2016) Topical formulation containing naringenin: Efficacy against ultraviolet B irradiation-induced skin inflammation and oxidative stress in mice. *PLoS ONE* 11, e0146296.

McVean, M., H. Xiao, K. Isobe, and J.C. Pelling (2000) Increase in wild-type p53 stability and

transactivational activity by the chemopreventive agent apigenin in keratinocytes. *Carcinogenesis*. 21(4), 633–639.

Meeran, S.M., S.K. Mantena, and S.K. Katiyar (2006) Prevention of ultraviolet Radiation- induced

immunosuppression by epigallocatechin-3-gallate in mice is mediated through interleukin 12- dependent DNA Repair. *Clin. Cancer Res.* 12(7), 2272–2280.

Mirzoeva, S., X. Tong, B.B. Bridgeman, M.P. Plebanek, and O.V. Volpert (2018) Apigenin inhibits

UVB-induced skin carcinogenesis: The role of thrombospondin-1 as an anti-inflammatory factor. *Neoplasia* 20, 930–942.

- Mirzoeva, S., X. Tong, B.B. Bridgeman, M.P. Plebanek, and O.V. Volpert (2018) Apigenin inhibits UVB-induced skin carcinogenesis: The role of thrombospondin-1 as an anti-inflammatory factor. *Neoplasia*. 20(9), 930–942.
- Mittal, A., C. Piyathilake, Y. Hara, and S.K. Katiyar (2003) Exceptionally high protection of photocarcinogenesis by topical application of epigallocatechin-3-gallate in hydrophilic cream in SKH-1 hairless mouse model: Relationship to inhibition of UVB-induced global DNA hypomethylation. *Neoplasia*. 5(6), 555–565.
- Morley, N., T. Clifford, L. Salter, S. Campbell, D. Gould, and A. Curnow (2005) The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate and green tea can protect human cellular DNA from ultraviolet and visible radiation-induced damage. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed*. 21(1), 15–22.
- Morocho-Jácome, A.L., T.B. Freire, A.C. de Oliveira, T.S. de Almeida, C. Rosado, M.V. Robles-Velasco, and A. Rolim-Baby (2021) *In vivo* SPF from multifunctional sunscreen systems developed with natural compounds – A review. *J. Cosmet. Dermatol*. 20(3), 729–737.
- Nihal, M., N. Ahmad, H. Mukhtar, and G.S. Wood (2005) Anti-proliferative and proapoptotic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on human melanoma: Possible implications for the chemoprevention of melanoma. *Int. J. Cancer*. 114(4), 513–521.
- Oguro, T., and T. Yoshida (2001) Effect of ultraviolet A on ornithine decarboxylase and metallothionein gene expression in mouse skin. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed*. 17(2), 71–78.
- Osterwalder, U., and B. Herzog (2009) Sun protection factors: world-wide confusion. *Br. J. Dermatol*. 161(Suppl 3), 13-24.
- Pelizzo, M., E. Zattra, P. Nicolosi, A. Peserico, D. Garoli, and M. Alaibac (2012) *In vitro* evaluation of sunscreens: An update for the clinicians. *ISRN Dermatol*. 2012, 1–4.

