

Citotoxicidad y genotoxicidad en fibroblastos humanos de extractos y constituyentes
vegetales promisorios en fotoprotección

Silvia Juliana Flórez González

Trabajo de Grado Presentado como Requisito
para Optar al Título de Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas

Director

Jorge Luis Fuentes Lorenzo

Microbiólogo, M.Sc., Ph.D.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Medicina

Bucaramanga

2023

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	9
1. HIPÓTESIS.....	11
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo general.....	12
2.2. Objetivos específicos	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1. Material vegetal y sus extractos.....	12
3.2. Reactivos, tampones, enzimas y medios de cultivo	15
3.3. Evaluación de la citotoxicidad en fibroblastos humanos	15
3.4. Establecimiento del ensayo cometa en fibroblastos humanos usando la plataforma trevigen cometchip®.....	17
3.5. Evaluación de la genotoxicidad de las muestras en fibroblastos humanos.....	20
3.6. Análisis estadístico.....	21
4. RESULTADOS.....	21

4.1.	Citotoxicidad de los extractos de plantas en fibroblastos humanos.....	21
4.2.	Citotoxicidad de los compuestos mayoritarios en fibroblastos humanos	25
4.3.	Establecimiento del ensayo cometa en fibroblastos humanos usando la plataforma trevigen cometchip®.....	28
4.4.	Genotoxicidad de los extractos de plantas en fibroblastos humanos	33
4.5.	Genotoxicidad de los compuestos de plantas en fibroblastos humanos	35
5.	DISCUSIÓN	36
6.	CONCLUSIONES	46
7.	AGRADECIMIENTOS	48
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
9.	APÉNDICES.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Lista de las especies de plantas que crecen en Colombia que presentan propiedades fotoprotectoras/antigenotóxicas.	14
Tabla 2. Concentraciones citotóxicas 50% (CC ₅₀) y 30% (CC ₃₀) en fibroblastos humanos (MRC5) para los extractos de planta evaluados	24
Tabla 3. Concentraciones citotóxicas 50% (CC ₅₀) y 30% (CC ₃₀) en fibroblastos humanos (MRC5) para los compuestos evaluados.....	28
Tabla 4. Genotoxicidad de los extractos de flores y del disolvente usado (metanol) en células de fibroblastos humanos MRC5.....	33
Tabla 5. Genotoxicidad de compuestos promisorios células de fibroblastos humanos MRC5.	35
Tabla 6. Reportes previos sobre la toxicidad de los compuestos fitoquímicos estudiados.	42

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Metodologías utilizadas para el ensayo cometa.	20
Figura 2. Respuesta de células de fibroblastos humanos durante el ensayo de exclusión con azul de tripano observadas en la cámara de Neubauer.	22
Figura 3. Citotoxicidad de extractos de plantas en fibroblastos humanos (MRC5).....	22
Figura 4. Citotoxicidad de compuestos vegetales en fibroblastos humanos (MRC5).	26
Figura 5. Registros fotográficos de los Cometas producidos con las dos metodologías para los diferentes tratamientos.	29
Figura 6. Valores de daño genético (GDI) obtenidos en las curvas dosis-respuesta.	32

ÍNDICE DE APÉNDICES

Apéndice A. Citotoxicidad del filtro estándar (dióxido de titanio) y mutágeno de referencia (4NQO) en fibroblastos humanos (MRC5). Para su mejor comprensión, se delimitan tres zonas con base en el grado de citotoxicidad: Alta (rojo), media (amarilla) y baja (verde).	67
Apéndice B. Curva de citotoxicidad frente a genotoxicidad en fibroblastos humanos (MRC5) del mutágeno estándar 4-nitro-quinolina-N-óxido.....	68
Apéndice C. Propiedades terapéuticas y/o farmacológicas descritas para los compuestos fitoquímicos estudiados.	69

Resumen

Título: Citotoxicidad y genotoxicidad en fibroblastos humanos de extractos y constituyentes vegetales promisorios en fotoprotección *

Autor: Silvia Juliana Flórez González **

Palabras clave: Citotoxicidad, genotoxicidad, tinción azul de tripano, ensayo Cometa, fibroblastos humanos, fitoquímicos.

Descripción: Se investigó la inocuidad de extractos y compuestos vegetales obtenidos de plantas que crecen en Colombia y que han mostrado previamente propiedades como filtro solar y antígenotóxicas. La citotoxicidad y genotoxicidad de los extractos y compuestos se estudiaron en fibroblastos humanos mediante el ensayo de exclusión con azul de tripano y una plataforma de alto rendimiento CometChip® (microplaca de 96 pocillos), respectivamente. Adicionalmente se realizó una comparación entre el método tradicional de Cometa (láminas) vs. la plataforma CometChip®. Los extractos de las especies *Salvia aratocensis*, *Psidium sartorianum*, *Piper eriopodon* y *Calycolpus moritzianus* resultaron citotóxicos a todas las concentraciones ensayadas. Los valores restantes de CC₅₀ fueron: *Lippia organoides* (89 µg/mL), *Achyrocline satureioides* (173 µg/mL), *Chromolaena pellia* (184 µg/mL), *Ipomoea horsfalliae* (398 µg/mL), *Rosa centifolia* rosada (492 µg/mL) y *Rosa centifolia* roja (702 µg/mL). El extracto *Posoqueria latifolia* no mostró citotoxicidad en las concentraciones evaluadas. A concentraciones no citotóxicas, solo los extractos de *I. horsfalliae* (187,5 µg/mL) y *R. centifolia* (375,0 µg/mL) fueron significativamente genotóxicos. El compuesto *trans*-β-cariofileno resultó citotóxico en todo el rango de concentración ensayado. Los valores de CC₅₀ restantes fueron: curcumina (11 µM), resveratrol (91 µM), pinocembrina (144 µM), ácido dicafeoilquinico (147 µM), quercetina (222 µM), apigenina (226 µM), naringenina (272 µM), ácido clorogénico (273 µM), ácido cafeico (500 µM), kaempferol-3-glucósido (676 µM). Los compuestos escualeno y kaempferol no mostraron citotoxicidad a las concentraciones evaluadas. A concentraciones no citotóxicas, ninguno de los compuestos ensayados mostró genotoxicidad. Mostramos que los extractos de plantas y sus compuestos mayoritarios pueden ser citotóxicos en fibroblastos humanos, y algunos extractos también genotóxicos; evidenciando la necesidad de establecer concentraciones seguras de estos extractos para su potencial uso en cosmética. Igualmente, la plataforma CometChip® permitió una mejor tipificación del daño genético e incrementó en 40 veces la capacidad de escrutinio del ensayo, respecto al método tradicional.

*Tesis de Grado

**Escuela de Medicina. Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander. Director: Jorge L. Fuentes Lorenzo. Microbiólogo Ph.D.

Abstract

Title: Cytotoxicity and genotoxicity in human fibroblasts of promising plant extracts and constituents in photoprotection.

Author: Silvia Juliana Flórez González

Key words: Cytotoxicity, genotoxicity, trypan blue stain, Comet assay, human fibroblasts, phytochemicals.

Description: In this work, the safety of plant extracts and compounds obtained from plants growing in Colombia that have previously shown sunscreen and antigenotoxic properties was investigated. Plant extracts and compounds cytotoxicity and genotoxicity were studied in human fibroblasts using the trypan blue exclusion assay and a CometChip® high-throughput platform (96-well microplate), respectively. Additionally, a comparison was made between the traditional Comet method (slides) vs. the CometChip® platform. The extracts from *Salvia aratocensis*, *Psidium sartorianum*, *Piper eriopodon* and *Calycolpus moritzianus* species were cytotoxic at all concentrations tested. The remaining extracts showed CC₅₀ values as follows: *Lippia origanoides* (89 µg/mL), *Achyrocline satureioides* (173 µg/mL), *Chromolaena pellia* (184 µg/mL), *Ipomoea horsfalliae* (398 µg/mL), *Rosa centifolia* fuchsia (492 µg/mL) y *Rosa centifolia* red (702 µg/mL). *Posoqueria latifolia* extract showed no cytotoxicity at the concentrations evaluated. At non-cytotoxic concentrations, only the extracts of *I. horsfalliae* (187.5 µg/mL) and *R. centifolia* (375.0 µg/mL) were significantly genotoxic. The compound trans-β-Caryophyllene was cytotoxic throughout the concentration range tested. On the other hand, the remaining compounds showed CC₅₀ values as follows: curcumin (11 µM), resveratrol (91 µM), pinocembrin (144 µM), dicaffeoylquinic acid (147 µM), quercetin (222 µM), apigenin (226 µM), naringenin (272 µM), chlorogenic acid (273 µM), caffeic acid (500 µM), kaempferol-3-glucoside (676 µM). The compounds squalene and kaempferol did not show cytotoxicity at the concentrations evaluated. At non-cytotoxic concentrations, none of the pure compounds tested showed genotoxicity. Our study showed that certain plant extracts and their major compounds exhibit cytotoxicity and genotoxicity in human fibroblasts; evidencing the need to establish safe concentrations of these extracts for their potential use in cosmetics. Similarly, the CometChip® platform allowed a better typing of genetic damage and increased the screening capacity of the assay by 40 times compared to the traditional method developed on slides.

*Thesis Project.

**Faculty of Health, Program of Medicine. Universidad Industrial de Santander. Director: Jorge

L. Fuentes Lorenzo. Microbiologist Ph.D.

Introducción

Las plantas son ampliamente utilizadas como materia prima para la industria cosmética (Mileva et al., 2021). El uso extensivo de plantas como remedios ha demostrado que no son tan seguras como se afirmaba con frecuencia en el pasado (Capasso et al., 2000; Fennell et al., 2004; Fimognari et al., 2012; J. Zhou et al., 2013). Estas pueden producir una variedad de efectos tóxicos, incluido el daño genotóxico (por ejemplo, aductos de ADN, roturas de cadenas de ADN, enlaces cruzados de proteínas de ADN, rotura cromosómica, etc.) en los núcleos de las células (Prinsloo et al., 2018). Por lo tanto, es esencial estudiar los efectos adversos de los extractos y componentes de las plantas antes de que sean utilizadas como fuente de ingredientes cosméticos.

En la unión europea se han implementado diferentes estándares, guías o procedimientos que utilizan pruebas de seguridad de ingredientes cosméticos (p. ej., colorantes, conservantes, filtros UV) libres de animales (Kim et al., 2021; Pauwels & Rogiers, 2010; Pfuhler et al., 2014; Vinardell, 2015; Vinardell & Mitjans, 2017). Estos estándares requieren el uso de ensayos de genotoxicidad *in vitro* que proporcionen información sobre criterios relevantes de valoración genética, como mutagenicidad, clastogenicidad y aneugenicidad (Pfuhler et al., 2010). Según nuestro conocimiento, no existe un estándar para las pruebas de seguridad de los fitoquímicos utilizados como ingredientes cosméticos. No obstante, los ensayos de genotoxicidad más utilizados para probar fitoquímicos son aquellos recomendados por las agencias reguladoras (Sponchiado et al., 2016).

El ensayo Cometa (Singh et al., 1988), se encuentra entre los métodos más utilizados para evaluar la clastogenicidad de plantas medicinales (Sponchiado et al., 2016), y recientemente, se propuso como una prueba de genotoxicidad de productos farmacéuticos (Frötschl, 2015). Brevemente, las células son embebidas en agarosa sobre una lámina de microscopio y se lisan con detergentes o enzimas; y la alta concentración de sal usada, permite formar nucleoides que contienen bucles de ADN superenrollados unidos a la matriz nuclear. Cuando se rompe el ADN, la electroforesis a pH alcalino da como resultado estructuras similares a cometas que se tiñen y se observan al microscopio. La intensidad de la cola del cometa con respecto a la cabeza refleja el número de roturas de ADN. La razón de ser de los cometas es que los bucles de ADN que contienen una ruptura pierden su estructura superenrollada, se relajan y migran hacia el ánodo (Collins, 2004). El uso de una plataforma de alto rendimiento (microplacas de 96 pocillos) ha aumentado notablemente la capacidad general, la reproducibilidad y la solidez del ensayo del cometa (Ge et al., 2015; Gutzkow et al., 2013; Sykora et al., 2018).

Recientemente se ha demostrado que las plantas que crecen en Colombia tienen propiedades como filtro UV y antígenotóxicas (Fuentes et al., 2021, 2022); por lo tanto, estas podrían usarse como ingredientes de cosméticos que nos protegen de la radiación solar. Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar la citotoxicidad y la genotoxicidad de extractos de estas plantas prometedoras, y de sus compuestos mayoritarios disponibles comercialmente, en células de fibroblastos humanos utilizando la plataforma de alto rendimiento CometChip®. Aquí, mostramos que los extractos de las plantas estudiadas son principalmente citotóxicos en células de fibroblastos humanos, y en algunos casos genotóxicos, dependiendo de su concentración. Además, se evidenció la necesidad de realizar pruebas de genotoxicidad en las plantas potencialmente útiles

en cosmética; así como, de establecer las concentraciones seguras de estos fitoquímicos para su potencial uso.

1. Hipótesis

Ha: Los extractos de plantas y sus constituyentes no son citotóxicos ni genotóxicos en fibroblastos humanos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Evaluar la inocuidad de extractos y compuestos promisorios de plantas colombianas con potencial uso en cosmética en fibroblastos humanos.

2.2. Objetivos específicos

- Evaluar la citotoxicidad de los extractos de plantas y compuestos promisorios en fibroblastos humanos.
- Establecer el ensayo Cometa en una plataforma de alto rendimiento CometChip para la detección de genotoxicidad en fibroblastos humanos.
- Determinar la genotoxicidad de los extractos de plantas y compuestos promisorios en fibroblastos humanos.

3. Materiales y métodos

3.1. Material vegetal y sus extractos

Se estudiaron 12 extractos obtenidos de 10 especies de plantas que crecen en Colombia que presentan propiedades fotoprotectoras/antigenotóxicas (Tabla 1). Todos los especímenes vegetales fueron colectados en el marco de un permiso de colecta (Contrato No. 270) otorgado por

el “Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible” de Colombia; excepto por las variedades comerciales de *Rosa centifolia*, las cuales fueron suministradas por Flexport - Colombia S.A.S. (Bogotá, Cundinamarca, Colombia). Los extractos de las especies *Achyrocline satureioides*, *Calycolpus moritzianus*, *Chromolaena pellia*, *Lippia origanoides*, *Piper eriopodon*, *Psidium sartorianum* y *Salvia aratocensis*, fueron obtenidos mediante extracción de fluidos (CO₂) supercríticos a partir de sus tallos y hojas (Fuentes et al., 2021). Los extractos de *Ipomoea horsfalliae*, *Posoqueria latifolia* y *Rosa centifolia* fueron obtenidos mediante extracción por solvente (etanol) a partir de flores (Sierra et al., 2020). Todos los extractos fueron suministrados por el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinas Tropicales (CENIVAM) y almacenados a -80 °C en un ultracongelador Thermo Scientific® Series-86 DEG C (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Antes de su uso, los extractos se descongelaron y se refrigeraron (5-8 °C) durante 24 horas.

Tabla 1.

Lista de las especies de plantas que crecen en Colombia que presentan propiedades fotoprotectoras/antigenotóxicas.

Familia	Especie (voucher)	(CHN	Localidad (Departamento)	Cantidad relativa (%) de los compuestos en los extractos de plantas
Asteraceae	<i>Achyrocline satureioides</i> (COL579420)		Zapatoca (Santander)	<i>trans</i> - β -Cariofileno (25,0), óxido de cariofileno (13,4), γ -Muuroleno (8,9), γ -Cadineno (7,5), α - Pineno (7,4)
	<i>Chromolaena pellia</i> (COL559437)		Los Santos (Santander)	α -Amirina (22,0), escualeno (18,5), non-identified sesquiterpenol (11,6), <i>trans</i> - β -cariofileno (8,1), óxido de cariofileno (5,3)
Convolvulaceae	<i>Ipomoea horsfalliae</i> (COL587134)		Bucaramanga (Santander)	Ácido dicafeoilquínico (60,1), ácido clorogénico (13,7), escopoletina (15,1)
Labiatae	<i>Salvia aratocensis</i> (COL560246)		Los Santos (Santander)	τ -Cadinol (31,6), 1,10- <i>epi</i> -cubenol (13,4), β -eudesmol (5,4)
Myrtaceae	<i>Calycolpus moritzianus</i> (COL578360)		Zapatoca (Santander)	<i>trans-trans</i> -Geranil linalool (45,4), estigmast-4-en-3-ona (5,7)
	<i>Psidium sartorianum</i> (COL578359)		Zapatoca (Santander)	Ácido elágico (23,1), Elagitaninos (8,1), derivados de flavonas (8,1), myricetin-3- <i>O</i> -pentoside B (5,4), myricetin-3- <i>O</i> -pentoside A (5,3), ácido gálico (5,0)
Piperaceae	<i>Piper eriopodon</i> (COL578364)		Zapatoca (Santander)	Compuesto no identificado (16,0), fitol (7,6) β -eudesmol (5,9)
	<i>Piper eriopodon</i> (COL578974)-F2		Tame (Arauca)	Compuesto no identificado (16,0), fitol (7,6) β -eudesmol (5,9)
Rosaceae	<i>Rosa x centifolia</i> (variedad rosada)		Bogotá (Cundinamarca)	Quercetina (32,3), kaempferol (29,1), kaempferol-3-glucósido (13,1), kaempferol-ramnósido (12,7), quercetina-3-ramnósido (9,8)
	<i>Rosa x centifolia</i> (variedad fuchsia)		Bogotá (Cundinamarca)	Quercetina (38,1), kaempferol (15,3), kaempferol-3-glucósido (12,3), cianidina-3,5-glucósido (10,2), quercetina-3-ramnósido (9,6), kaempferol-ramnósido (6,9), quercetina-glucósido (5,1)
Rubiaceae	<i>Posoqueria latifolia</i> (COL512080)		Bucaramanga (Santander)	<i>trans</i> -Resveratrol- diglucósido (49,9), <i>cis</i> -resveratrol- diglucósido (25,0), ecdisterona (11,4), ácido clorogénico (6,2)
Verbenaceae	<i>Lippia origanoides</i> (COL560259)		Los Santos (Santander)	Pinocembrina (54,9), <i>trans</i> - β -cariofileno (10,9), carvacrol (6,3), <i>p</i> -cimeno (6,2)

Nota. Solo se presentaron los componentes cuya cantidad relativa fue superior al 5% en el extracto vegetal. **CHN**: Herbario Nacional Colombiano.