- Phillips, J., T. Moore-Medlin, K. Sonavane, O. Ekshyyan, J. McLarty, and C.A. Nathan (2013) Curcumin inhibits UV radiation-induced skin cancer in SKH-1 mice. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 148(5), 797–803.
- Pissavini, M., L. Ferrero, V. Alard, U. Heinrich, H. Tronnier, D. Kockott, D. Lutz, V. Tournier, M. Zambonin, and M. Meloni (2003) Determination of the *in vitro* SPF. *Cosmet. Toilet.* 118(10), 63–72.
- Polonini, H.C., L.L. Lima, K.M. Golçalves, A.M.R. do Carmo, A.D. da Silva, and N.R.B. Raposo (2013) Photoprotective activity of resveratrol analogues. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 964–968.
- Poon, T.S., J.M. Kuchel, A. Badruddin, G.M. Halliday, R.S. Barnetson, H. Iwaki, and M. Hatao (2003) Objective measurement of minimal erythema and melanogenic doses using natural and solar-simulated light. *Photochem. Photobiol.* 78(4), 331–336.
- Prasad, N.R., K. Jeyanthimala, and S. Ramachandran (2009) Caffeic acid modulates ultraviolet radiation-B induced oxidative damage in human blood lymphocytes. *J. Photochem. Photobiol. B.* 95(3), 196–203.
- Quillardet, P., O. Huisman, R. D'ari, and M. Hofnung (1982) SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5971–5975.
- Quintero-Ruiz, N., Y. Cordoba-Campo, E.E. Stashenko, and J.L. Fuentes (2017) Antigenotoxicity effect against ultraviolet radiation-induced DNA damage of the essential oils from *Lippia* species. *Photochem. Photobiol.* 93(4), 1063-1072.
- R Core Team 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (<http://www.R-project.org>).

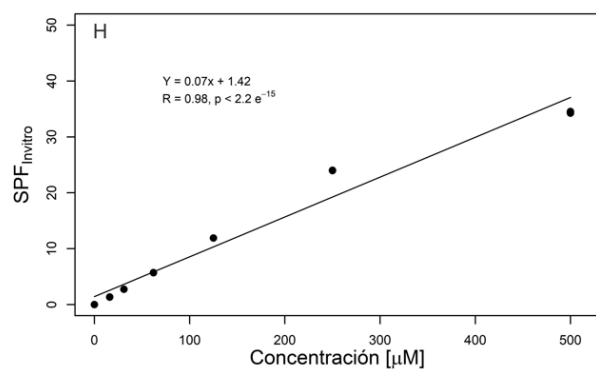
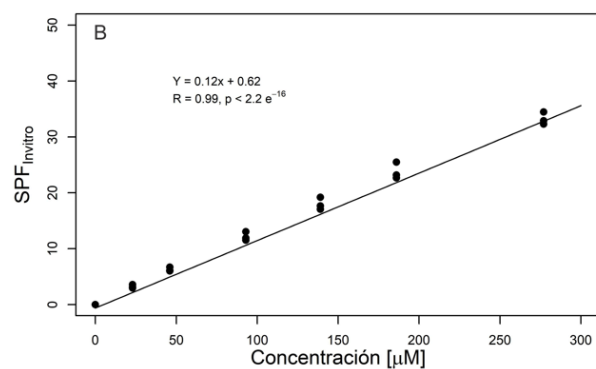
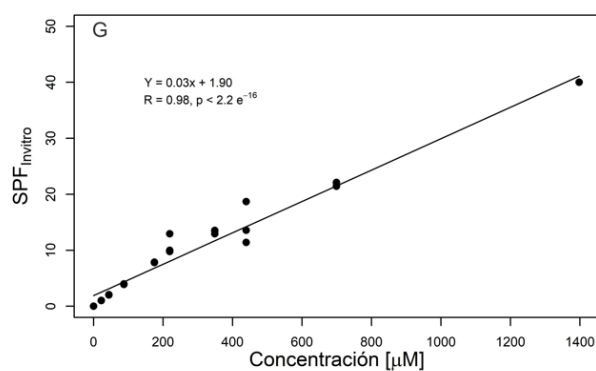
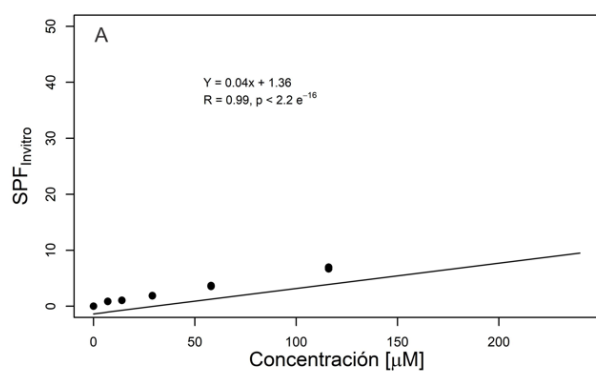
- Reagan-Shaw, S., F. Afaq, M.H. Aziz, and N. Ahmad (2004) Modulations of critical cell cycle regulatory events during chemoprevention of ultraviolet B-mediated responses by resveratrol in SKH-1 hairless mouse skin. *Oncogene*. 23(30), 5151–5160.
- Saija, A., A. Tomaino, D. Trombetta, A. De Pasquale, N. Uccella, T. Barbuzzi, D. Paolino, and F. Bonina (2000) *In vitro* and *in vivo* evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. *Int. J. Pharm.* 199(1), 39–47.
- Saija, A., A. Tomaino, R. Lo Cascio, D. Trombetta, A. Proteggente, A. De Pasquale, N. Uccella, and F. Bonina (1999) Ferulic and caffeic acids as potential protective agents against photooxidative skin damage. *J. Sci. Food Agric.* 79(3), 476–480.
- Sayre, R.M., P.P. Agin, G.J. LeVee, and E. Marlowe (1979) A comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of sunscreens formulas. *Photochem. Photobiol.* 29, 559–566.
- Schmalwieser, A.W., S. Wallisch, and B. Diffey (2012) A library of action spectra for erythema and pigmentation. *Photochem. Photobiol. Sci.* 11, 251–268.
- Schwarz, A., A. Maeda, K. Kernebeck, H. van Steeg, S. Beissert, and T. Schwarz (2005) Prevention of UV radiation-induced immunosuppression by IL-12 is dependent on DNA repair. *J. Exp. Med.* 201(2), 173–179.
- Serafini, M.R., C.B. Detoni, P.P. Menezes, R.N. Pereira-Filho, V.S. Fortes, M.J. Vieira, S.S. Guterres, R.L. Cavalcanti de Albuquerque, and A.A. Araújo (2014) UVA-UVB photoprotective activity of topical formulations containing *Morinda citrifolia* extract. *Biomed. Res. Int.* .2014, 587819.
- Sheng, Y.Y., J. Xiang, J.L. Lu, J.H. Ye, Z.J. Chen, J.W. Zhao, Y.R. Liang, and X.Q. Zheng (2022) Protective effects of gallic acid against ultraviolet B induced skin damages in hairless mice. *Sci. Rep.* 12, 1310.

- Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal (2019) Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J. Clin.* 69, 7–34.
- Springsteen, A., R. Yurek, M. Frazier, and K.F. Carr (1999) *In vitro* measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance. *Anal. Chim. Acta* 380(2–3), 155–164.
- Stanfield, J., U. Osterwalder, and B. Herzog (2010) *In vitro* measurements of sunscreen protection. *Photochem. Photobiol. Sci.* 9(4), 489–494.
- Stevanato, R., M. Bertelle, and S. Fabris (2014) Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 69(1), 71–77.
- Tong, X., R.T. Van Dross, A. Abu-Yousif, A.R. Morrison, and J.C. Pelling (2007) Apigenin Prevents UVB-Induced Cyclooxygenase 2 Expression: Coupled mRNA Stabilization and Translational Inhibition, *Mol. Cell. Biol.* 27(1), 283–296.
- Valbuena, M.C., J.A. Nova-Villanueva, and G. Sánchez-Vanegas (2020) Minimal Erythema Dose: Correlation with Fitzpatrick skin type and concordance between methods of erythema assessment in a patient sample in Colombia. *Actas Dermosifiliogr.* 111(5), 390–397.
- van Dross, R.T., X. Hong, S. Essengue, S.M. Fischer, and J.C. Pelling (2007) Modulation of UVB-induced and basal cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by apigenin in mouse keratinocytes: role of USF transcription factors. *Mol. Carcinog.* 46(4), 303–314.
- Vicentini, F.T., T. He, Y. Shao, M.J. Fonseca, W.A. Verri, G.J. Fisher, and Y. Xu (2011) Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF-κB pathway. *J. Dermatol. Sci.* 61(3), 162–168.
- Vink, A.A., and L. Roza (2001) Biological consequences of cyclobutane pyrimidine dimers. *J. Photochem. Photobiol. B.* 65(2-3), 101–104.
- Wan, S., J.A. Parrish, and K.F. Jaenicke (1983) Quantitative evaluation of ultraviolet induced erythema. *Photochem. Photobiol.* 37(6), 643–648.

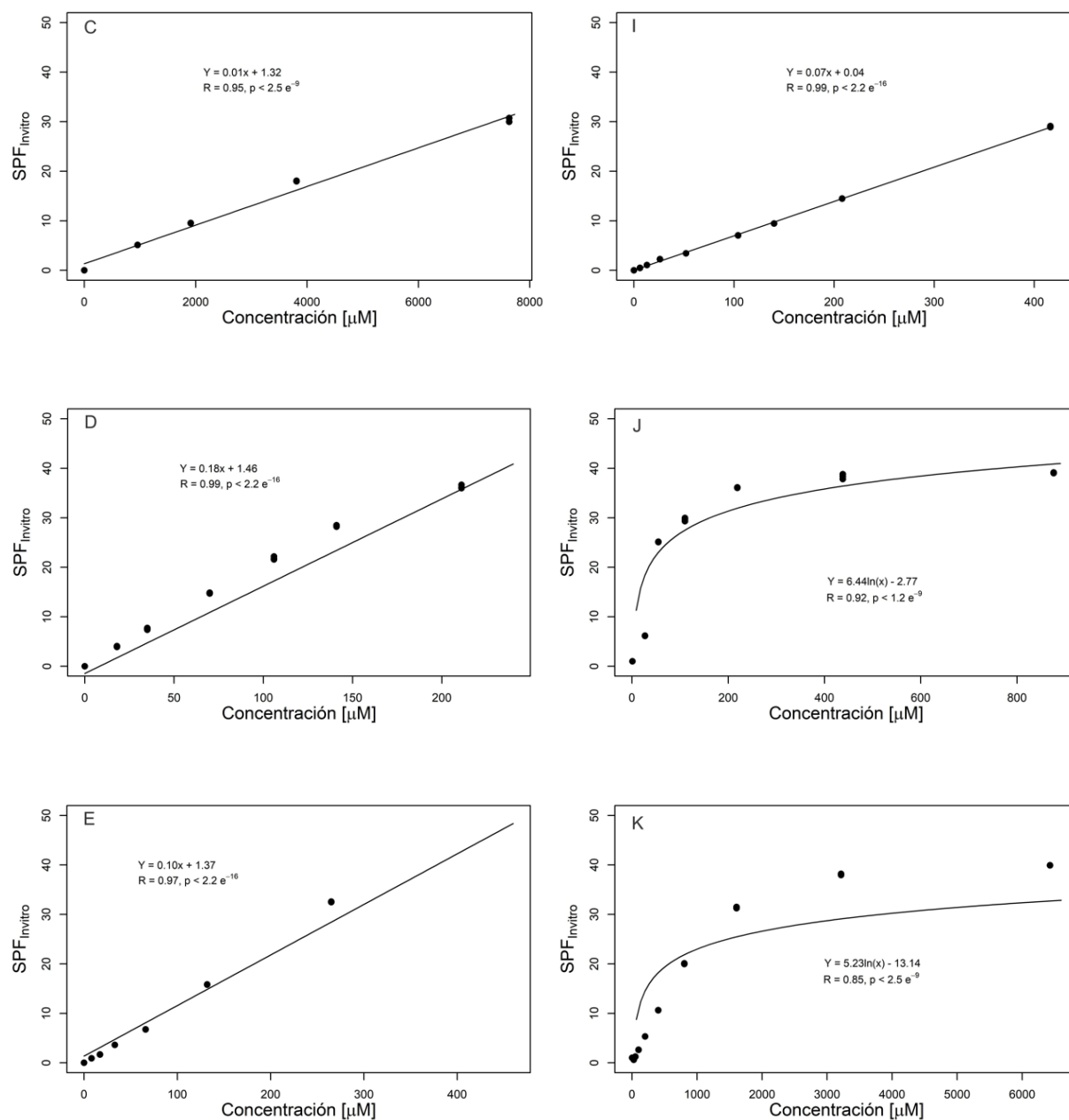
- Wang, Y.Y., C.T. Hong, W.T. Chiu, and J.Y. Fang (2001) *In vitro* and *in vivo* evaluations of topically applied capsaicin and nonivamide from hydrogels. *Int. J. Pharm.* 224(1–2), 89–104.
- Yang, S.I., S. Liu, G.J. Brooks, Y. Lanctot, and J.V. Gruber (2018) Reliable and simple spectrophotometric determination of sun protection factor: A case study using organic UV filter-based sunscreen products. *J. Cosmet. Dermatol.* 17(3), 518–522.
- Young, A.R., G.I. Harrison, C.A. Chadwick, O. Nikaido, J. Ramsden, and C.S. Potten (1998) The similarity of action spectra for thymine dimers in human epidermis and erythema suggests that DNA is the chromophore for erythema. *J. Invest. Dermatol.* 111, 982–988.
- Young, A.R., J. Claveau, and A.B. Rossi (2017) Ultraviolet radiation and the skin: Photobiology and sunscreen photoprotection. *J. Am. Acad. Dermatol.* 76(3), S100–S109.