3.2. Reactivos, tampones, enzimas y medios de cultivo

Los 13 compuestos vegetales (ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido dicafeoilquínico, apigenina, β -cariofileno, curcumina, escualeno, kaempferol, kaempferol-3-glucósido, naringenina, pinocembrina, quercetina, resveratrol), el filtro estándar dióxido de titanio, el mutágeno estándar 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO), la solución de azul de tripano (0,4%), la proteinasa K liofilizada y la agarosa de alta resolución se obtuvieron de Sigma-Aldrich Co. Inc. (Milwaukee, WI, USA). La solución de YOYO fue adquirida de (Thermo Scientific, MA, USA). El medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), el suero fetal bovino (FBS), tampón fosfato salino (PBS), la solución de tripsina EDTA y la mezcla de antibióticos (penicilina/estreptomicina), fueron adquiridos de Gibco (Grand Island, Nueva York, USA). Los restantes reactivos se obtuvieron de las casas comerciales J.T. Baker (Phillipsburg, Nueva Jersey, USA) o Merck (Kenilworth, Nueva Jersey, USA).

Las soluciones stock de los compuestos vegetales se prepararon en metanol o DMSO dependiendo de su solubilidad. A partir de estas soluciones, se prepararon las soluciones de trabajo para los ensayos. La solución stock del mutágeno estándar 4NQO se preparó en acetona. La solución stock de dióxido de titanio se preparó en metanol.

3.3. Evaluación de la citotoxicidad en fibroblastos humanos

La citotoxicidad de los extractos, compuestos vegetales, filtro estándar y mutágeno de referencia se evaluó en la línea celular de fibroblastos humanos MRC5 (Jacobs et al., 1970)

mediante el ensayo de exclusión con azul de tripano (Strober, 2015). Este ensayo permite evaluar la integridad de las membranas de los fibroblastos humanos los cuales hacen parte de la piel donde se aplican los protectores solares. Esta línea celular fue donada por el Departamento de Microbiología, del Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. Los fibroblastos se cultivaron en 5 mL de medio DMEM suplementado con 10% de SFB inactivado por calor y una mezcla de antibióticos (penicilina-estreptomicina) preparada al 1 %. Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ en una incubadora Midi 40 (Thermo Scientific, Marietta, OH, USA). Cada tres días, las células se cultivaron en medio fresco hasta alcanzar una confluencia del 80 %. Los cultivos celulares se mezclaron con cada extracto a concentraciones finales entre 62,5 y 750,0 µg/mL. Los compuestos vegetales, filtro estándar y mutágeno de referencia, se evaluaron a diferentes concentraciones dependiendo del rango de concentraciones con actividad fotoprotectora o mutagénica. Las células se incubaron bajo las condiciones indicadas anteriormente. Después de 24 horas, las células fueron tratadas con solución de tripsina EDTA, se colectaron por centrifugación a 2000 rpm durante 6 minutos, se disolvieron en tampón PBS (100 µL) y 10 µL de la suspensión celular se mezcló con el mismo volumen de azul tripano (0,4 %) para evaluar su integridad. Las células vivas y no viables (muertas) se contaron utilizando una cámara de Neubauer y un microscopio óptico Eclipse E200 (Nikon Instruments Inc. NY, USA). Se realizaron al menos tres experimentos independientes para cada tratamiento. Los resultados se expresaron como porcentajes de viabilidad celular (%CV) de la siguiente manera: $\%CV = (\text{Células vivas}) / (\text{Células totales}) \times 100$. Se estimaron concentraciones citotóxicas 50% (CC₅₀) y 30% (CC₃₀) para cada muestra mediante interpolación gráfica (Ara et al., 2009). Dicho método permite calcular concentraciones citotóxicas desconocidas a partir de valores de citotoxicidad correspondientes a concentraciones superiores e inferiores ensayadas. Los valores de CC₅₀ y CC₃₀

se consideraron concentraciones citotóxicas y no citotóxicas limítrofes, respectivamente. Es decir, los extractos y compuestos vegetales fueron citotóxicos a valores $\geq CC_{50}$ (50% de letalidad celular) y no citotóxicos a valores $\leq CC_{30}$ (30% de letalidad celular); esto, considerando que los ensayos de genotoxicidad (p.ej. Cometa) son usados a tales rangos de concentraciones.

3.4. Establecimiento del ensayo cometa en fibroblastos humanos usando la plataforma trevigen cometchip®

Inicialmente, se evaluó la genotoxicidad del mutágeno de referencia 4NQO (0,29 – 4,7 μM) con la metodología tradicional en láminas usando una variante del ensayo Cometa que utiliza lisis enzimática con proteinasa K en lugar de la lisis alcalina (García Forero et al., 2019). Brevemente, los fibroblastos humanos tratados con el mutágeno por 30 minutos fueron desprendidos de la placa de cultivo usando 500 μL de una solución de tripsina EDTA, se recogieron mediante centrifugación (2000 rpm) durante 6 minutos, se les realizó un lavado con una solución de NaCl (0,75 %), se centrifugaron nuevamente y se suspendieron en igual cantidad (500 μL) de solución fresca de NaCl y agarosa de bajo punto de fusión preparada al 1 % por tratamiento. La mezcla se extendió sobre láminas que contenían una capa de agarosa de grado molecular preparada al 1,3 % previamente solidificada. Los portaobjetos se mantuvieron a temperatura ambiente por 6 minutos y seguidamente 12 minutos a 6-8 °C para que la agarosa se solidificara. A cada lámina se le agregó 70 μL de proteinasa K Bioultra preparada a 0,19 mg/mL en tampón PK (50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, pH 8); se cubrieron con un cubreobjetos para una exposición uniforme, se mantuvieron a 37 °C durante 1 hora para la lisis de proteínas de la membrana celular y finalmente se retiró el cubreobjetos.

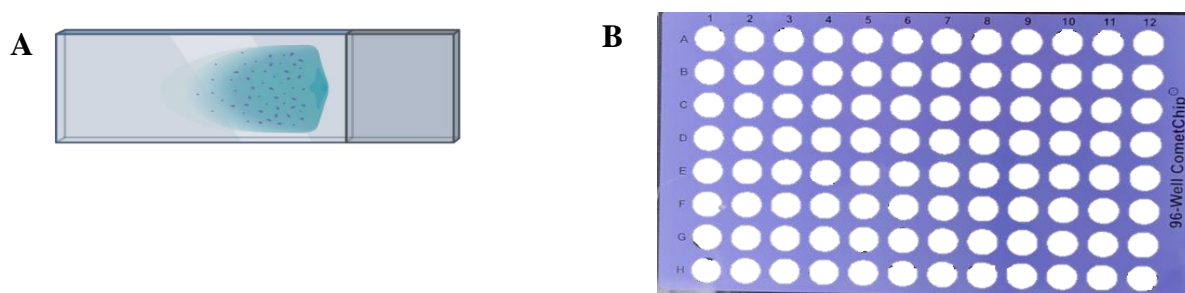
La evaluación de la genotoxicidad de la 4NQO en la plataforma de alto rendimiento Trevigen CometChip® (Gaithersburg, Maryland, USA) se desarrolló como lo indican Sykora et al. (2018), con modificaciones menores. Brevemente, un portaobjetos CometChip® previamente limpiado con etanol se cubrió con una solución de agarosa (preparada en PBS al 1,3 %) atemperada a 45 °C, y la agarosa se dejó solidificar durante 24 horas a 6 °C. Los fibroblastos humanos fueron desprendidos de la caja de cultivo usando 1 mL una solución de tripsina EDTA, se cuantificaron con una cámara de recuento de Neubauer, se recogieron mediante centrifugación a 2000 rpm durante 6 minutos, se lavaron dos veces con una solución de NaCl (0,75 %), se centrifugaron nuevamente y por último se suspendieron en una solución fresca de NaCl (3 mL). La suspensión celular (3 mL) preparada a $4,4 \times 10^4$ células/mL, se mezcló con igual volumen de agarosa de bajo punto de fusión (1% preparada en PBS); la mezcla se vertió en el portaobjetos CometChip® y se dejó solidificar por 6 minutos a temperatura ambiente y por 15 minutos a 4 °C. La cámara CometChip® fue ensamblada sellando herméticamente para evitar la mezcla entre los pocillos. Para los tratamientos celulares, las soluciones (100 µL) con las diferentes concentraciones del mutágeno 4NQO se cargaron por duplicado en diferentes pocillos de la Cámara CometChip®. Una muestra de medio DMEM (100 µL), se consideró como control negativo. La cámara se incubó por 30 minutos a 37 °C en condiciones de CO₂ (5%). Las soluciones de cada tratamiento y control se retiraron de los pocillos y en cada pocillo se añadieron 30 µL de Proteínasa K Bioultra (0.19 mg/mL) para lisis enzimática celular durante 1 hora a 37 °C. Después de la lisis, se retiró el sobrante de la Proteínasa K de cada pocillo y el portaobjetos CometChip® se retiró de la cámara CometChip®.

Tanto las láminas como el portaobjetos CometChip® (Figura 1) se sumergieron durante 15 minutos a 4°C en un tanque de electroforesis Comet Cleaver Scientific Ltd (Rugby, Warwickshire, Reino Unido) que contenía tampón alcalino (0,3 N NaOH, 1 mM EDTA, pH 13), para permitir la descompactación de los núcleos. La electroforesis se realizó durante 30 minutos a 300 mA y 25 V en la oscuridad y a 6-8 °C. Las láminas y el portaobjetos CometChip® se sumergieron durante 15 minutos en una bandeja que contenía solución neutralizante (0,4 M TRIS, pH 7,5), se secaron a 37 °C en una incubadora Midi 40 y se almacenaron para su posterior visualización. Finalmente, los núcleos celulares contenidos en los geles de agarosa sobre láminas se tiñeron con 50 µL de solución YOYO (preparada 1 mM en DMSO al 5 %) y aquellos sobre el portaobjetos CometChip® con 7 µL. Finalmente, se tomaron fotografías de los núcleos con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axio Observer 7 (GmbH, Oberkochen, Alemania) para posterior análisis de los tipos de daños.

El daño del ADN se expresó en unidades arbitrarias basadas en la clasificación de los cometas en cinco categorías (0-4) como propusieron previamente Collins et al. (1997). Se calculó un índice de daño genético (GDI) para cada tratamiento de la siguiente manera: $GDI = (N_0 \times 0 + N_1 \times 1 + N_2 \times 2 + N_3 \times 3 + N_4 \times 4) / n$; donde N_i es el número de núcleos registrados en cada categoría y n es el número de células registradas por tratamiento (Pitarque et al. 1999). Se analizaron doscientas células por cada lámina o pocillo, y dos láminas o pocillos por tratamiento. Se promediaron los resultados de al menos tres experimentos independientes para obtener los valores de GDI para cada tratamiento.

Figura 1.

Metodologías utilizadas para el ensayo cometa.



Nota. La figura muestra A. las láminas usadas en la metodología tradicional de Cometa y B. la lámina usada en la metodología CometChip®.

3.5. Evaluación de la genotoxicidad de las muestras en fibroblastos humanos

La genotoxicidad de los extractos y compuestos vegetales se evaluó en fibroblastos humanos usando únicamente la plataforma de alto rendimiento Trevigen CometChip®, como se indicó en el acápite anterior. Estos se evaluaron a diferentes concentraciones dependiendo del rango de concentraciones con actividad fotoprotectora (ver Fuentes et al., 2021, 2022). Para los tratamientos celulares, se añadieron por duplicado las soluciones con diferentes concentraciones de las muestras en diferentes pocillos de la Cámara CometChip®. Una muestra (100 μ L) de medio DMEM se consideró como control negativo y una muestra (100 μ L) de 4NQO (0.97 μ g/mL) como control positivo. La cámara CometChip® con los tratamientos se incubó por 30 minutos a 37 °C en condiciones de CO₂ (5%). La lisis enzimática con Proteinasa K, la descompactación de los núcleos celulares, la electroforesis, la neutralización y tinción de los núcleos; así como, el registro y análisis de los tipos de daños, se desarrollaron como indicamos en el acápite anterior.

3.6. Análisis estadístico

Se calcularon los valores de supervivencia celular (%) y GDI; así como, sus correspondientes errores estándar. En todos los casos, los datos pasaron las pruebas Kolmogorov-Smirnov y F-maximum para normalidad y homogeneidad de varianza, respectivamente; por lo tanto, las pruebas paramétricas se utilizaron en análisis *a posteriori* de los datos. Cuando se obtuvo un valor F significativo en el análisis de varianza de una vía (ANOVA), los grupos se compararon con la prueba de Tukey. Se utilizó el análisis de correlación de Pearson para examinar la relación entre las concentraciones de los extractos y compuestos con la supervivencia y genotoxicidad en fibroblastos humanos. Para todos los análisis estadísticos, un valor de $p < 0,05$ indicó significancia. El programa R (R Core Team, 2013) se utilizó para todos los análisis.

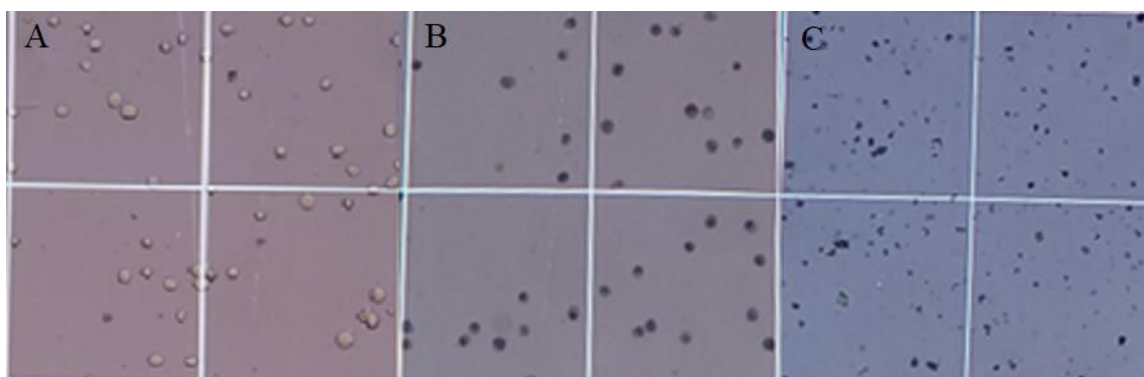
4. Resultados

4.1. Citotoxicidad de los extractos de plantas en fibroblastos humanos

Durante los ensayos de citotoxicidad usando azul de tripano, se observaron tres respuestas bien diferenciadas en los fibroblastos durante los tratamientos con los extractos (Figura 2). Estos son: células con membranas intactas que resultaron no teñidas (A), células con membranas alteradas que se tiñeron, pero que mantienen su forma (B) y fragmentos de membranas teñidas que resultaron de la destrucción celular (C).

Figura 2.

Respuesta de células de fibroblastos humanos durante el ensayo de exclusión con azul de tripano observadas en la cámara de Neubauer.



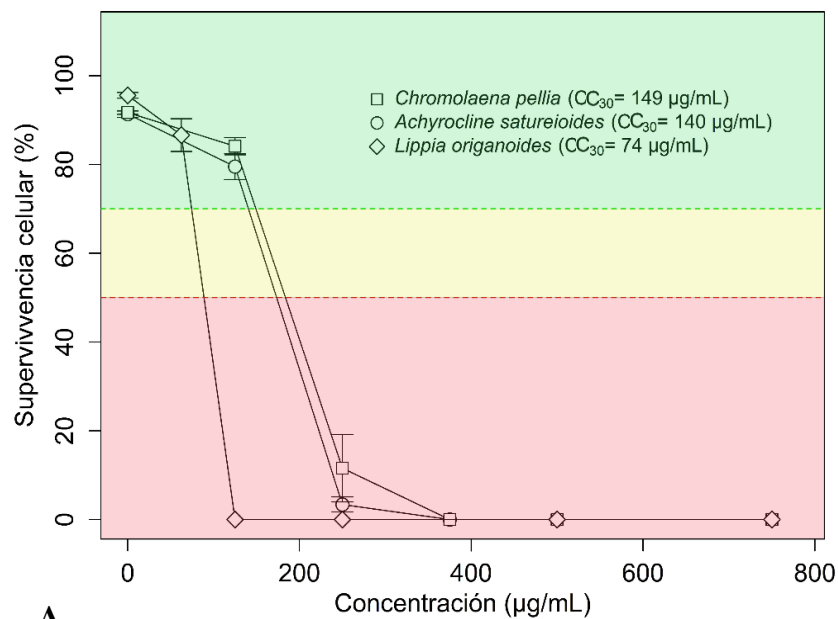
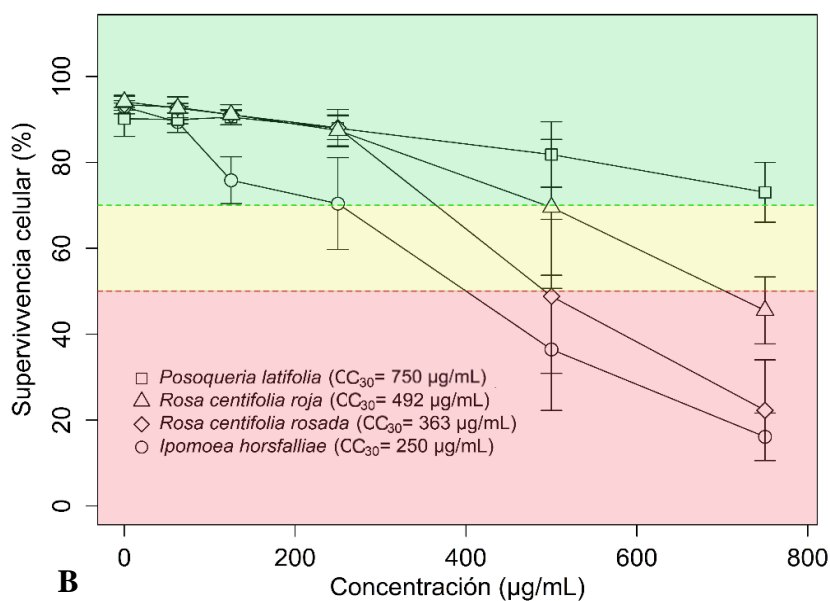
Nota. La figura muestra tres respuestas de los fibroblastos observadas en el ensayo con azul de tripano siendo A – Células no teñidas; B – Células teñidas; y C – Fragmentos de células destruidas.

En cada una se observan 4 campos de conteo de la cámara de Neubauer.

De los doce extractos de plantas evaluados en el rango de concentración entre 125 – 750 $\mu\text{g/mL}$, cinco (*P. eriopodon*, *P. eriopodon*-F2, *C. moritzianus*, *S. aratocensis*, y *P. sartorianum*) mostraron destrucción celular en todas las concentraciones estudiadas (ver Figura 2C). Las curvas dosis-respuesta para los otros siete extractos de plantas son presentadas en la Figura 3AB.

Figura 3.

Citotoxicidad de extractos de plantas en fibroblastos humanos (MRC5).

**A****B**

Nota. Se muestra la citotoxicidad de extractos obtenidos por extracción de fluidos (CO₂) supercríticos (A) e hidroalcohólica (B). Se delimitan tres zonas con base en el grado de citotoxicidad: Alta (rojo), media (amarilla) y baja (verde).

Mediante interpolación gráfica, se calcularon las concentraciones de los extractos de plantas que producen un 50% (CC₅₀) y un 30% (CC₃₀) de citotoxicidad en fibroblastos humanos (Tabla 2).

Tabla 2.

Concentraciones citotóxicas 50% (CC₅₀) y 30% (CC₃₀) en fibroblastos humanos (MRC5) para los extractos de planta evaluados

Especie (CHN voucher)	Tipo de extracción	Concentraciones citotóxicas en fibroblastos (µg/mL)	
		CC ₅₀	CC ₃₀
<i>Lippia origanoides</i> (COL560259)	EFS	89	74
<i>Achyrocline satureioides</i> (COL579420)	EFS	173	140
<i>Chromolaena peltia</i> (COL559437)	EFS	184	149
<i>Ipomoea horsfalliae</i> (COL587134)	Hidroalcohólica	398	250
<i>Rosa centifolia</i> (rosada)	Hidroalcohólica	492	363
<i>Rosa centifolia</i> (roja)	Hidroalcohólica	702	492
<i>Posoqueria latifolia</i> (COL512080)	Hidroalcohólica	> 750	> 750
<i>Bloqueador comercial</i> †			
Eau Thermale Avène SPF 50+ ‡	Hidroalcohólica	51	69

Nota. CHN: Herbario Nacional Colombiano. EFS: Extracción de fluidos supercríticos.

†, Para la comparación, se incluyó una extracción hidroalcohólica de un protector solar comercial ampliamente utilizado (Eau Thermale Avène SPF50+).

‡, La mayor concentración (v/v) de protector solar evaluada fue de 30 mg/mL disueltos en agua destilada.

Con base en los valores de CC₅₀, la citotoxicidad relativa de los extractos fue como sigue:

L. origanoides (89 µg/mL) > *A. satureioides* (173 µg/mL) > *C. peltia* (184 µg/mL) > *I. horsfalliae*

(398 $\mu\text{g}/\text{mL}$) > *R. centifolia* rosada (492 $\mu\text{g}/\text{mL}$) > *R. centifolia* roja (702 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Estos extractos fueron inocuos para las células de fibroblastos a concentraciones menores o igual (\leq) a la CC_{30} como sigue: *L. origanoides* (74 $\mu\text{g}/\text{mL}$), *A. saturoioides* (140 $\mu\text{g}/\text{mL}$), *C. peltia* (149 $\mu\text{g}/\text{mL}$), *I. horsfalliae* (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), *R. centifolia* rosada (363 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y *R. centifolia* roja (492 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Como se puede constatar, los extractos obtenidos por extracción de fluidos (CO_2) supercríticos resultaron más citotóxicos que los obtenidos por extracción hidroalcohólica.

En general, los extractos vegetales estudiados resultaron menos tóxicos para los fibroblastos humanos que una extracción hidroalcohólica de un bloqueador comercial (Eau Thermale Avène SPF 50+, Tabla 2) usado como control para su comparación. El extracto de *P. latifolia* fue único que resultó no citotóxico para los fibroblastos humanos en todo el rango de concentración estudiado.

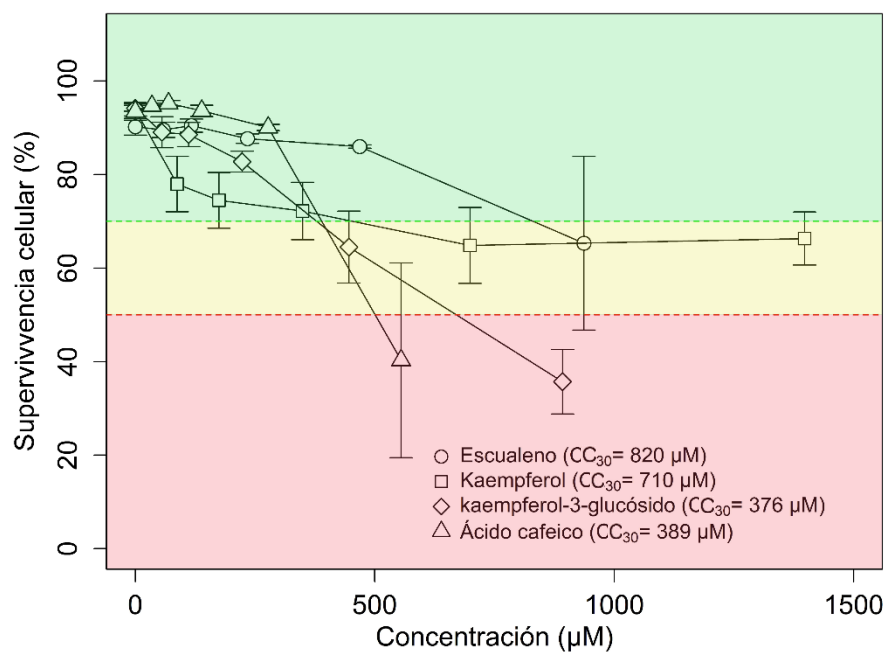
4.2. Citotoxicidad de los compuestos mayoritarios en fibroblastos humanos

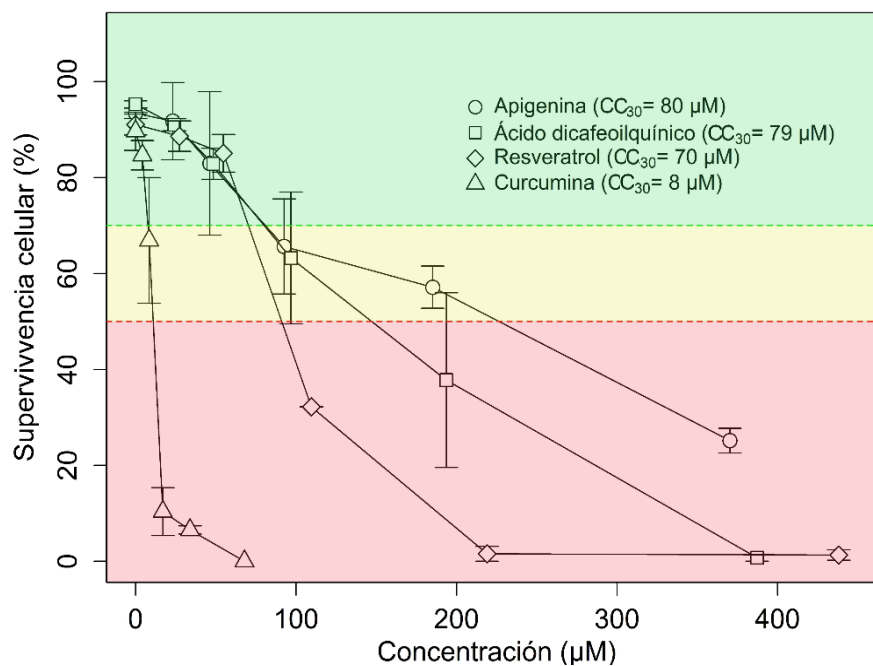
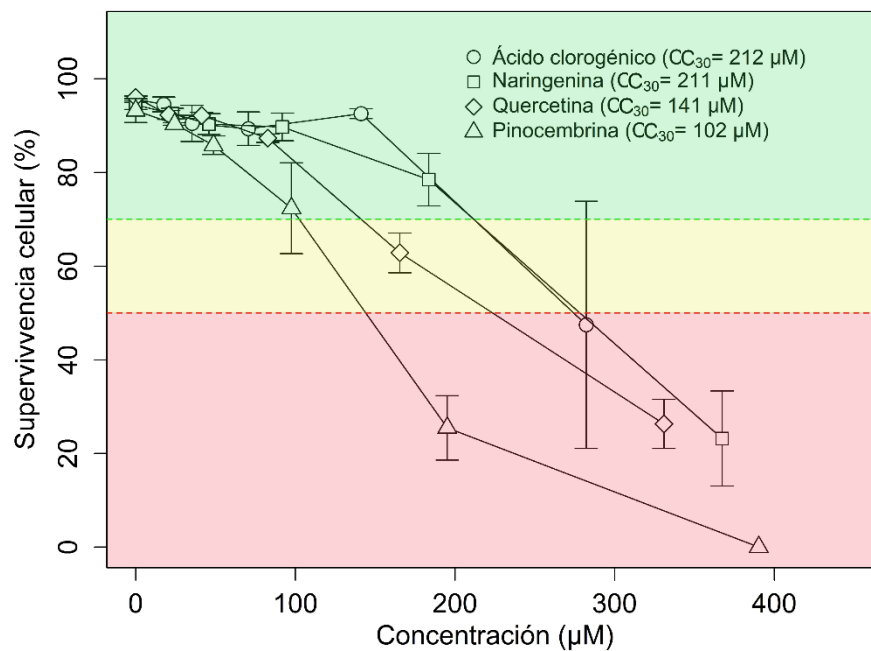
De los compuestos puros estudiados, el *trans*- β -cariofileno resultó citotóxico para el rango de concentración entre 918 – 14680 μM (datos no mostrados). Los valores de porcentaje de viabilidad celular obtenidos para los restantes compuestos estudiados son presentados en las Figura 4. Excepto por el escualeno y el kaempferol, todos los compuestos mostraron algún nivel de citotoxicidad a las concentraciones estudiadas. Las concentraciones de los compuestos que producen un 50% (CC_{50}) y un 30% (CC_{30}) de citotoxicidad en fibroblastos humanos son presentadas en la Tabla 3. Con base en los valores de CC_{50} , la citotoxicidad de los compuestos fue como sigue: curcumina (11 μM) > resveratrol (91 μM) > pinocembrina (144 μM) > ácido

dicafeoilquínico (147 μM) > quercetina (222 μM) > apigenina (226 μM) > naringenina (272 μM) > ácido clorogénico (273 μM) > ácido cafeico (500 μM) > kaempferol-3-glucósido (676 μM). Estos compuestos fueron inocuos para las células de fibroblastos a concentraciones \leq al CC_{30} como sigue: curcumina (8 μM) > resveratrol (70 μM) > ácido dicafeoilquínico (79 μM) > apigenina (80 μM) > pinocembrina (102 μM) > quercetina (141 μM) > naringenina (211 μM) > ácido clorogénico (212 μM) > kaempferol-3-glucósido (376 μM) > ácido cafeico (389 μM) > kaempferol (710 μM) > escualeno (820 μM).

Figura 4.

Citotoxicidad de compuestos vegetales en fibroblastos humanos (MRC5).





Nota. En la imagen se muestra para su mejor comprensión tres zonas con base en el grado de citotoxicidad: Alta (rojo), media (amarilla) y baja (verde).

Tabla 3.

Concentraciones citotóxicas 50% (CC50) y 30% (CC30) en fibroblastos humanos (MRC5) para los compuestos evaluados.

No.	Compuestos	Concentraciones citotóxicas en fibroblastos			
		CC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μg/mL)	CC ₃₀ (μM)	CC ₃₀ (μg/mL)
<i>Fitoquímicos</i>					
1	Ácido cafeico	500	89	389	69
2	Ácido clorogénico	273	97	212	75
3	Ácido dicafeoilquínico	147	76	79	41
4	Apigenina	226	61	80	21
5	Curcumina	11	4	8	3
6	Escualeno	> 937	> 385	>820	>337
7	Kaempferol	>1398	> 400	>710	>203
8	Kaempferol-3-glucósido	676	303	376	169
9	Naringenina	272	76	211	57
10	Pinocembrina	144	33	102	23
11	Quercetina	222	67	141	43
12	Resveratrol	91	21	70	16
<i>Mutágeno estándar</i>					
13	4-nitroquinolina 1-óxido	2,5	0,5	1,0	0,2
<i>Filtro estándar</i>					
14	Dióxido de titanio	704	56	455	36

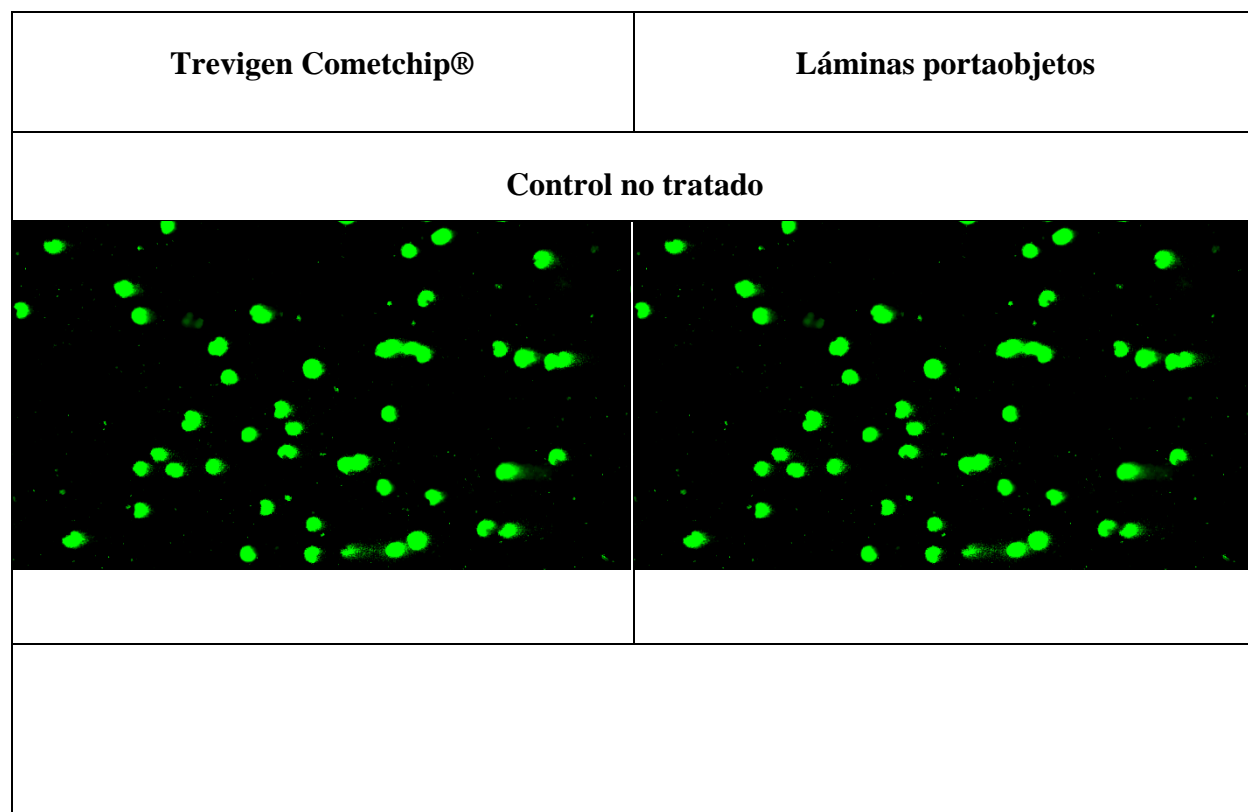
Todos los compuestos estudiados resultaron menos tóxicos para los fibroblastos humanos que el mutágeno de referencia usado, la 4NQO. Sin embargo, solo los compuestos escualeno y el kaempferol mostraron menor citotoxicidad que el compuesto usado como estándar de filtro solar (Dióxido de titanio). Las curvas de citotoxicidad para el filtro solar estándar y mutágeno de referencia 4NQO se presentan en el Anexo No. 1.