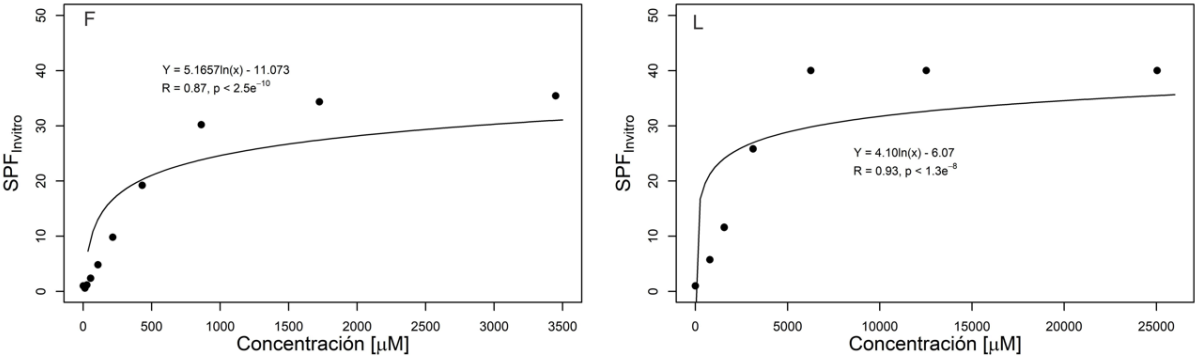
Apéndices

Apéndice A Correlaciones entre la eficacia de protección UVB ($SPF_{\text{espectrofotométrico}}$) y la concentración del compuesto. También se proporcionó la función de mejor ajuste para cada compuesto. A – Apigenina. B – Ácido cafeico. C – trans- β -cariofileno. D – Ácido clorogénico. E – Curcumina. F – EGCG. G – kaempferol. H – Pinocembrina. I – Quercitina. J – Resveratrol. K – Escualeno. L – Dióxido de titanio.