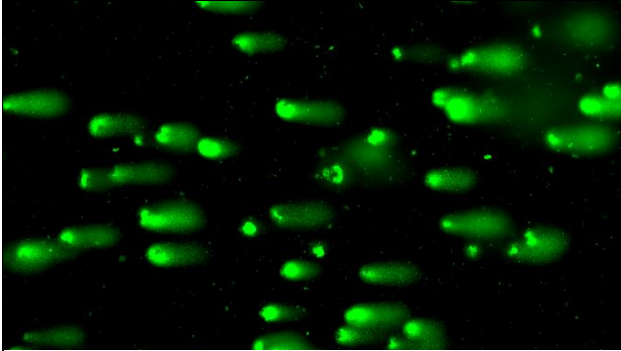
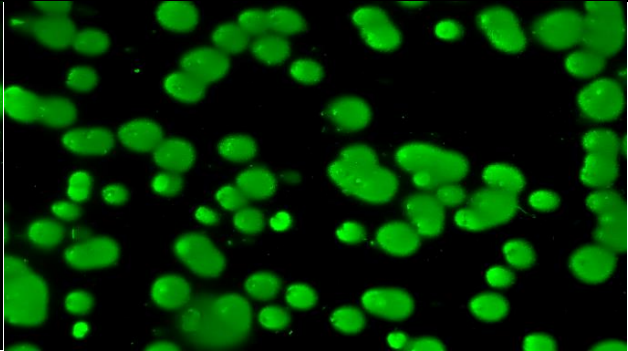
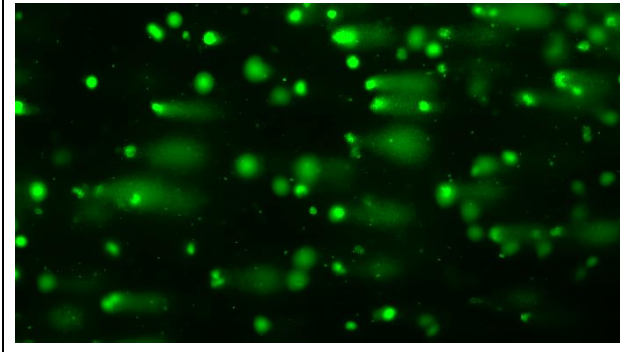
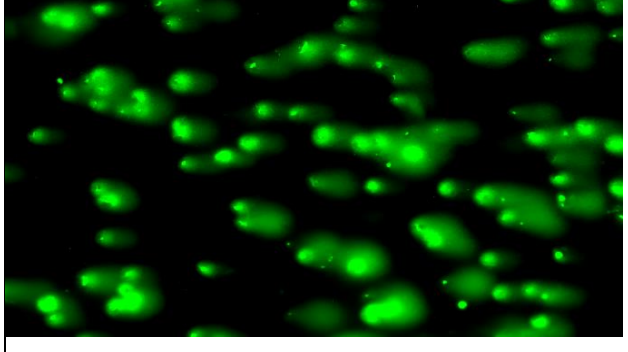
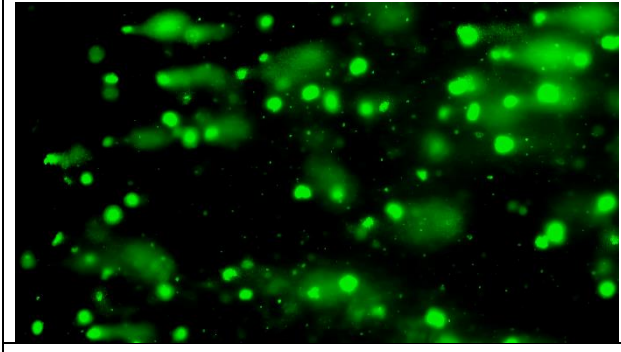
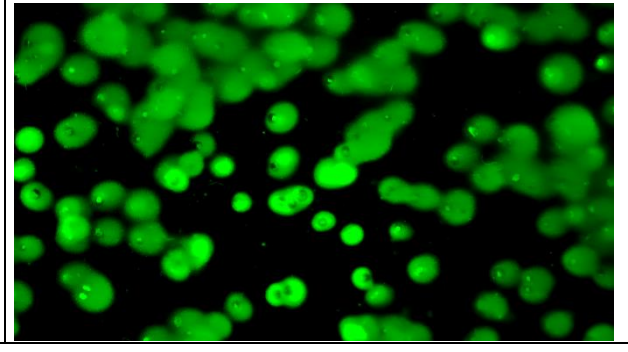
4.3. Establecimiento del ensayo cometa en fibroblastos humanos usando la plataforma trevigen cometchip®

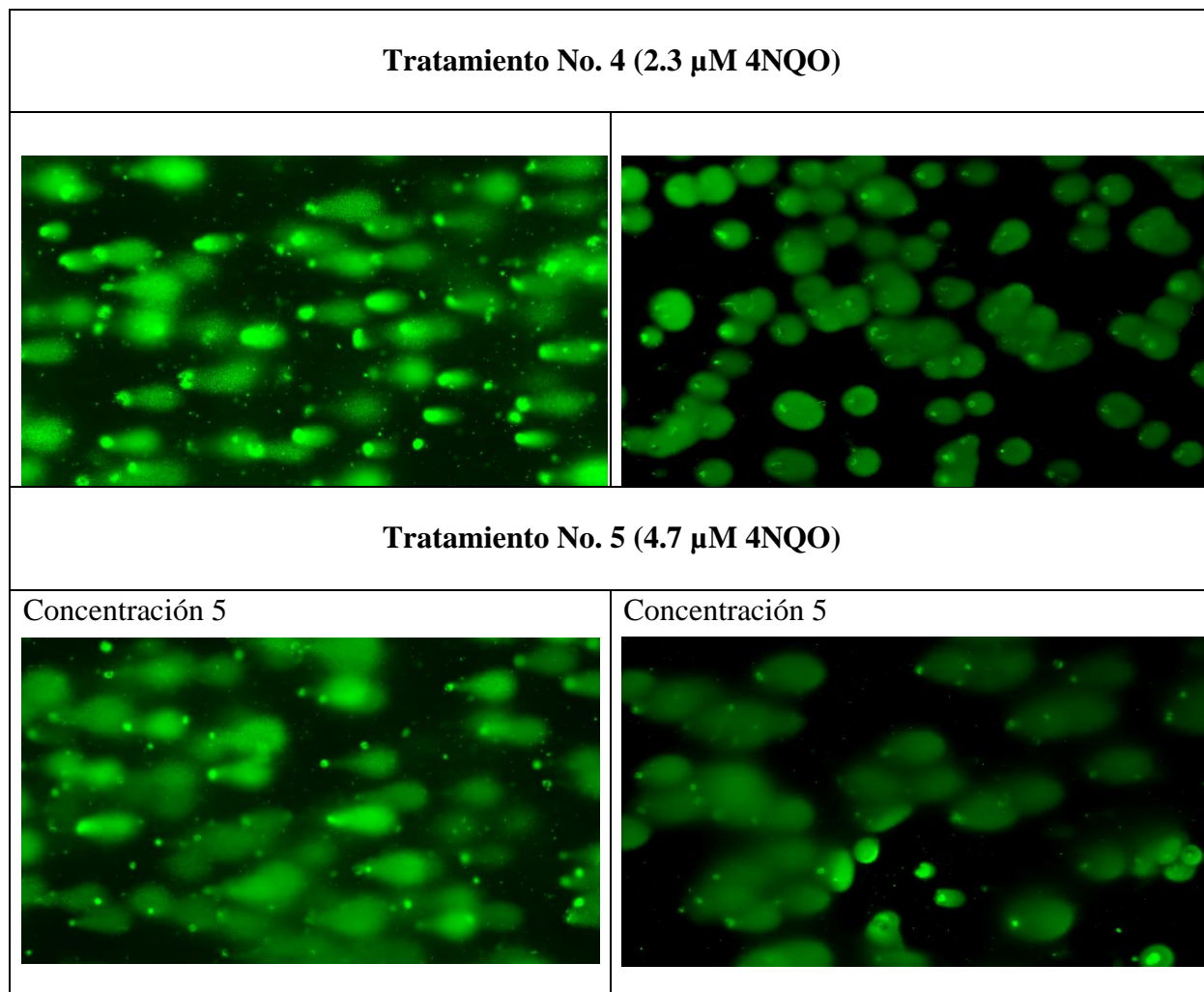
Para establecer la utilidad de la plataforma Trevigen Cometchip® para la evaluación genotóxica de fitoquímicos en fibroblastos humanos, se compararon los resultados del ensayo Cometa en dicha plataforma con los desarrollados en láminas portaobjetos (método tradicional); considerando para la comparación la estructura de los “Cometas” y la variación de los datos obtenidos. A tales fines, se usó el mutágeno estándar 4NQO, evaluando 5 concentraciones diferentes y las células no tratadas (control). En la Figura 5 se muestran imágenes representativas de cada tratamiento y el control obtenidas con ambas metodologías.

Figura 5.

Registros fotográficos de los Cometas producidos con las dos metodologías para los diferentes tratamientos.



Tratamiento No. 1 (0.3 μM 4NQO)	
	
Tratamiento No.2 (0.6 μM 4NQO)	
	
Tratamiento No. 3 (1.2 μM 4NQO)	
	

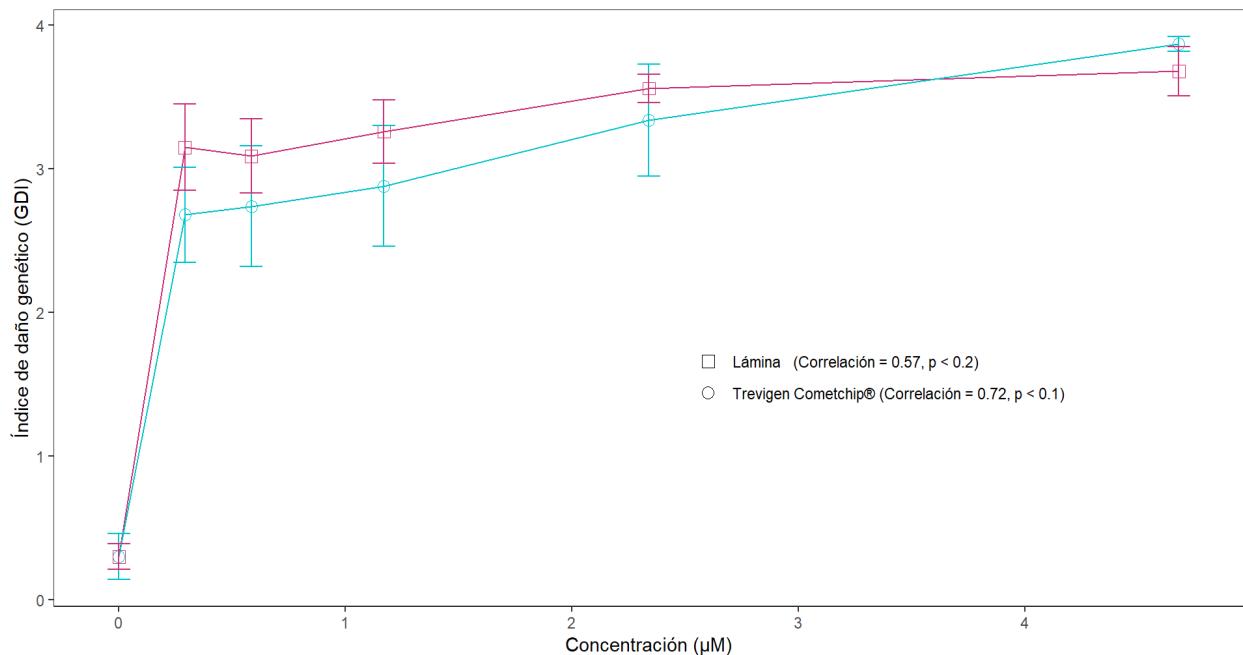


Como se puede constatar, los microgeles de agarosa obtenidos con la plataforma Trevigen Cometchip® facilitan la migración del ADN fragmentado, produciendo cometas más alargados y uniformes a lo largo de los campos observados. En tales estructuras, se logra una clara diferenciación entre el núcleo y la cola del Cometa, facilitando la clasificación de los núcleos en las diferentes categorías de daño (0-4). Por el contrario, los Cometas observados en las láminas se observan más compactos entre redondos y elípticos, haciendo más difícil distinguir el núcleo de su cola; por ende, la tipificación del daño genético. Como consecuencia de lo anterior, el nivel de daño estimado (GDI) resultó ligeramente mayor usando láminas (Figura 6), posiblemente por una sobreestimación de la categoría de daño tipo IV; es decir, fue difícil distinguir entre las categorías

daños tipos III y IV. La variación de los valores GDI fue muy similar usando ambas metodologías, pero la correlación observada entre la concentración y el daño genético usando la plataforma Trevigen Cometchip® fue superior a la obtenidas usando el método tradicional [$R = 0.72$ ($p < 0.1$) & $R = 0.57$ ($p < 0.2$)].

Figura 6.

Valores de daño genético (GDI) obtenidos en las curvas dosis-respuesta.



Nota. La figura muestra las curvas obtenidas con el mutágeno 4NQO usando la metodología Trevigen Cometchip® y la tradicional en láminas portaobjetos. Se presentan los valores promedio de tres ensayos y sus correspondientes errores estándar.

4.4. Genotoxicidad de los extractos de plantas en fibroblastos humanos

El análisis de la genotoxicidad de los extractos estudiados en fibroblastos humanos se presenta en la Tabla 4.

Tabla 4.

Genotoxicidad de los extractos de flores y del disolvente usado (metanol) en células de fibroblastos humanos MRC5.

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	GDI + Error estándar			
	<i>Achyrocline saturoioides</i>	<i>Chromolaena peltia</i>	<i>Ipomoea horsfalliae</i>	<i>Rosa centifolia</i> (rosada)
0.0	0.19 \pm 0.07	0.29 \pm 0.07	0.21 \pm 0.04	0.12 \pm 0.05
46.9	0.40 \pm 0.07	0.79 \pm 0.29	0.51 \pm 0.22	0.39 \pm 0.04
93.7	0.41 \pm 0.01	0.98 \pm 0.28	0.90 \pm 0.25	0.46 \pm 0.04
187.5	0.49 \pm 0.02	0.93 \pm 0.02	2.20 \pm 0.40	0.98 \pm 0.09
375.0	0.70 \pm 0.08	1.36 \pm 0.30	3.31 \pm 0.05	1.30 \pm 0.33
750.0	0.87 \pm 0.20	1.80 \pm 0.35	3.82 \pm 0.03	2.39 \pm 0.52
4NQO	3.91 \pm 0.03	3.90 \pm 0.03	3.93 \pm 0.02	3.91 \pm 0.02
R =	0.95 (p < 0.05)	0.93 (p < 0.05)	0.92 (p < 0.05)	0.99 (p < 0.05)

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	GDI + Error estándar			
	<i>Rosa centifolia</i> (roja)	<i>Posoqueria latifolia</i>	<i>Lippia origanoides</i>	Dilución equivalente de disolvente
0.0	0.08 \pm 0.02	0.20 \pm 0.05	0.16 \pm 0.11	0.19 \pm 0.05
46.9	0.21 \pm 0.09	0.48 \pm 0.03	0.41 \pm 0.08	0.80 \pm 0.28
93.7	0.27 \pm 0.07	0.65 \pm 0.13	0.64 \pm 0.14	0.84 \pm 0.28
187.5	0.74 \pm 0.20	0.66 \pm 0.08	0.90 \pm 0.12	0.83 \pm 0.28
375.0	1.93 \pm 0.28	0.99 \pm 0.27	1.50 \pm 0.14	0.85 \pm 0.30
750.0	3.55 \pm 0.04	1.56 \pm 0.09	2.72 \pm 0.48	0.91 \pm 0.28
4NQO	3.91 \pm 0.01	3.93 \pm 0.02	3.92 \pm 0.04	3.90 \pm 0.08
R =	1.00 (p < 0.05)	0.98 (p < 0.05)	1.00 (p < 0.05)	0.53 (p = 0.28)

Nota. Se dan los valores del índice de daño genético (GDI) y sus errores estándar correspondientes, calculados a partir de al menos tres experimentos independientes. También se presenta el

coeficiente de correlación de Pearson (R) que muestra la relación entre las concentraciones del compuesto y los valores de GDI. Los criterios de daño en el ADN fueron los siguientes: i) valores de GDI entre 0 y 1 (sin daño en el ADN), ii) valores de GDI entre 1 y 2 (escaso daño en el ADN), iii) valores de GDI entre 2 y 3 (daño moderado en el ADN) y, iv) valores de GDI entre 3 y 4 (daño severo en el ADN). Además, debe existir una clara relación dosis-respuesta (concentración-daño en el ADN). El mutágeno estándar 4NQO (0,97 $\mu\text{g/mL}$) se utilizó como control positivo.

De acuerdo con el criterio usado (GDI), la genotoxicidad de los extractos estudiados fue como sigue: *Ipomoea horsfalliae* > *Rosa centifolia* (roja) > *Lippia origanoides* > *Rosa centifolia* (rosada) > *Chromolaena pellia* > *Posoqueria latifolia* > *Achyrocline satureioides*. El extracto de *Achyrocline satureioides* resultó no genotóxico (GDI < 1) en todo el rango de concentraciones evaluadas (46,9-750 $\mu\text{g/mL}$), mientras que el extracto de *Posoqueria latifolia* mostró escaso daño (1 < GDI < 2) a la concentración de 750 $\mu\text{g/mL}$; resultando estos extractos los más inocuos. El metanol, usado como disolvente de los extractos, resultó no genotóxico en todas las concentraciones equivalentes. En resumen, con la excepción de *A. satureioides* y *P. latifolia*, los extractos mostraron genotoxicidad entre baja y moderada en alguna de las concentraciones estudiadas. Tal genotoxicidad muestra una clara relación dosis-respuesta (concentración del extracto-daño en el ADN). Comparando con el mutágeno estándar (Anexo No. 2), estos datos también sugieren un modo de acción genotóxico dependiente de la citotoxicidad de los extractos. Solo los extractos de *Ipomoea horsfalliae* y *Rosa centifolia* mostraron genotoxicidad a concentraciones no citotóxicas, indicando que estos deben considerarse con reserva para su uso en fotoprotección.

4.5. Genotoxicidad de los compuestos de plantas en fibroblastos humanos

Por su potencial utilidad en cosmética, seis de los trece compuestos estudiados se evaluaron para su genotoxicidad (Tabla 5). De acuerdo con los criterios establecidos, la genotoxicidad de los compuestos estudiados fue como sigue: quercetina (moderada) > kaempferol (escasa) > apigenina (escasa) > resveratrol (escasa) > kaempferol 3-glucosido (inocuo) > escualeno (inocuo). En todos los casos, la genotoxicidad fue claramente dependiente de la concentración del compuesto. Así, los compuestos escualeno y kaempferol 3-glucosido resultaron no genotóxico ($GDI < 1$), la apigenina, el kaempferol y el resveratrol mostraron escaso daño ($1 < GDI < 2$) y, la quercetina resultó moderadamente genotóxica ($1 < GDI < 3$), en el rango de concentraciones evaluadas. En general, los compuestos escualeno, kaempferol 3-glucosido y resveratrol, resultaron los más inocuos para los fibroblastos humanos, pero ninguno de los compuestos mostró genotoxicidad a concentraciones no citotóxicas.

Tabla 5.

Genotoxicidad de compuestos promisorios células de fibroblastos humanos MRC5.

Conc.	GDI + Error estándar	Conc.	GDI + Error estándar	Conc.	GDI + Error estándar
(μM)	Apigenina	(μM)	Escualeno	(μM)	Kaempferol
0.0	0.12 \pm 0.05	0.0	0.12 \pm 0.05	0.0	0.21 \pm 0.03
15.74	0.81 \pm 0.19	92.73	0.33 \pm 0.11	54.59	0.38 \pm 0.06
31.47	0.87 \pm 0.19	187.47	0.32 \pm 0.04	109.18	0.48 \pm 0.12
62.95	0.99 \pm 0.29	374.94	0.33 \pm 0.10	218.36	0.55 \pm 0.06
125.90	1.18 \pm 0.36	749.88	0.48 \pm 0.07	436.71	0.71 \pm 0.18
251.80	1.70 \pm 0.38	1499.7	0.52 \pm 0.13	873.42	1.27 \pm 0.07
-	-	-	-	1746.8	1.95 \pm 0.10
PC =	3.85 \pm 0.12	PC =	3.87 \pm 0.08	PC =	3.62 \pm 0.48
R =	0.87 (p < 0.05)	R =	0.84 (p < 0.05)	R =	0.99 (p < 0.05)

Conc. (μM)	GDI + Error estándar	Conc. (μM)	GDI + Error estándar	Conc. (μM)	GDI + Error estándar
	Kaempferol 3-glucosido		Quercetina		Resveratrol
0.0	0.16 \pm 0,06	0.0	0.09 \pm 0.01	0.0	0.23 \pm 0.10
43.91	0.65 \pm 0.11	14.06	0.45 \pm 0.13	6.24	0.64 \pm 0.07
87.82	0.67 \pm 0.09	28.12	0.64 \pm 0.06	12.48	0.68 \pm 0.12
175.63	0.69 \pm 0.08	56.25	0.87 \pm 0.18	24.97	0.77 \pm 0.05
351.26	0.72 \pm 0.04	112.49	1.27 \pm 0.15	49.94	0.86 \pm 0.03
702.53	0.79 \pm 0.10	224.99	2.15 \pm 0.21	99.89	1.19 \pm 0.04
PC =	3.85 \pm 0.08	PC =	3.85 \pm 0.07	PC =	3.96 \pm 0.03
R =	0.61 (p = 0.2)	R =	0.99 (p < 0.05)	R =	0.89 (p < 0.05)

Nota. Se dan los valores del índice de daño genético (GDI) y sus errores estándar correspondientes, calculados a partir de al menos tres experimentos independientes. También se presenta el coeficiente de correlación de Pearson (R) que muestra la relación entre las concentraciones del compuesto y los valores de GDI.

Los criterios de daño en el ADN fueron los siguientes: i) valores de GDI entre 0 y 1 (sin daño en el ADN), ii) valores de GDI entre 1 y 2 (escaso daño en el ADN), iii) valores de GDI entre 2 y 3 (daño moderado en el ADN) y, iv) valores de GDI entre 3 y 4 (daño severo en el ADN). Además, debe existir una clara relación dosis-respuesta (concentración-daño en el ADN). El mutágeno estándar 4-NQO (0,97 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se utilizó como control positivo.

5. Discusión

Este trabajo se centró en la evaluación de la inocuidad de extractos y compuestos vegetales con potencial cosmético, los cuales que podrían ser utilizados como ingredientes en protección solar (Fuentes et al., 2021, 2022). Entre las especies de plantas estudiadas, cuatro (*P. eriopodon*,

C. moritzianus, *S. aratocensis*, y *P. sartorianum*) fueron citotóxicas para los fibroblastos humanos a las concentraciones estudiadas (entre 125 y 750 mg/mL). Esto significa que los extractos y compuestos generan un valor de viabilidad cero por su capacidad de ruptura de la membrana celular, lo que limita su uso en la preparación de cosméticos para la piel. Se conoce poco sobre la seguridad de estas especies de plantas para los humanos. Velandia et al. (2018) mostró una alta citotoxicidad para los aceites esenciales de especies de *Piper* como *P. eriopodon*, *P. cumanense* y *P. sibflavum* en líneas celulares de cáncer de mama y de cuello uterino humano. Aunque no hay informes en humanos, el extracto metanólico y el aceite esencial *P. sartorianum* han mostrado citotoxicidad en parásitos como *Taenia crassiceps* (Aguilar-Vega et al., 2016) y micobacterias (Bueno et al., 2011), respectivamente. Además, especies relacionadas como *Calycolpus moritzianus* y *Salvia officinalis* mostraron una alta citotoxicidad en líneas celulares humanas de cáncer de mamas y cuello uterino (Velandia et al., 2018; Yáñez-Rueda et al., 2009). En este sentido, nuestros hallazgos proporcionan nueva evidencia sobre la citotoxicidad de las especies de plantas *P. eriopodon*, *C. moritzianus*, *S. aratocensis*, y *P. sartorianum*.

Los extractos de *L. organoides*, *A. satureioides*, *C. pellia*, *I. horsfalliae* y *R. centifolia* produjeron una citotoxicidad relativamente menor a los cinco extractos anteriores (ver Tabla 2), en los fibroblastos humanos. Los extractos de *C. pellia* y *L. organoides* además producen daños en el ADN entre bajo y moderado a concentraciones citotóxicas (ver Tabla 4). Esto sugiere que estos son resultados falsos positivos para su genotoxicidad, con patrones que contrastan con los observados para el mutágeno estándar (Anexo 2); los cuales son genotóxicos a concentraciones que producen viabilidad celular $\geq 70\%$. Estos hallazgos indican que la genotoxicidad del extracto está relacionada con su citotoxicidad (Vock et al., 1998). Por el contrario, los extractos de *I.*

horsfalliae y *R. centifolia* (ver Tabla 4) produjeron roturas en el ADN a concentraciones no citotóxicas, indicando que ellos contienen compuestos cuyas mezclas resultan genotóxicas.

En estudios anteriores (Frieauff et al., 2001; Henderson et al., 1998; Koppen et al., 2017), han recomendado evaluar concentraciones que producen viabilidades $\geq 70\%$ para evitar resultados falsos positivos de genotoxicidad con el ensayo cometa. En este sentido, los ensayos de exclusión con azul de tripano y cometa, que miden la citotoxicidad (rotura de la membrana) y la genotoxicidad (roturas del ADN) respectivamente, fueron complementarios en nuestro estudio para este propósito. Esto indica que el uso en cosmética de plantas como *I. horsfalliae* y *R. centifolia* estaría limitado a concentraciones no citotóxicas ni genotóxicas de sus extractos.

C. pelli es una especie de planta colombiana poco estudiada (Fuentes et al., 2021). Especies relacionadas (p. ej., *C. odorata*) son tóxicas en las siguientes líneas celulares humanas: cáncer de mamas MCF-7, cáncer cervical HELA, y embrionarias de riñón HEK293 (Velandia et al., 2016); mientras que *C. hirsute* y *C. squalida* muestran actividad antimicrobiana (Taleb-Contini et al., 2003). El género sinónimo *Eupatorium* ha demostrado ampliamente sus propiedades antimicrobianas (Nogueira-Sobrinho et al., 2017). Alternativamente, la bioactividad de *L. origanoides* ha sido ampliamente estudiada (Oliveira et al., 2014), incluyendo sus efectos tóxicos en diferentes modelos como insectos (Caballero-Gallardo et al., 2012; Nerio et al., 2009; Sivira et al., 2011), crustáceos (Olivero-Verbel et al., 2009) y protozoos (Raposo-Borges et al., 2012). Por último, el aceite esencial de *R. centifolia* produce baja citotoxicidad en células hepáticas humanas. Además, este exhibe capacidad de inhibición de biofilm de *C. albicans* (Nikolić et al., 2021). Gerasimova et al. (2022) observó un efecto citotóxico en ratones de las aguas residuales de *R. alba* L., e igualmente observo una débil actividad genotóxica en este sistema de prueba.

Por su parte, el extracto metanólico de *I. horsfalliae*, una especie con propiedades fotoprotectoras reportadas previamente (Sierra et al., 2020), demostró ser genotóxico para fibroblastos humanos a concentraciones no citotóxicas (ver Tablas 2 y 4). Su patrón de genotoxicidad fue muy similar al observado con el mutágeno estándar (ver Anexo 2). Poco se conoce sobre la toxicidad de esta especie. Por ejemplo, Sierra et al. (2020) no encontraron citotoxicidad relevante del extracto metanólico de *I. horsfalliae* en células de carcinoma hepatocelular (HepG-2), leucemia (THP-1), riñón (HEK-293) y pulmón (MCR-5). Por su parte, el extracto etanólico de la especie relacionada *I. batata* muestra efectos tóxicos en órganos vitales (hígado y riñones) a dosis superiores a 1000 mg/kg (Imafidon et al., 2015). En este sentido, los resultados de citotoxicidad y genotoxicidad obtenidos para el extracto *I. horsfalliae*, indican toxicidad del extracto en humanos y estos son de relevancia para su potencial uso en cosmética. Se recomienda ampliar sus estudios de toxicidad *in vitro* e *in vivo*, antes de que dicho extracto sea usado en formulaciones cosméticas.

Por el contrario, el extracto de *A. satuireioides* no resultó citotóxico ni genotóxico para fibroblastos humanos a concentraciones relevantes para la fotoprotección (Fuentes et al., 2021). La especie *A. satuireioides* se utiliza en la medicina popular brasileña como digestivo, eupéptico, emenagogo, antiespasmódico, antiinflamatorio, expectorante y antidiarreico (Gonçalves et al., 2018). Las propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras de esta planta han sido confirmadas en estudios farmacológicos (Cosentino et al., 2008; Megret et al., 2013). Esta planta también muestra actividad anticancerígena (Bianchi et al., 2020; Souza et al., 2018) y resulta no irritante para la piel humana (Balestrin et al., 2021), lo que respalda su uso en administración tópica. Nuestros hallazgos respaldan el potencial de *A. satuireioides* en la fotoprotección cosmética.

De similar manera, el extracto de *P. latifolia* mostró ser no citotóxico ($CC_{50} > 750 \mu\text{g/mL}$) y produce escaso daño ($1 < \text{GDI} < 2$) solo a la mayor concentración evaluada. *P. latifolia* comúnmente conocida como jazmín de árbol, es una planta nativa de América Central y del Sur (Delprete, 2009) que ha mostrado propiedades como filtro solar con alta eficacia fotoprotectora y actividad antígenotóxica frente a la radiación UVB (Fuentes et al., 2022). De acuerdo con la revisión bibliográfica, no existen reportes acerca de los efectos citotóxicos y genotóxico de esta especie. La especie relacionada *P. acutifolia*, tampoco mostró efecto tóxico; sí efectos analgésicos y antiinflamatorios (Sousa et al., 2007). En tal sentido, y basado en todos los hallazgos antes indicados, los extractos de las especies plantas *A. saturoioides* y *P. latifolia* son los más seguros de todos los estudiados para usarlos como ingredientes activos de cosméticos.

En estudios previos (Fuentes et al., 2021, 2022), se determinó la composición química de 7 de los extractos de plantas aquí estudiados usando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). Los compuestos mayoritarios (cantidad relativa $\geq 5\%$) en cada extracto, fueron los siguientes: *trans*- β -cariofileno (25,0 %), γ -muroleno (8,9 %), γ -cadineno (7,5 %) y óxido de cariofileno (13,4 %) en *A. saturoioides*; *trans*- β -cariofileno (8,1 %), óxido de cariofileno (5,3 %), sesquiterpenol $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$ (11,6 %), escualeno (18,5 %) y α -amirina (22,0 %) en *C. pellia*; *p*-cimeno (6,2 %), carvacrol (6,3 %), *trans*- β -cariofileno (10,9 %) y pinocembrina (54,9 %) en *L. origanoides*; ácido dicafeoilquínico (60,1 %), ácido clorogénico (13,7 %) y escopoletina (15,1 %) en *I. horsfalliae*; quercetina (32,3 %), kaempferol (29,1 %), kaempferol-3-glucósido (13,1 %), kaempferol-ramnósido (12,7 %) y quercetina-3-ramnósido (9,8 %) en *R. centifolia* (rosada); quercetina (38,1 %), kaempferol (15,3 %), kaempferol-3-glucósido (12,3 %), cianidina-3,5-glucósido (10,2 %), quercetina-3-ramnósido (9,6 %), kaempferol-ramnósido (6,9

%) y quercetina-glucósido (5,1 %) en *R. centifolia* (roja) y; *trans*-resveratrol-diglucósido (49,9 %), *cis*-resveratrol- diglucósido (25,0 %), ecdisterona (11,4 %) y ácido clorogénico (6,2 %) en *P. latifolia*.

Las actividades citotóxicas/genotóxicas observadas en este estudio podrían estar relacionadas con alguno de estos compuestos mayoritarios o pueden ser producto de un efecto sinérgico entre ellos en el extracto. Dependiendo del valor CC_{50} (Tabla 3), la citotoxicidad de los compuestos fue como sigue: curcumina (11 μM) > resveratrol (91 μM) > pinocembrina (144 μM) > ácido dicafeoilquínico (147 μM) > quercetina (222 μM) > apigenina (226 μM) > naringenina (272 μM) > ácido clorogénico (273 μM) > ácido cafeico (500 μM) > kaempferol-3-glucósido (676 μM). Un compuesto, el *trans*- β -cariofileno, resultó citotóxico en todo el rango de concentraciones evaluadas (entre 918 – 14680 μM); es decir, destruyó las membranas de los fibroblastos humanos a todas esas concentraciones. Por el contrario, los compuestos escualeno y kaempferol mostraron valores de viabilidad celular superiores al 65% para todas las concentraciones estudiadas (Figura 3). En estos dos casos, no se pudo calcular por interpolación el correspondiente valor CC_{50} .

Varios de los compuestos aquí estudiados han mostrado efectos citotóxicos en diferentes modelos celulares (Tabla 6).

Tabla 6.

Reportes previos sobre la toxicidad de los compuestos fitoquímicos estudiados.

Compuestos	Plantas de origen en Colombia	Efectos tóxicos descritos	Tratamiento	Referencias
Ácido cafeico	<i>Coffea arabica</i>	Citotóxico en líneas de carcinoma de hígado (HCC) de humano.	500 μ M	Brautigan et al., 2018
Ácido clorogénico	<i>Ipomoea horsfalliae</i> <i>Posoqueria latifolia</i>	Citotóxico en línea de cáncer de hígado (HepG2) humano.	100 μ M	Granado-Serrano et al., 2007
Ácido dicafeoilquínico	<i>Ipomoea horsfalliae</i>	Efecto inhibitorio en líneas de cáncer de mamas (MCF-7, MDA-MB-231) y de próstata (DU-145) de humano.	50 – 100 μ M 80 – 160 μ M	Lodise et al., 2019 Zhou et al., 2020
Apigenina	<i>Lippia organoides</i>	Anticlastogénico en 42ancrea de hámster V79. Citotóxico en células de cáncer colorrectal, de mama, hígado, pulmón, melanoma, cáncer de próstata y osteosarcoma	25-50 μ g/mL Dependiendo de la línea celular de 10 a 80 μ M	Siddique et al., 2010 Yan et al., 2017
<i>trans</i> - β -Cariofileno	<i>Achyrocline satureioides</i> <i>Chromolaena peltia</i> <i>Lippia organoides</i>	Citotóxico en línea celular de leucemia (THP-1) humana y en línea celular de riñón (VERO) de mono verde africano.	143.85 μ g/mL 12.93 μ g/mL	Leal et al., 2013
Curcumina	<i>Curcuma longa</i>	No mutagénico ni genotóxico en humanos, especialmente en administración oral. En cultivos en células normales, la proliferación y viabilidad pueden verse afectadas y reducidas.	10 a 50 μ M	Soleimani et al., 2018
Escualeno	<i>Chromolaena peltia</i>	No citotóxico en líneas de cáncer de mamas (MCF7, MDA-MB-231) y en control celular no canceroso (MCF10A) de humanos.	5 a 40 μ M	Warleta et al., 2010

Kaempferol	<i>Rosa x centifolia</i> (rosada)	Toxicidad baja en células cancerígenas de vejiga y próstata.	25 a 100 μM	Crocetto et al., 2021 Wu et al., 2018
	<i>Rosa x centifolia</i> (roja)	Citotóxico en línea celular cancerosa PC-3.	1.0–2.3 μM	
Kaempferol-3-glucósido	<i>Rosa x centifolia</i> (rosada)	Citotóxico en células cancerígenas de leucemia (HL-60), hepatocelular (HepG2, Huh-7 y H22) piel (HaCaT, A375P y SK-MEL-2) y células cancerosas de pulmón (A549 y H1299).	No se especifica	Riaz et al., 2018
	<i>Rosa x centifolia</i> (roja)			
Naringenina	<i>Lippia origanoides</i>	Citotóxico en líneas de cáncer de cerebro (U-118 MG), de hígado (HepG2), de mamas (MDA-MB-231, SKBR3), de piel (B16F10) y de próstata (PC3, LNCaP) de humano.	211 μM 100–200 μM 250 μM 25–100 μM 5–50 μM	Salehi et al., 2019
Pinocembrina	<i>Lippia origanoides</i>	Citotóxico en línea de cáncer de próstata (LNCaP) de humano.	Superior a 100 μM	Chen et al., 2013
Quercetina	<i>Rosa x centifolia</i> (rosada)	Mutagénico en células bacterianas, levaduras, células de hámster y ratas. Genotoxicidad en células V79 y células germinales en ratones.	Superior a 100 μM Superior a 25 μM	Engen et al., 2015 Gaspar et al., 1994
Resveratrol	<i>Posoqueria latifolia</i>	Citotóxico en líneas de cancer leucémico linfoides y mieloides (linfocitos B, linfocitos T, BJAB, HL-60, AML, THP-1, U-937), de mamas (KPL-1, MCF-7, MCF-10F, MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB-468, 4T1, T47D), de colon (Caco-2, col-2, F344, HCT116, SW480), de estómago (KATO-III, RF-1, SNU-1), esófago (EC-9706), 43ancreas (DU145, LnCaP, PC-3), de piel (A375, A431, SK-mel28), de pulmón (BEP2D, A549), de hígado (Fao, HepG2, AH 109A),	No se especifica	Aggarwal et al., 2004

Estos hallazgos, de conjunto con los resultados del presente estudio, indican que el ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido dicafeoilquínico, *trans-β*-cariofileno, naringenina, pinocembrina, apigenina y el resveratrol, pueden ser citotóxicos en células humanas; en el caso del *trans-β*-cariofileno, también de otros mamíferos. En tal sentido, se recomienda ampliar sus estudios de toxicidad *in vitro* e *in vivo*, antes de que dicho extracto sea usado en formulaciones cosméticas. Según la revisión realizada, no existen o existen pocos reportes sobre toxicidad de los restantes compuestos estudiados (kaempferol, kaempferol-3-glucósido, curcumina, escualeno, quercetina), soportando la necesidad ampliar tales estudios de toxicidad.

Las diferencias observadas en la citotoxicidad de extractos obtenidos por extracción de fluidos (CO₂) supercríticos y aquellos obtenidos mediante extracción hidroalcohólica (etanol), se debe posiblemente a diferencias en la composición de tales extractos. Los extractos hidroalcohólicos favorecen la extracción de compuestos polares (Navarro et al., 2017); mientras que las extracciones de fluidos (CO₂) supercrítico son mucho más complejas en su composición. En tal sentido, Fernández et al. (2022) observaron mayor citotoxicidad en el extracto obtenido de inflorescencias de *Cannabis* mediante extracción de fluido supercrítico, que el obtenido mediante extracción hidroalcohólica (etanol).

Por su potencial utilidad como filtros solares (datos no mostrados), se evaluaron para su genotoxicidad seis de los doce compuestos previamente descritos. Los compuestos escualeno y kaempferol 3-glucosido resultaron no genotóxico en el rango de concentraciones evaluadas; mientras que la apigenina, el kaempferol y el resveratrol mostraron daño escaso ($1 < \text{GDI} < 2$) a concentraciones citotóxicas. No se encontró en la literatura revisada, reportes que evidencien

genotoxicidad en los compuestos antes indicados, reforzando la necesidad de nuevos estudios que soporten su inocuidad en humanos. Por el contrario, la quercetina mostró moderada genotoxicidad a la concentración más alta evaluada evidenciando, como en previos hallazgos (J. da Silva et al., 2002; Engen et al., 2015; Gaspar et al., 1994), su marcado efecto genotóxico.

Varios de los compuestos aquí estudiados para su citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas humanas son conocidos por su alto potencial farmacológico y cosmético (ver Anexo 3). De acuerdo con nuestros hallazgos, los compuestos escualeno y kaempferol 3-glucosido son inocuos para los fibroblastos humanos; mientras que la apigenina, el kaempferol, la quercetina y el resveratrol también lo son dependiendo de su concentración. La baja citotoxicidad y genotoxicidad de estos compuestos indican la conveniencia de su uso en cosmética por su potencial como fotoprotector frente a la radiación solar.

Al igual que en estudios anteriores (Albert et al., 2016; Ge et al., 2015; Gutzkow et al., 2013; Sykora et al., 2018), este trabajo demostró la utilidad de la plataforma de microplacas de 96 pocillos de alto rendimiento para pruebas de inocuidad de fitoquímicos (extractos y compuestos) en fibroblastos humanos incrementando la capacidad de escrutinio del ensayo Cometa en 40 veces. Adicionalmente, el trabajo aportó información valiosa y robusta sobre la citotoxicidad y genotoxicidad de extractos y compuestos vegetales en la línea celular de fibroblastos MRC5, de los cuales no se posee información previa en este modelo.

Por último, aquí se reemplazó la lisis alcalina de las células por enzimática (con proteinasa K), ya que la lisis alcalina produjo altos niveles de roturas de ADN en células de fibroblastos no

tratadas como observaron previamente García Forero et al. (2019). Se ha demostrado que la proteinasa K también digiere proteínas asociadas a los núcleos (Merk et al., 2000; Singh, 2000), acción que facilita el desenrollamiento del ADN al igual que los tratamientos alcalinos. Nuestro trabajo demuestra que la lisis enzimática y la incubación alcalina previa a la electroforesis son suficientes para desenrollar el ADN como se mostró previamente en células bucales (Rojas et al., 1996), queratinocitos (Decome et al., 2005) y espermatozoides (Baumgartner et al., 2009) humanos.

6. Conclusiones

El trabajo mostró que los extractos de *P. eriopodon*, *C. moritzianus*, *P. sartorianum*, *S. aratocensis* son citotóxicos en células de fibroblastos humanos. Los extractos de *C. pellia*, *A. satureioides*, *I. horsfalliae*, *R. centifolia* y *L. origanoides* mostraron diferentes grados de toxicidad (CC₅₀) así: *L. origanoides* (89 µg/mL) > *A. satureioides* (173 µg/mL) > *C. pellia* (184 µg/mL) > *I. horsfalliae* (398 µg/mL) > *R. centifolia* rosada (492 µg/mL) > *R. centifolia* roja (702 µg/mL). El extracto de *P. latifolia* fue el único que resultó no citotóxico para los fibroblastos humanos en todo el rango de concentraciones estudiado.

De todos los compuestos vegetales estudiados, el *trans*- β -cariofileno fue el único que resultó citotóxico para los fibroblastos en todo el rango de concentraciones estudiado. Los siguientes compuestos mostraron diferente grado de citotoxicidad (CC₅₀) así: curcumina (11 µM) > resveratrol (91 µM) > pinocembrina (144 µM) > ácido dicafeoilquínico (147 µM) > quercetina (222 µM) > apigenina (226 µM) > naringenina (272 µM) > ácido clorogénico (273 µM) > ácido

cafeico (500 μM) > kaempferol-3-glucósido (676 μM). Los compuestos escualeno y kaempferol fueron los únicos que fueron inocuos para los fibroblastos en el rango de concentraciones evaluadas.

Excepto por *A. saturoioides* y *P. latifolia*, todos los extractos vegetales mostraron algún grado de genotoxicidad entre baja y moderada para el rango de concentración estudiada en cada caso. Los extractos de *Ipomoea horsfalliae* y *R. centifolia* mostraron genotoxicidad en los fibroblastos humanos a concentraciones no citotóxicas. Excepto por escualeno y kaempferol 3-glucosido, todos los compuestos mostraron algún grado de genotoxicidad entre baja y moderada para el rango de concentración estudiada en cada caso; sin embargo, ningún compuesto estudiado resultó genotóxico a concentraciones no citotóxicas.

El ensayo Cometa desarrollado en la plataforma CometChip® permitió una mejor tipificación del daño genético e incrementó en 40 veces la capacidad de escrutinio del ensayo, respecto al método tradicional desarrollado sobre láminas. El daño genético detectado en plataforma CometChip® mostró una correlación con la concentración del compuesto, superior a la observada con el método tradicional; indicando la conveniencia del uso de la plataforma CometChip® para este ensayo.

El trabajo indicó la necesidad de establecer concentraciones seguras de los extractos y compuestos vegetales para su uso potencial en cosmética. Es decir, los extractos y compuestos de plantas deben usarse en concentraciones no citotóxicas (valores $\leq \text{CC}_{30}$) y no genotóxicas (valores $\text{GDI} \leq 1$). Adicionalmente, los datos de trabajo fueron obtenidos usando como modelo los

fibroblastos humanos. Por tanto, será necesario la evaluación de tales fitoquímicos en otros modelos de células de la piel (Ej: queratinocitos, melanocitos) antes que estos sean usados para fotoprotección en humanos.

7. Agradecimientos

Agradecemos el financiamiento del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, Ministerio de Educación, Ministerio de Industria, Comercio y Turismo e ICETEX, al Programa *Ecosistema Científico – Colombia científica*, del Fondo *Francisco José de Caldas*, Beca RC-FP44842-212-2018. El Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de Colombia apoyó a la Universidad Industrial de Santander a través de permisos de acceso a recursos genéticos y derivados para bioprospección (Contrato N° 270). Agradecemos a Carlos Frederico Martins Menck de la Universidad de Sao Paulo por suministrar la línea celular de fibroblastos humanos (MRC5).

8. Referencias bibliográficas

- Aggarwal, B. B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R. S., Seeram, N. P., Shishodia, S., & Takada, Y. (2004). Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer research*, 24(5A), 2783-2840. <https://ar.iiarjournals.org/content/24/5A/2783>
- Aguilar-Vega, L., Camacho, S. P. D., Delgado, F., Willms, K., & Zurabian, R. (2016). Methanol extract from *Psidium sartorianum* (arrayán) berries induces in vitro damage on *Taenia crassiceps* WFU cysticerci. *International Journal of Herbal Medicine*, 4(5), 30-35.
- Albert, O., Reintsch, W. E., Chan, P., & Robaire, B. (2016). HT-COMET: a novel automated approach for high throughput assessment of human sperm chromatin quality. *Human Reproduction*, 31(5), 938-946. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEW030>
- Ali, F., Rahul, Naz, F., Jyoti, S., & Siddique, Y. H. (2017). Health functionality of apigenin: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(6), 1197-1238. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1207188>
- Allison, A. C. (1999). Squalene and Squalane Emulsions as Adjuvants. *Methods*, 19(1), 87-93. <https://doi.org/10.1006/METH.1999.0832>
- Ara, N., Nur, M. H., Amran, M. S., Wahid, M. I. I., & Ahmed, M. (2009). In vitro antimicrobial and cytotoxic activities of leaves and flowers extracts from *Lippia alba*. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 12(1), 87-90. <https://doi.org/10.3923/PJBS.2009.87.90>
- Arablou, T., & Kolahdouz-Mohammadi, R. (2018). Curcumin and endometriosis: Review on potential roles and molecular mechanisms. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 97, 91-97. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.119>

- Balestrin, L. A., Kreutz, T., Fachel, F. N. S., Bidone, J., Gelsleichter, N. E., Koester, L. S., Bassani, V. L., Braganhol, E., Dora, C. L., & Teixeira, H. F. (2021). Achyrocline satureioides (Lam.) DC (Asteraceae) Extract-Loaded Nanoemulsions as a Promising Topical Wound Healing Delivery System: In Vitro Assessments in Human Keratinocytes (HaCaT) and HET-CAM Irritant Potential. *Pharmaceutics*, *13*(8), 1241. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13081241>
- Baumgartner, A., Cemeli, E., & Anderson, D. (2009). The comet assay in male reproductive toxicology. *Cell Biology and Toxicology*, *25*(1), 81–98. <https://doi.org/10.1007/S10565-007-9041-Y>
- Baur, J. A., & Sinclair, D. A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *5*(6), 493–506. <https://doi.org/10.1038/NRD2060>
- Bianchi, S. E., Pegues, M. A., Dias, C. K., Mascia, F., Doneda, E., Pittol, V., Rao, V. A., Klamt, F., & Bassani, V. L. (2020). Achyrocline satureioides compounds, achyrobichalcone and 3-O-methylquercetin, induce mitochondrial dysfunction and apoptosis in human breast cancer cell lines. *IUBMB Life*, *72*(10), 2133–2145. <https://doi.org/10.1002/IUB.2348>
- Boo, Y. C. (2019). Human Skin Lightening Efficacy of Resveratrol and Its Analogs: From in Vitro Studies to Cosmetic Applications. *Antioxidants* *8*(9), 332. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX8090332>
- Brautigan, D. L., Gielata, M., Heo, J., Kubicka, E., & Wilkins, L. R. (2018). Selective toxicity of caffeic acid in hepatocellular carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *505*(2), 612–617. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2018.09.155>
- Bueno, J., Escobar, P., Martínez, J. R., Leal, S. M., & Stashenko, E. E. (2011). Composition of three essential oils, and their mammalian cell toxicity and antimycobacterial activity

- against drug resistant-tuberculosis and nontuberculous mycobacteria strains. *Natural product communications*, 6(11), 1743–1748.
<https://doi.org/10.1177/1934578X1100601143>
- Caballero-Gallardo, K., Olivero-Verbel, J., & Stashenko, E. E. (2012). Repellency and toxicity of essential oils from *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon flexuosus* and *Lippia origanoides* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*. *Journal of Stored Products Research*, 50, 62–65. <https://doi.org/10.1016/J.JSPR.2012.05.002>
- Capasso, R., Izzo, A. A., Pinto, L., Bifulco, T., Vitobello, C., & Mascolo, N. (2000). Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia*, 71(SUPPL. 1), S58–S65.
[https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(00\)00173-8](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00173-8)
- Chen, Z., Rasul, A., Zhao, C., Millimouno, F. M., Tsuji, I., Yamamura, T., Iqbal, R., Malhi, M., Li, X., & Li, J. (2013). Antiproliferative and apoptotic effects of pinocembrin in human prostate cancer cells. */// Bangladesh Journal of Pharmacology ///*, 8(3), 255–262.
<https://doi.org/10.3329/BJP.V8I3.14795>
- Collins, A., Dušinská, M., Franklin, M., Somorovská, M., Petrovská, H., Duthie, S., Fillion, L., Panayiotidis, M., Rašlová, K., & Vaughan, N. (1997). Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 30(2), 139–146. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2280\(1997\)30:2<139::aid-em6>3.0.co;2-i](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2280(1997)30:2<139::aid-em6>3.0.co;2-i)
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular biotechnology*, 26(3), 249–261.
<https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>

- Cosentino, M., Bombelli, R., Carcano, E., Luini, A., Marino, F., Crema, F., Dajas, F., & Lecchini, S. (2008). Immunomodulatory properties of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. infusion: A study on human leukocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, *116*(3), 501–507. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.12.014>
- Crocetto, F., di Zazzo, E., Buonerba, C., Aveta, A., Pandolfo, S. D., Barone, B., Trama, F., Caputo, V. F., Scafuri, L., Ferro, M., Cosimato, V., Fusco, F., Imbimbo, C., & Di Lorenzo, G. (2021). Kaempferol, myricetin and fisetin in prostate and bladder cancer: A systematic review of the literature. *Nutrients*, *13*(11), 3750. <https://doi.org/10.3390/nu13113750>
- Da Silva, J., Herrmann, S. M., Heuser, V., Peres, W., Possa Marroni, N. P., González-Gallego, J., & Erdtmann, B. (2002). Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food and Chemical Toxicology*, *40*(7), 941–947. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00015-7](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00015-7)
- De Souza, P. O., Bianchi, S. E., Figueiró, F., Heimfarth, L., Moresco, K. S., Gonçalves, R. M., Hoppe, J. B., Klein, C. P., Salbego, C. G., Gelain, D. P., Bassani, V. L., Zanotto Filho, A., & Moreira, J. C. F. (2018). Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureioides* in gliomas cell lines. *Toxicology in Vitro*, *51*, 23–33. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2018.04.013>
- Decome, L., De Méo, M., Geffard, A., Doucet, O., Duménil, G., & Botta, A. (2005). Evaluation of photolyase (Photosome®) repair activity in human keratinocytes after a single dose of ultraviolet B irradiation using the comet assay. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *79*(2), 101–108. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2004.11.022>

- Delprete, P. G. (2009). Taxonomic History, Morphology, and Reproductive Biology of the Tribe Posoquerieae (Rubiaceae, Ixoroideae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 96(1), 79–89. <https://doi.org/10.3417/2006192>
- Derseh, H. B., Goodger, J. Q. D., Scheerlinck, J. P. Y., Samuel, C. S., Woodrow, I. E., Palombo, E. A., Cumming, A., & Snibson, K. (2021). The efficacy and safety of pinocembrin in a sheep model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Plos one*, 16(12), e0260719. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260719>
- Engen, A., Maeda, J., Wozniak, D. E., Brents, C. A., Bell, J. J., Uesaka, M., Aizawa, Y., & Kato, T. A. (2015). Induction of cytotoxic and genotoxic responses by natural and novel quercetin glycosides. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 784–785, 15–22. <https://doi.org/10.1016/J.MRGENTOX.2015.04.007>
- Fennell, C. W., Lindsey, K. L., McGaw, L. J., Sparg, S. G., Stafford, G. I., Elgorashi, E. E., Grace, O. M., & Van Staden, J. (2004). Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. *Journal of Ethnopharmacology* 94(2–3), 205–217. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.05.012>
- Fernández, S., Carreras, T., Castro, R., Perelmuter, K., Giorgi, V., Vila, A., Rosales, A., Pazos, M., Moyna, G., Carrera, I., Bollati-Fogolín, M., García-Carnelli, C., Carrera, I. & Vieitez, I. (2022). A comparative study of supercritical fluid and ethanol extracts of cannabis inflorescences: Chemical profile and biological activity. *The Journal of Supercritical Fluids*, 179, 105385.
- Fimognari, C., Ferruzzi, L., Turrini, E., Carulli, G., Lenzi, M., Hrelia, P., & Cantelli-Forti, G. (2012). Metabolic and toxicological considerations of botanicals in anticancer therapy.

- Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 8(7), 819-832.
<https://doi.org/10.1517/17425255.2012.685717>
- Frieauff, W., Hartmann, A., & Suter, W. (2001). Automatic analysis of slides processed in the Comet assay. *Mutagenesis*, 16(2), 133–137. <https://doi.org/10.1093/MUTAGE/16.2.133>
- Frötschl, R. (2015). Experiences with the in vivo and in vitro comet assay in regulatory testing. *Mutagenesis*, 30(1), 51–57. <https://doi.org/10.1093/MUTAGE/GEU069>
- Fuentes, J. L., Pedraza Barrera, C. A., Villamizar Mantilla, D. A., Flórez González, S. J., Sierra, L. J., Ocazonez, R. E., & Stashenko, E. E. (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. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27175525>
- Fuentes, J. L., Villamizar Mantilla, D. A., Florez González, S. J., Núñez, L. A., & Stashenko, E. E. (2021). Plants growing in Colombia as sources of active ingredients for sunscreens. *International Journal of Radiation Biology*, 97(12), 1705–1715. <https://doi.org/10.1080/09553002.2021.1987564>
- García Forero, A., Villamizar Mantilla, D. A., Núñez, L. A., Ocazonez, R. E., Stashenko, E. E., & Fuentes, J. L. (2019). Photoprotective and Antigenotoxic Effects of the Flavonoids Apigenin, Naringenin and Pinocembrin. *Photochemistry and Photobiology*, 95(4), 1010–1018. <https://doi.org/10.1111/PHP.13085>
- Gaspar, J., Rodrigues, A., Laires, A., Silva, F., Costa, S., Monteiro, M. J., Monteiro, C., & Rueff, J. (1994). On the mechanisms of genotoxicity and metabolism of quercetin. *Mutagenesis*, 9(5). <https://doi.org/10.1093/mutage/9.5.445>

- Ge, J., Chow, D. N., Fessler, J. L., Weingeist, D. M., Wood, D. K., & Engelward, B. P. (2015). Micropatterned comet assay enables high throughput and sensitive DNA damage quantification. *Mutagenesis*, *30*(1), 11–19. <https://doi.org/10.1093/mutage/geu063>
- Gerasimova, T., Topashka-Ancheva, M., Dobрева, A., Georgieva, A., & Mileva, M. (2022). Evaluation of the genotoxic activity of wastewater obtained after steam distillation of essential oil of Bulgarian *Rosa alba* L.—In vivo study. *Rom. Biotechnol. Lett.*, *27*(1), 3292-3301. doi: 10.25083/rbl/27.1/3292-3301
- Ghelardini, C., Galeotti, N., Mannelli, L. D. C., Mazzanti, G., & Bartolini, A. (2001). Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. *Il Farmaco*, *56*(5-7), 387-389. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(01\)01092-8](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(01)01092-8)
- Gonçalves, G. G., Ferreira, M. I., & Ming, L. C. (2018). *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. *Medicinal and Aromatic Plants of South America: Brazil*, 81-88. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1552-0_5
- Granado-Serrano, A. B., Martín, M. A., Izquierdo-Pulido, M., Goya, L., Bravo, L., & Ramos, S. (2007). Molecular mechanisms of (-)-epicatechin and chlorogenic acid on the regulation of the apoptotic and survival/proliferation pathways in a human hepatoma cell line. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(5), 2020–2027. <https://doi.org/10.1021/JF062556X/ASSET/IMAGES/LARGE/JF062556XF00005.JPEG>
- Gutzkow, K. B., Langleite, T. M., Meier, S., Graupner, A., Collins, A. R., & Brunborg, G. (2013). High-throughput comet assay using 96 minigels. *Mutagenesis*, *28*(3), 333–340. <https://doi.org/10.1093/mutage/get012>

- Henderson, L., Wolfreys, A., Fedyk, J., Bourner, C., & Windebank, S. (1998). The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis*, *13*(1), 89–94. <https://doi.org/10.1093/MUTAGE/13.1.89>
- Hu, S., Chen, F., & Wang, M. (2015). Photoprotective effects of oxyresveratrol and Kuwanon O on DNA damage induced by UVA in human epidermal keratinocytes. *Chemical research in toxicology*, *28*(3), 541–548. <https://doi.org/10.1021/TX500497U>
- Huang, K. K., Lin, M. N., Hsu, H. C., Hsu, Y. L., Huang, T. N., Lu, I. H., & Pan, I. H. (2022). Pinocembrin Reduces Keratinocyte Activation and Ameliorates Imiquimod-Induced Psoriasis-like Dermatitis in BALB/c Mice through the Heme Oxygenase-1/Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/7729836>
- Huang, Z. R., Lin, Y. K., & Fang, J. Y. (2009). Biological and Pharmacological Activities of Squalene and Related Compounds: Potential Uses in Cosmetic Dermatology. *Molecules*, *14*(1), 540–554. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES14010540>
- Imafidon, K.E., Durojaiye, M., A., & Daniel B. O. (2015). SAFETY ASSESSMENT OF IPOMOEA BATATAS (L). LAM LEAF EXTRACT, A TRADITIONAL HAEMATINIC; IN MALE WISTAR RATS. *Journal of Ghana Science Association*, *16*(2), 45-51.
- Jacobs, J. P., Jones, C. M., & Baille, J. P. (1970). Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature*, *227*(5254), 168–170. <https://doi.org/10.1038/227168A0>
- Kelly, G. S. (1999). Squalene and its potential clinical uses. *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic*, *4*(1), 29–36. <https://europepmc.org/article/med/9988781>

- Kim, K. B., Kwack, S. J., Lee, J. Y., Kacew, S., & Lee, B. M. (2021). Current opinion on risk assessment of cosmetics. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 24(4), 137-161. <https://doi.org/10.1080/10937404.2021.1907264>
- Kohno, Y., Egawa, Y., Itoh, S., Nagaoka, S.I., Takahashi, M., & Mukai, K. (1995). Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1256(1), 52–56. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(95\)00005-W](https://doi.org/10.1016/0005-2760(95)00005-W)
- Koppen, G., Azqueta, A., Pourrut, B., Brunborg, G., Collins, A. R., & Langie, S. A. (2017). The next three decades of the comet assay: a report of the 11th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*, 32(3), 397–408. <https://doi.org/10.1093/MUTAGE/GEX002>
- Leal, S. M., Pino, N., Stashenko, E. E., Martínez, J. R., & Escobar, P. (2013). Antiprotozoal activity of essential oils derived from Piper spp. grown in Colombia. *Journal of Essential Oil Research*, 25(6), 512–519. <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.820669>
- Lee, K. H., Do, H. K., Kim, D. Y., & Kim, W. (2021). Impact of chlorogenic acid on modulation of significant genes in dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 583, 22–28. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2021.10.057>
- Lodise, O., Patil, K., Karshenboym, I., Prombo, S., Chukwueke, C., & Pai, S. B. (2019). Inhibition of prostate cancer cells by 4,5-dicaffeoylquinic acid through cell cycle arrest. *Prostate Cancer*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4520645>
- Majma Sanaye, P., Mojaveri, M. R., Ahmadian, R., Sabet Jahromi, M., & Bahramsoltani, R. (2022). Apigenin and its dermatological applications: A comprehensive review. *Phytochemistry*, 203, 113390. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2022.113390>

- Megret, F. L. R., Correa, D. T., Carriquiri, J. A. A., Dos Santos, G. P., Busi, M. M., & Méndez, F. D. (2013). *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (marcela) reduces brain damage in permanent focal ischemia in rats. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, *18*(3). <http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/23/26>
- Merk, O., Reiser, K., & Speit, G. (2000). Analysis of chromate-induced DNA-protein crosslinks with the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *471*(1–2), 71–80. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(00\)00110-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(00)00110-8)
- Mileva, M., Ilieva, Y., Jovtchev, G., Gateva, S., Zaharieva, M. M., Georgieva, A., Dimitrova, L., Dobreva, A., Angelova, T., Vilhelmova-Ilieva, N., Valcheva, V., & Najdenski, H. (2021). Rose Flowers—A Delicate Perfume or a Natural Healer? *Biomolecules*, *11*(1), 127. <https://doi.org/10.3390/BIOM11010127>
- Murakoshi, M., Nishino, H., Tokuda, H., Iwashima, A., Okuzumi, J., Kitano, H., & Iwasaki, R. (1992). Inhibition by squalene of the tumor-promoting activity of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse-skin carcinogenesis. *International Journal of Cancer*, *52*(6), 950–952. <https://doi.org/10.1002/IJC.2910520620>
- Narayan B. H., Tatewaki, N., Nishida, H., & Konishi, T. (2010). Squalene as Novel Food Factor. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *11*(8), 875–880. <https://doi.org/10.2174/138920110793262088>
- Navarro-Salcedo, M. H., Delgado-Saucedo, J. I., Siordia-Sánchez, V. H., Gonzalez-Ortiz, L. J., Castillo-Herrera, G. A., & Puebla-Perez, A. M. (2017). *Artemisia dracunculus* extracts obtained by organic solvents and supercritical CO₂ produce cytotoxic and antitumor effects in mice with L5178Y lymphoma. *Journal of Medicinal Food*, *20*(11), 1076–1082.

- Neira, L. F., Stashenko, E., & Escobar, P. (2014). Actividad antiparasitaria de extractos de plantas colombianas de la familia Euphorbiaceae. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 46(1), 15-22.
<https://revistas.uis.edu.co/index.php/revistasaluduis/article/view/4206/5313>
- Nerio, L. S., Olivero-Verbel, J., & Stashenko, E. E. (2009). Repellent activity of essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera). *Journal of Stored Products Research*, 45(3), 212–214.
<https://doi.org/10.1016/J.JSPR.2009.01.002>
- Nikolić, M., Marković, T., Marković, D., Calhelha, R. C., Fernandes, Â., Ferreira, I. C. F. R., Stojković, D., Ćirić, A., Glamočlija, J., & Soković, M. (2021). Chemical composition and biological properties of *Pelargonium graveolens*, *Leptospermum petersonii* and *Cymbopogon martinii* var. *motia* essential oils and of *Rosa centifolia* absolute. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 86(12), 1291–1303.
<https://doi.org/10.2298/JSC210729096N>
- Nogueira-Sobrinho, A. C. N., de Moraes, S. M., de Souza, E. B., & dos Santos Fontenelle, R. O. (2017). The genus *Eupatorium* L. (Asteraceae): A review of their antimicrobial activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, 11(3), 43–57.
<https://doi.org/10.5897/JMPR2016.6313>
- Oliveira, D. R., Leitão, G. G., Fernandes, P. D., & Leitão, S. G. (2014). Ethnopharmacological studies of *Lippia organoides*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(2), 206–214.
<https://doi.org/10.1016/J.BJP.2014.03.001>
- Olivero-Verbel, J., Güette-Fernández, J., & Stashenko, E. (2009). Acute toxicity against *Artemia franciscana* of essential oils isolated from plants of the genus *Lippia* and *Piper* collected

- in Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(5), 419-427.
- Pauwels, M., & Rogiers, V. (2010). Human health safety evaluation of cosmetics in the EU: a legally imposed challenge to science. *Toxicology and applied pharmacology* 243(2), 260–274. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.12.007>
- Pfuhler, S., Fautz, R., Ouedraogo, G., Latil, A., Kenny, J., Moore, C., Diembeck, W., Hewitt, N. J., Reisinger, K., & Barroso, J. (2014). The Cosmetics Europe strategy for animal-free genotoxicity testing: Project status up-date. *Toxicology in Vitro*, 28(1), 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.06.004>
- Pfuhler, S., Kirst, A., Aardema, M., Banduhn, N., Goebel, C., Araki, D., Costabel-Farkas, M., Dufour, E., Fautz, R., Harvey, J., Hewitt, N. J., Hibatallah, J., Carmichael, P., Macfarlane, M., Reisinger, K., Rowland, J., Schellauf, F., Schepky, A., & Scheel, J. (2010). A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: Genotoxicity. A COLIPA analysis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 57(2–3), 315–324. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2010.03.012>
- Pitarque, M., Creus, A., Marcos, R., Hughes, J. A., & Anderson, D. (1999). Examination of various biomarkers measuring genotoxic endpoints from Barcelona airport personnel. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 440(2), 195–204. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(99\)00026-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(99)00026-1)
- Prinsloo, G., Nogemane, N., & Street, R. (2018). The use of plants containing genotoxic carcinogens as foods and medicine. *Food and Chemical Toxicology*, 116, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.009>

- Raposo-Borges, A., de Albuquerque Aires, J. R., Higino, T. M. M., de Medeiros, M. das G. F., Lopes-Citó, A. M. D. G., Lopes, J. A. D., & de Figueiredo, R. C. B. Q. (2012). Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. *Experimental Parasitology*, *132*(2), 123–128. <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2012.06.003>
- Rao, P. S., Subramanayam, G., & Sridhar, P. R. (2018). Kaempferol 3-glucoside from *Azadirachta indica*. *J Biochem Biophy*, *2*(1), 102.
- R Core Team, R. (2013). R: A language and environment for statistical computing. Available online: <http://www.R-project.org> (accessed on 31 03 2022).
- Riaz, A., Rasul, A., Hussain, G., Zahoor, M. K., Jabeen, F., Subhani, Z., Younis, T., Ali, M., Sarfraz, I., & Selamoglu, Z. (2018). Astragalin: A Bioactive Phytochemical with Potential Therapeutic Activities. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9794625>
- Rojas, E., Valverde, M., Sordo, M., & Ostrosky-Wegman, P. (1996). DNA damage in exfoliated buccal cells of smokers assessed by the single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, *370*(2), 115–120. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(96\)00062-6](https://doi.org/10.1016/0165-1218(96)00062-6)
- Salehi, B., Fokou, P. V. T., Sharifi-Rad, M., Zucca, P., Pezzani, R., Martins, N., & Sharifi-Rad, J. (2019). The Therapeutic Potential of Naringenin: A Review of Clinical Trials, *12*(1). <https://doi.org/10.3390/PH12010011>
- Siddique, Y. H., Ara, G., Beg, T., & Afzal, M. (2010). Anticlastogenic effect of apigenin in human lymphocytes treated with ethinylestradiol. *Fitoterapia*, *81*(6), 590–594. <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2010.02.003>

- Sierra, L. J., Córdoba, Y., Mejía, J. J., Rueda, E. Q., Ocazonez, R. E., Avila-Acevedo, J. G., García-Bores, A. M., Espinosa-González, A. M., del Carmen Benítez-Flores, J., del Rosario González-Valle, M., Martínez, J. R., & Stashenko, E. E. (2020). Photoprotective Activity of *Ipomoea horsfalliae* Flower Extract. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 30(1), 69–79. <https://doi.org/10.1007/S43450-020-00024-6/FIGURES/4>
- Silva, F. M., de Oliveira, F. C. de, Camelo, A. L. M., de Souza, F. T. C. de, Longhinotti, E., Barbosa, F. G., & Nascimento, R. F. (2017). Validação de métodos por CG-EM para análise de carvacrol e trans- β -cariofileno em amostras comerciais contendo óleos essenciais. *Revista Virtual de Química*, 9(3). <https://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/1878>
- Singh, N. P. (2000). Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1–2), 111–127. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00075-0](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00075-0)
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Sivira, A., Sanabria, M. E., Valera, N., & Vásquez, C. (2011). Toxicity of ethanolic extracts from *Lippia origanoides* and *Gliricidia sepium* to *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acari: Tetranychidae). *Neotropical Entomology*, 40(3), 375–379. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2011000300011>
- Soares, D. C., Portella, N. A., Ramos, M. F. D. S., Siani, A. C., & Saraiva, E. M. (2013). Trans- β -caryophyllene: An effective antileishmanial compound found in commercial copaiba

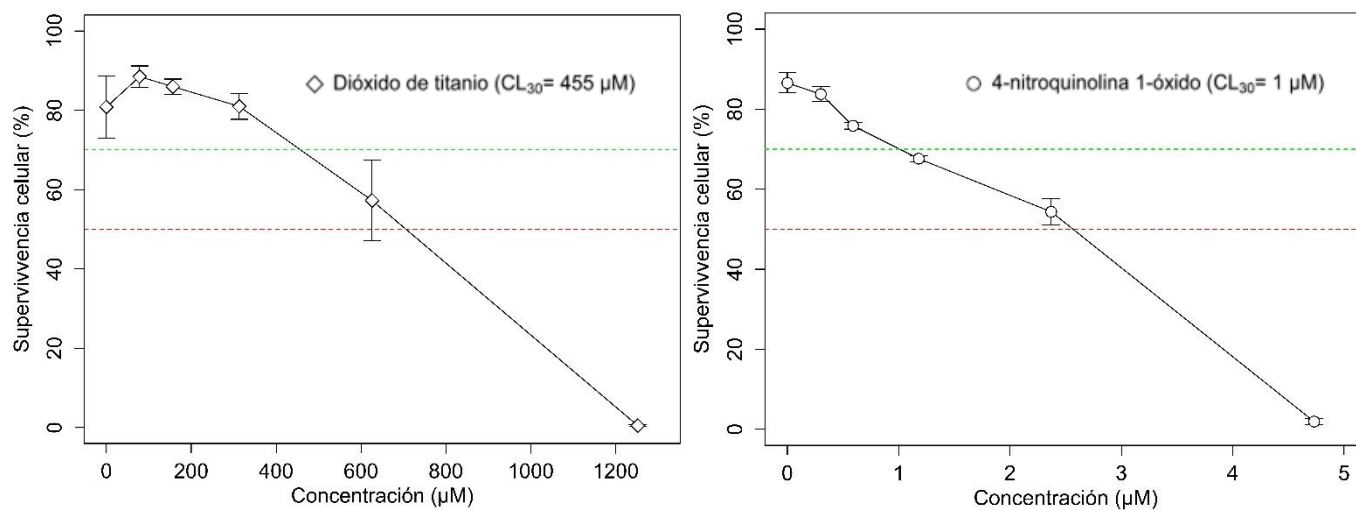
- Oil (*Copaifera* spp.). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
<https://doi.org/10.1155/2013/761323>
- Soleimani, V., Sahebkar, A., & Hosseinzadeh, H. (2018). Turmeric (*Curcuma longa*) and its major constituent (curcumin) as nontoxic and safe substances: Review. *Phytotherapy Research*, 32(6), 985–995. <https://doi.org/10.1002/PTR.6054>
- Sousa, O. V., Del-Vechio-Vieira, G., Almeida, B. H., Miranda, M. A., Filgueiras, R. C., Campos, A. C., & Silvério, M. S. (2007). Efeitos farmacológicos e toxicológicos do extrato de *Posoqueria acutifolia* Mart. (Rubiaceae) em roedores. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 28(1).
<http://rcfba.fcfar.unesp.br/index.php/ojs/article/view/535>
- Sponchiado, G., Adam, M. L., Silva, C. D., Soley, B. S., de Mello-Sampayo, C., Cabrini, D. A., Correr, C. J., & Otuki, M. F. (2016). Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. *Journal of Ethnopharmacology*, 178, 289–296.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.10.026>
- Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*, 111(1), A3.B.1-A3.B.3.
<https://doi.org/10.1002/0471142735.IMA03BS111>
- Sykora, P., Witt, K. L., Revanna, P., Smith-Roe, S. L., Dismukes, J., Lloyd, D. G., Engelward, B. P., & Sobol, R. W. (2018). Next generation high throughput DNA damage detection platform for genotoxic compound screening. *Scientific Reports*, 8(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-20995-w>
- Taleb-Contini, S. H., Salvador, M. J., Watanabe, E., Ito, I. Y., & Rodrigues De Oliveira, D. C. (2003). Antimicrobial activity of flavonoids and steroids isolated from two *Chromolaena*

- species. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 39(4), 403–408.
<https://doi.org/10.1590/S1516-93322003000400007>
- Tong, X., & C. Pelling, J. (2013). Targeting the PI3K/Akt/mTOR Axis by Apigenin for Cancer Prevention. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents)*, 13, 971–978.
- Velandia, S. A., Flechas, M. C., Stashenko, E. E., & Ocazonez, R. E. (2016). Propuesta para seleccionar aceites esenciales de plantas de colombia para investigación con base en su citotoxicidad. *Vitae*, 23(1), 18-29. <https://doi.org/10.17533/vitae.v23n1a03>
- Velandia, S. A., Quintero, E., Stashenko, E. E., & Ocazonez, R. E. (2018). Actividad antiproliferativa de aceites esenciales de plantas cultivadas en Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 23(2), 189–198. <https://doi.org/10.15446/ABC.V23N2.67394>
- Vinardell, M. P. (2015). The use of non-animal alternatives in the safety evaluations of cosmetics ingredients by the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 71(2). <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.12.018>
- Vinardell, M. P., & Mitjans, M. (2017). Alternative Methods to Animal Testing for the Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients: An Overview. *Cosmetics*, 4(3), 30. <https://doi.org/10.3390/COSMETICS4030030>
- Vock, E. H., Lutz, W. K., Hormes, P., Hoffmann, H. D., & Vamvakas, S. (1998). Discrimination between genotoxicity and cytotoxicity in the induction of DNA double-strand breaks in cells treated with etoposide, melphalan, cisplatin, potassium cyanide, Triton X-100, and γ -irradiation. *Mutation Research*, 413(1), 83–94. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(98\)00019-9](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(98)00019-9)

- Vollono, L., Falconi, M., Gaziano, R., Iacovelli, F., Dika, E., Terracciano, C., Bianchi, L., & Campione, E. (2019). Potential of Curcumin in Skin Disorders. *Nutrients*, *11*(9), 2169. <https://doi.org/10.3390/NU11092169>
- Warleta, F., Campos, M., Allouche, Y., Sánchez-Quesada, C., Ruiz-Mora, J., Beltrán, G., & Gaforio, J. J. (2010). Squalene protects against oxidative DNA damage in MCF10A human mammary epithelial cells but not in MCF7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(4), 1092–1100. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2010.01.031>
- Wu, P., Meng, X., Zheng, H., Zeng, Q., Chen, T., Wang, W., Zhang, X., & Su, J. (2018). Kaempferol attenuates ROS-Induced hemolysis and the molecular mechanism of its induction of apoptosis on bladder cancer. *Molecules*, *23*(10), 2592. <https://doi.org/10.3390/molecules23102592>
- Yan, X., Qi, M., Li, P., Zhan, Y., & Shao, H. (2017). Apigenin in cancer therapy: Anti-cancer effects and mechanisms of action. *Cell & Bioscience*, *7*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S13578-017-0179-X>
- Yáñez-Rueda, X., Betancur-Galvis, L., Agudelo-Gómez, L., Zapata-Londoño, M. B., Correa-Royero, J., Mesa-Arango, A. C., & Stashenko, E. E. (2009). Composición química y actividad biológica de aceites esenciales de *Calycolpus moritzianus* recolectado en el Norte de Santander, Colombia. *Salud UIS*.
- Zhou, J., Ouedraogo, M., Qu, F., & Duez, P. (2013). Potential Genotoxicity of Traditional Chinese Medicinal Plants and Phytochemicals: An Overview. *Phytotherapy Research*, *27*(12), 1745–1755. <https://doi.org/10.1002/ptr.4942>

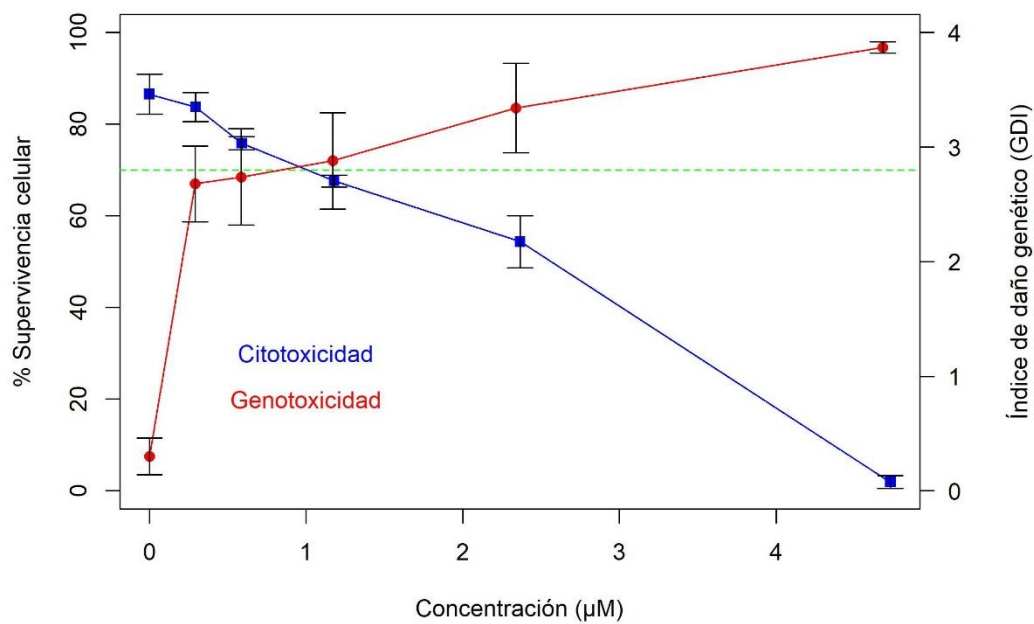
Zhou, Y., Fu, X., Guan, Y., Gong, M., He, K., & Huang, B. (2020). 1,3-Dicaffeoylquinic acid targeting 14-3-3 tau suppresses human breast cancer cell proliferation and metastasis through IL6/JAK2/PI3K pathway. *Biochemical Pharmacology*, *172*, 113752. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2019.113752>

9. APÉNDICES



Apéndice A.

Citotoxicidad del filtro estándar (dióxido de titanio) y mutágeno de referencia (4NQO) en fibroblastos humanos (MRC5). Para su mejor comprensión, se delimitan tres zonas con base en el grado de citotoxicidad: Alta (rojo), media (amarilla) y baja (verde).



Apéndice B.

Curva de citotoxicidad frente a genotoxicidad en fibroblastos humanos (MRC5) del mutágeno estándar 4-nitro-quinolina-N-óxido.

Compuestos	Origen	Propiedad del compuesto	Referencia
<i>trans-β-Cariofileno</i>	<i>Lippia origanoides</i>	Actividad antiparasitaria frente a la Leishmaniasis antimicrobiana, antioxidante, anestésica, antiinflamatoria y potencial anticancerígeno	Fernanda Neira et al., 2014 Ghelardini et al., 2001 Silva et al., 2017 Soares et al., 2013
Curcumina	<i>Curcuma longa</i>	Antiinflamatorio cutáneo y gastrointestinal. Actividad anticancerígena.	Arablou & Kolahdouz-Mohammadi, 2018 Vollono et al., 2019
Pinocembrina	<i>Lippia origanoides</i>	Actividad antioxidante, antiinflamatoria antimicrobiana y anticancerígena. Alivia síntomas de psoriasis en ratones.	Derseh et al., 2021 Huang et al., 2022
Resveratrol	<i>Posoqueria latifolia</i>	Actividad antígenotóxica frente a radiación UV y propiedades quimiopreventivas del cáncer de piel. Actividad aclaradora y de antienvjecimiento.	Baur & Sinclair, 2006 Boo, 2019 Hu et al., 2015
Ácido clorogénico	<i>Ipomoea horsfalliae</i>	Contribuye a producción de proteínas de matriz en células de piel.	Lee et al., 2021
Apigenina	<i>Lippia origanoides</i>	Actividad antígenotóxica, antiinflamatoria y anticancerígena. Protege sobre el daño inducido por UV, vitíligo, dermatitis y envejecimiento.	Ali et al., 2017 Majma Sanaye et al., 2022 Tong & C. Pelling, 2013
Kaempferol	<i>Rosa centifolia</i> x	Actividad antioxidante en eritrocitos. Antiinflamatorio, antineoplásica, cardio y neuroprotectora.	Crocetto et al., 2021 Wu et al., 2018
Kaempferol-3-glucosido	<i>Rosa centifolia</i> x	Actividad antioxidante, antiinflamatoria, neuroprotectora, cardioprotectora, contra la obesidad, antiosteoporotica, anticancerígenas, antiulcerosas y antidiabéticas	Rao et al., 2018
Escualeno	<i>Chromolaena peltia</i>	Antioxidante, actividad antitumoral.	Allison, 1999 Huang et al., 2009 Kelly, 1999 Kohno et al., 1995 Murakoshi et al., 1992 Narayan Bhilwade et al., 2010

Apéndice C.

Propiedades terapéuticas y/o farmacológicas descritas para los compuestos fitoquímicos estudiados.