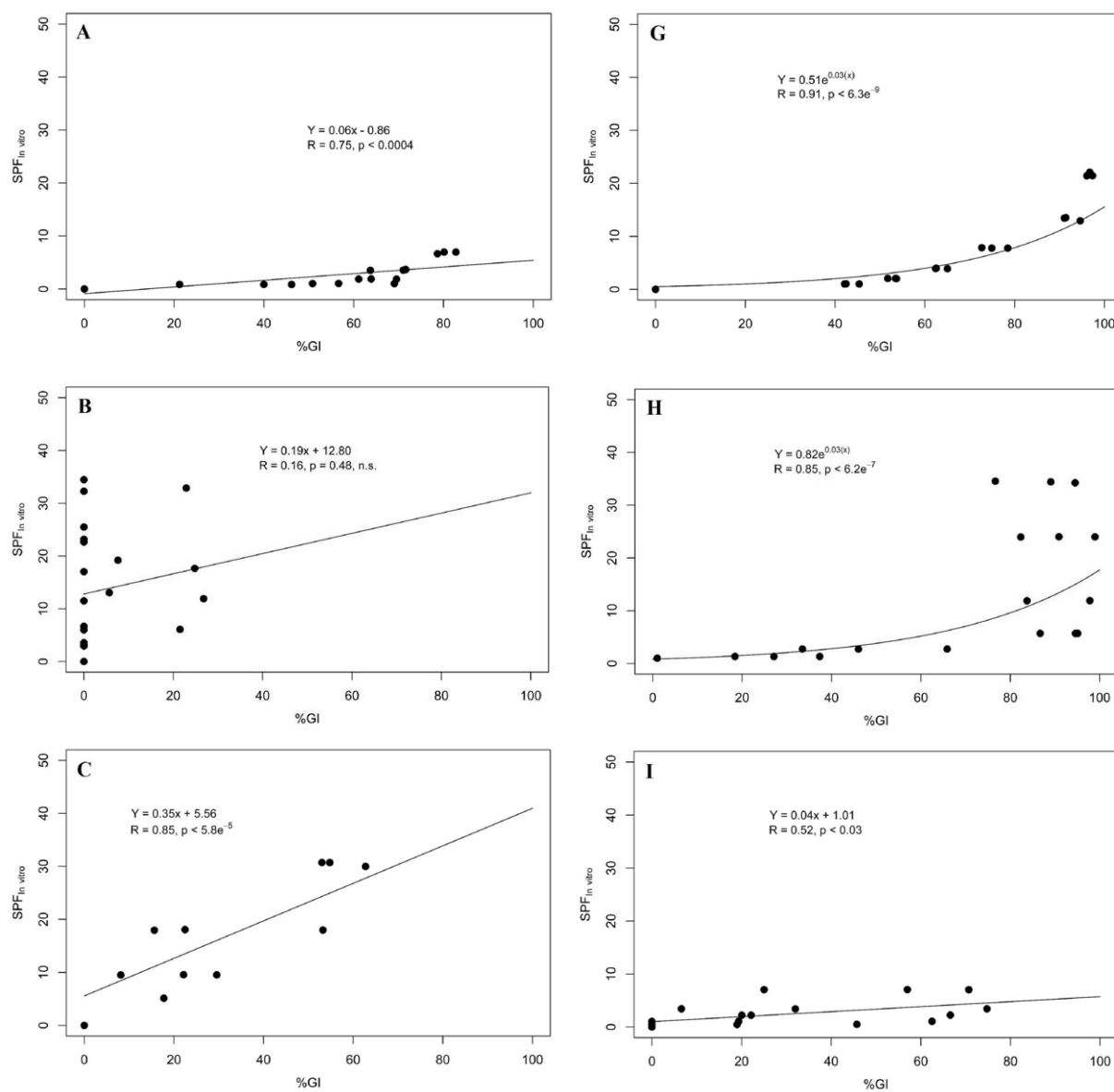


EFICACIA FOTOPROTECTORA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL





Apéndice B Correlaciones entre la eficacia de protección UVB ($SPF_{\text{espectrofotométrico}}$) y el porcentaje de inhibición a la antigenotoxicidad (%GI) de los compuestos. También se proporcionó la función de mejor ajuste para cada compuesto. A – Apigenina. B – Ácido cafeico. C – trans- β -cariofileno. D – Ácido clorogénico. E – Curcumina. F – EGCG. G – kaempferol. H – Pinocembrina. I – Quercitina. J – Resveratrol. K – Escualeno. L – Dióxido de titanio.



EFICACIA FOTOPROTECTORA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL

