

Preliminary safety evaluation of n-butanol from the collagen extraction process and of collagen extract from *Oreochromis niloticus* (tilapia) skin oriented for dermocosmetics

Avaliação preliminar da segurança do n-butanol do processo de extração de colágeno e do extrato de colágeno da pele de Oreochromis niloticus (tilápia) para uso dermocosmético

**Linda Sánchez-Tuesta¹, Nataly Reátegui-Pinedo¹, David Salirrosas¹, Ana Lucía Morocho-Jácome²,
Fernanda Daud Sarruf², Renata Miliani Martinez², Roberto Quevedo-León³, Ramiro Fiestas¹, Carmen
Ayala-Jara¹, André Rolim Baby^{2*}, Zulita Adriana Prieto^{1*}**

¹Universidad Nacional de Trujillo. Juan Pablo II Av. s/n, Trujillo, Perú

²Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

³Universidad de Los Lagos. Fuschlocher Av. 1305, Osorno, Chile

*corresponding authors: zprieto@unitru.edu.pe and andrerb@usp.br

Abstract

Obtaining new cosmetic ingredients, mainly from sustainable sources, as novel excipients or even active compounds is noteworthy for the cosmetic industry to enhance new innovative dermocosmetics. Thus, it is essential to establish the safety of these new ingredients to avoid adverse events, mainly those associated with clastogenic effects from the chemical compounds used for collagen extraction. In this study, we evaluated solutions of chemical compounds used in the collagen extraction process from tilapia skin (*Oreochromis niloticus*). The cytotoxic and genotoxic effects of the solutions used in the collagen extraction process were 10.0, 1.0, 0.5, and 0.1% n-butanol. Solutions were evaluated by the *Allium* test and the comet assay in peripheral white blood cells. The residual water from the final skin wash in the pre-treatment phase and the 0.5% lyophilized collagen extract were also investigated. The absence of cytotoxic and genotoxic activity was demonstrated in the collagen extract, despite the fact that n-butanol showed DNA damage, both in the root cells of *Allium cepa* and in the white blood cells of human peripheral blood. Therefore, we note the necessity to carry out genotoxicity tests to guarantee the absence of contaminants in the collagen extract for cosmetic purposes.

Keywords: *Allium* test; collagen extraction; Comet assay; cytotoxicity; genotoxicity; *Oreochromis niloticus*

Resumo

A obtenção de novos ingredientes cosméticos, principalmente de fontes sustentáveis, como excipientes ou mesmo compostos ativos, é notável para a indústria cosmética para fórmulas dermocosméticas inovadoras. Assim, é essencial estabelecer a segurança desses novos ingredientes para evitar eventos adversos, principalmente aqueles associados aos efeitos clastogênicos dos compostos químicos utilizados para extração de colágeno. Avaliamos soluções de um composto químico utilizado no processo de extração de colágeno da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*). Os efeitos citotóxicos e genotóxicos das soluções utilizadas no processo de extração de colágeno foram de 10,0; 1,0; 0,5; 0,1; 0,05; e 0,025% de n-butanol. Estas foram avaliadas pelo teste de *Allium* e pelo ensaio do cometa em glóbulos brancos periféricos. Ademais, foram investigadas a água residual da última lavagem na fase pré-tratamento e o extrato de colágeno de tilápia liofilizado a 0,5%. A ausência de atividade citotóxica e genotóxica foi demonstrada no extrato de colágeno, apesar do n-butanol ter demonstrado dano ao DNA, tanto nas células radiculares de *Allium cepa* quanto nos glóbulos brancos do sangue periférico humano. Por isso, observamos a necessidade de realização de testes de genotoxicidade para garantir a ausência de contaminantes no extrato de colágeno para fins dermocosméticos.

Palavras-chave: Teste de *Allium*; extração de colágeno; ensaio de cometa; citotoxicidade; genotoxicidade; *Oreochromis niloticus*

Introduction

Sustainable use of residual materials from aquatic organisms has been widely studied during the last decade, with interesting results (1,2). Since the origin and the extraction method exert a strong influence on the purity and yield of collagen, there are many reviews available regarding marine resources that discuss not only the factors that influence the collagen extraction but also the physical and biological properties, such as its thermal stability, amino acid composition, and safety as oriented for dermocosmetics (1-4).

Moreover, numerous bioactive peptides of collagen have been extracted from fish via chemical or enzymatic hydrolysis as a safer option in the development of cosmeceutical products. Among the principal activities, we have examined the antimicrobial, antioxidant, antiphotaging, photoprotective activities, and their potential application in the cosmetic area (2).

Indeed, there is a rising utilization of collagen from fish residuals for cosmetic applications since fish collagen has no risk in disease transmission to humans. For instance, some studies focused on wound healing applications with successful results as well as scar diminution (1,5–7). Fish collagen is principally derived from the skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*) is highly appreciated for its biomedical and cosmetic uses due to particular physicochemical properties (8,9). The results of the biological evaluations of tilapia collagen demonstrated the absence of cellular toxicity and chromosomal aberrations, negative sensitivity tests, and acute systemic toxicity (10). Biocompatibility and regenerative activity in the treatment of deep second-degree burns have also been observed (11). The biological safety of collagen will depend on its purity; therefore, it is necessary to assess pretreatment procedures and methods of extraction.

The methods for extracting collagen from by-products of different animal origins are well established (10,12). To release non-collagen proteins, fats, and pigments, sodium hydroxide and n-butanol in proportions of 1:20 weight/volume (w/v) are commonly used in the first stage of treatment (13,14). After treatments at variable times with these chemical compounds, successive rinses are carried out to remove chemical residues infused within the extracted collagen or in the rinsing liquids. Some of these molecules, such as hydrogen peroxide (15) and n-butanol (16), represent a source for the environmental pollution and potential genotoxicity.

Introdução

O uso sustentável de resíduos de organismos aquáticos foi amplamente estudado na última década com resultados interessantes (1,2). Uma vez que a origem e o método de extração exercem influência significativa sobre a pureza e rendimento do colágeno, há muitas revisões disponíveis sobre os recursos marinhos que discutem não apenas os fatores que influenciam a extração de colágeno, mas também suas propriedades físicas e biológicas, como sua estabilidade térmica, composição de aminoácidos e segurança orientada para dermocosméticos (1-4).

Além disso, inúmeros peptídeos bioativos de peptídeos de colágeno foram extraídos de peixes por hidrólise química ou enzimática, como opção mais segura no desenvolvimento de produtos cosmeceuticos. Entre as principais atividades, observam-se ação antimicrobiana, antioxidante, antifotoenvelhecimento, atividades fotoprotetoras e potencial aplicação na área cosmética (2).

De fato, há uma crescente utilização de colágeno de resíduos de peixes para aplicações cosméticas, uma vez que o colágeno de peixe não tem risco na transmissão de doenças para humanos. Por exemplo, alguns estudos se concentraram em aplicações de cicatrização de feridas com resultados bem-sucedidos, bem como diminuição da cicatrizes (1,5–7). Principalmente o colágeno de peixe derivado da pele da tilápia (*Oreochromis niloticus*) é altamente apreciado por seus usos biomédico e cosmético devido à propriedades físico-químicas particulares (8,9). Os resultados das avaliações biológicas do colágeno de tilápia demonstraram a ausência de toxicidade celular e aberrações cromossômicas, negativa em testes de sensibilidade e toxicidade sistêmica aguda (10). Também foram observadas a biocompatibilidade e a atividade regenerativa em queimaduras profundas de segundo grau (11). A segurança biológica do colágeno dependerá de sua pureza; portanto, é necessário avaliar os procedimentos de pré-tratamento e os métodos de extração.

Os métodos de extração de subprodutos de colágeno de diferentes animais são bem estabelecidos (10,12). O estágio anterior de tratamento, realizado para separar proteínas não colágenas, gorduras e pigmentos comuns, usam hidróxido de sódio e n-butanol em proporções de 1:20 peso/volume (p/v) (13,14). Após os tratamentos por períodos variáveis com esses compostos, sucessivos enxágues são realizados para descartar resíduos impregnados no colágeno extraído ou nos líquidos de lavagem. Essas moléculas representam

Biosafety of raw materials in cosmetic industries is mandatory. It is also important to ensure that the concentrations of chemical substances used during extraction processes for cosmetic (ingredient) use must be eliminated or reduced (17). For collagen extraction, caution in the elimination of any remaining n-butanol in the by-products of the collagen raw material (14) is required.

Even when an absence of butanol mutations is reported using the Ames assay (16), additional tests are needed to confirm the results and to specify the utilized concentrations. Current research shows that a single assay is not sufficient to exclude a genotoxic substance, even when the result has been negative (17–20). In this research, we evaluated the safety of chemical solutions of n-butanol (used in the extraction process), residual water from washes and collagen extract from *O. niloticus* skin itself with cosmetic purposes, using cytotoxic and genotoxic assays by *Allium* and comet tests.

Materials and Methods

Biological material

- 1) *Allium cepa* bulbs, medium in size, with germinal disk between 1 and 2 cm.
- 2) Peripheral blood lymphocytes obtained from two healthy male donors, aged 25 and 38 years. The donors were non-smokers and did not consume drugs. (Nº: 001-2020/CEI-UNT).
- 3) Tilapia (*Oreochromis niloticus*), 12 months old (30 fish, 450 ± 35.0 g).

Chemical products

n-Butanol (1-butanol CAS 71-36-3), NaOH, acetic acid, hydrogen peroxide, NaCl, disodium EDTA, Tris HCl, Triton X-100 and DMSO from Sigma-Aldrich were used. Propidium iodide and SYBR Gold from Invitrogen, USA were also used.

uma fonte poluente para o meio ambiente e potencial genotoxicidade, como o peróxido de hidrogênio (15) e n-butanol (16).

A biossegurança das matérias-primas na indústria cosmética é obrigatória. Também é importante assegurar que as concentrações de substâncias químicas utilizadas durante os processos de extração de ingredientes cosméticos sejam eliminadas ou reduzidas (17), como o composto químico n-butanol. Para a extração de colágeno, é necessária cautela na eliminação do n-butanol, utilizado para a remoção de gorduras que permanecem nos subprodutos da matéria-prima de colágeno (14).

Apesar da ausência de mutações causadas pelo butanol no ensaio Ames (16), testes adicionais são necessários para confirmar esses resultados e especificar as concentrações utilizadas. Pesquisas atuais demonstram que um único ensaio não é suficiente para excluir uma substância genotóxica, mesmo quando o resultado foi negativo (17–20). Nesta pesquisa, avaliou-se a segurança de soluções químicas de n-butanol (utilizado no processo de extração), água residual de lavagens e extrato de colágeno da pele de *O. niloticus* para fins dermocosméticos, utilizando ensaios citotóxicos e genotóxicos por testes de *Allium* e cometa.

Material e Métodos

Material biológico

- 1) Bulbos de *Allium cepa* de tamanho médio, com disco germinal entre 1 e 2 cm.
- 2) Linfócitos sanguíneos periféricos obtidos de dois doadores masculinos saudáveis, não fumantes, que não consumiram drogas, com idades entre 25 e 38 anos (Nº: 001-2020/CEI-UNT).
- 3) Tilápia (*Oreochromis niloticus*), 12 meses de idade (30 peixes, 450 ± 35,0 g).

Produtos químicos

n-Butanol (1-butanol CAS 71-36-3) NaOH, ácido acético, peróxido de hidrogênio, NaCl, EDTA dissódico, Tris HCl, Triton X-100 e DMSO da Sigma-Aldrich foram utilizados. Também foram utilizados iodeto de propídeo e SYBR Gold da Invitrogen, USA.

Obtaining collagen from tilapia (O. niloticus)

Collagen was obtained by extraction in acetic acid (ASC), according to a recent report (9). After successive washes with an abundance of distilled water, the tilapia skin was pre-treated with 0.1M NaOH (1:20 w/v) for 24 h, followed by treatment with n-butanol at 10% (1:20 w/v). Ten washes with an abundance of distilled water were performed, followed by collagen extraction in 0.5M acetic acid for 48 h. The entire procedure was conducted at 4.0 °C, with recovered collagen vacuum filtered with a filter paper (Whatman N° 4), and then lyophilized.

Allium test

The onion bulbs were immersed in water, confirming that the germinal disk was fully immersed. Testing was initiated when (all of) the roots reached between 1 and 2 cm in length. Successive tests of n-butanol at concentrations of 10.0; 1.0; 0.5; 0.1; 0.05 and 0.025% were performed to determine both viability and activity of the cells. The growing roots were then exposed to either n-butanol, residual water from the final (10th) rinse of the pretreatment of the collagen extraction process, 0.5% collagen in distilled water, and purified water, as a control. After 6 h of treatment, the apical meristems were cut from the roots, fixed in an ethanol:acetic acid solution (3:1 v/v) and held at -4.0 °C for a minimum of 24 h. Samples were stained with 1.0% acetic orcein 1N: HCl (9: 1 v/v) for 30 minutes (21). The samples were crushed and observed with an optical microscope at 40 and 100X. Three replicates were performed.

Comet assay

Ten mL of peripheral blood were collected from the volunteers. White blood cells were immediately isolated and exposed to n-butanol (0.01 and 0.001%), 0.5% tilapia collagen solution, PBS (negative control) or 12% hydrogen peroxide (positive controls). After 2 h of treatment, the white blood cells viability was determined by staining with 1.0 mM propidium iodide (Invitrogen, USA) and controlled with an Olympus BX51 40X fluorescence microscope using the 536 and 617 nm filters. The samples were placed on slides previously prepared with a layer of agarose and cell lysis was performed with the buffer containing NaCl 2.5M, Na₂EDTA 100mM, Tris HCl 10mM, Triton X-100 1%, and DMSO 10%. The samples were then incubated at 4.0 °C for 4 h, followed by electrophoresis at 25V (Power Pack P25 Timer, Biometra GmbH, Germany) and 300mA for 30 minutes in buffer pH 13 (1.0mM Na₂EDTA and 300mM NaOH). The samples were

Obtenção de colágeno de tilápia (O. niloticus)

O colágeno foi obtido pelo método de extração de colágeno solúvel em ácido acético (ASC), segundo relatório recente (9). Após sucessivas lavagens com água destilada em abundância, a pele de tilápia foi pré-tratada com 0,1M NaOH (1:20 p/v) por 24 h, seguido de tratamento com n-butanol a 10% (1:20 p/v). Foram realizadas dez lavagens com água em abundância, em seguida, a extração foi realizada em ácido acético 0,5M por 48 h. Todo o procedimento foi realizado a 4,0 °C, filtrado com papel filtro (Whatman N° 4) e depois liofilizado.

Teste de allium

Os bulbos de cebola estavam imersos em água, de forma que o disco germinal estivesse totalmente imerso. Quando as raízes atingiram entre 1 e 2 cm de comprimento, o teste foi iniciado. Foram realizados sucessivos testes de n-butanol para determinar a viabilidade e atividade das células. As concentrações utilizadas foram de 10,0; 1,0; 0,5; 0,1; 0,05 e 0,025%. Em seguida, as raízes em crescimento foram expostas às seguintes soluções: n-butanol, água residual da última lavagem do pré-tratamento do processo de extração de colágeno (décima lavagem), colágeno a 0,5% em água destilada e água purificada, como controle. Após 6h de tratamento, os meristemas apicais foram cortados das raízes, fixados em etanol: solução de ácido acético (3: 1 v/v) e mantidos a -4,0 °C por pelo menos 24 h. As amostras foram coradas com 1,0% de orceina acética 1N: HCl (9: 1 v/v) por 30 minutos (21). As amostras foram observadas em um microscópio óptico a 40 e 100X. Foram realizadas três réplicas.

Ensaio do cometa

Foram coletados 10 mL de sangue periférico dos participantes e os glóbulos brancos foram imediatamente isolados e expostos a n-butanol 0,01 e 0,001%; solução de colágeno de tilápia a 0,5%; e controles negativo (PBS) e positivo (12% peróxido de hidrogênio). Após 2h de tratamento, a viabilidade dos glóbulos brancos foi determinada pela coloração com iodeto de propídio de 1,0mM (Invitrogen, EUA) e controlada com um microscópio de fluorescência Olympus BX51 40X, usando filtros de 536 e 617 nm. As amostras foram colocadas em cubas previamente preparadas com primeira camada de agarose e a lise celular foi realizada com o tampão contendo NaCl 2,5M, Na₂EDTA 100mM, Tris HCl 10mM, Triton X-100 1% e DMSO 10%. Depois, foram incubadas a 4,0 °C por 4 h e seguidas por eletroforese a 25V (Power

neutralized in Tris HCl solution pH 7.5 for 3 minutes and fixed in 96° alcohol for 3 minutes (22). Samples were stained with SYBR Gold and observed under a fluorescence microscope with 40X magnification (23).

Data collection

The frequency of the cell cycle phases was recorded and typified in the different treatments and in the treatments that registered genetic changes in the *Allium* test. The DNA damage was quantified using the Score Assay program and the percentage of DNA in the tail (% Tail DNA) was considered a genotoxicity parameter in the comet assay (24).

Statistical Analysis

The averages of each variable were compared by analysis of variance with the Origin Pro 2020 program (OriginLab Corporation, USA) and regression analysis was applied to reveal the dose-response relationship of chemical compounds, with a reliability level of $\alpha = 0.05$.

Results and Discussion

Collagen extraction methods are well described in the literature. In general, three steps are commonly used to extract low molecular weight collagen hydrolysates from natural resources: initial treatment of the raw material, gelatin (collagen) extraction, and collagen hydrolysis. In the pretreatment (initial treatment) phase, sodium hydroxide is used to eliminate non-collagen proteins and butyl alcohol used to reduce lipids. The last step could be divided into enzymatic, chemical, and subcritical water hydrolysis (3).

Dynamics of cell proliferation in the apical meristem of *Allium cepa*, achieved between 1 to 3 days of growth induction is a sensitive biological scenario to detect substances that can affect the genetic material (25). Thus, *Allium* test is comparable to assays on animals and cell line cultures (26). As shown in Figure 1A, we observed transparent aspect and withered roots, unlike the roots shown in Figures B and C, which corresponded to the treatments with the collagen suspension (0.5%) and control growth in distilled water, respectively. Degradation of the nucleus and cytoplasm were observed in the samples exposed to 10.0% n-butanol for 6 h (Figure 1D), thus this concentration can be considered lethal. Moreover, high inhibition of cell activity was observed at 1.0% n-butanol, mitotic index

Pack P25 Timer, Biometra GmbH, Alemanha) e 300mA por 30 minutos em pH tampão 13 (1,0mM Na₂EDTA e 300mM NaOH). Foi realizada a neutralização na solução Tris HCl pH 7,5 por 3 minutos e fixação em 96° álcool por 3 minutos (22). Amostras coradas com SYBR Gold foram observadas em microscópio de fluorescência com ampliação de 40X (23).

Coleta de dados

A frequência das fases do ciclo celular foi registrada e tipificada nos diferentes tratamentos e nos tratamentos que registraram alterações genéticas no ensaio de *Allium*. O dano de DNA foi quantificado usando o programa Score Assay e a porcentagem de DNA na cauda (% DNA na cauda) foi considerado um parâmetro de genotoxicidade no ensaio do cometa (24).

Análise estatística

As médias de cada variável foram comparadas pela análise de variância com o programa Origin Pro 2020 (OriginLab Corporation, EUA) e a análise de regressão foi aplicada para revelar a relação dose-respostas compostos químicos, com nível de confiabilidade de $\alpha = 0,05$.

Resultados e Discussão

Os métodos de extração de colágeno são bem descritos na literatura. Em geral, três etapas são comumente usadas para extrair hidrolisados de colágeno de baixo peso molecular de recursos naturais: tratamento inicial da matéria-prima, extração de gelatina (colágeno) e hidrólise de colágeno. Na fase de pré-tratamento (tratamento inicial), hidróxido de sódio é usado para eliminar as proteínas não colágenas e o álcool butílico para reduzir os lipídios. A última etapa pode ser dividida em hidrólise enzimática, química e subcrítica (3).

A dinâmica de proliferação celular no meristema apical de *Allium cepa*, alcançada entre 1 a 3 dias de indução de crescimento, é um cenário biológico sensível para detectar substâncias que podem afetar o material genético (25). Assim, o teste de *Allium* é comparável aos ensaios com animais e culturas de linhagens celulares (26). Na Figura 1A observa-se aspecto transparente e raízes muradas, ao contrário das raízes ilustradas nas Figuras B e C, que corresponderam aos tratamentos com amostras da suspensão do colágeno (0,5%) e o controle, cultivadas em água destilada, respectivamente. A degradação do núcleo e do citoplasma (Figura 1D) das

of 2.99% with absence of normal cells in the metaphase; and the mitotic index of 2.75% (not significant) was found at 0.5% n-butanol with the presence of mitotic phases. In addition, there were four metaphases, two prophase and one telophase in an unusual single visual field at the concentration of 0.025% n-butanol (Figure 1E).

The percentage of cell divisions in root meristems of *A. cepa* was determined by the mitotic index. Lethality and no cell activity were observed with 10.0% n-butanol, while for 1.0, 0.5 and 0.1% n-butanol, a significant decrease in cell activity was observed compared to those treated with lower concentrations (0.05 and 0.025%). These last indices were compared with those of the negative control, collagen solution at 0.5% and the residual water of the final (tenth) rinse of the pretreatment process (Figure 2).

amostras expostas ao n-butanol a 10.0% por 6 h, sendo aquelas concentrações consideradas letais. Além disso, observou-se alta inibição da atividade celular para 1,0% n-butanol, índice mitótico de 2,99% com ausência de células normais na metafase; e o índice mitótico de 2,75% (não significativo) foi encontrado para 0,5% n-butanol com a presença de fases mitóticas. Ainda, havia quatro metafases, duas pró-fases e uma telofase em um campo visual único incomum na concentração de 0,025% (Figura 1E).

A porcentagem de divisões celulares em meristemas radiculares de *A. cepa* foi determinada pelo índice mitótico. Para 10,0% do n-butanol foram observadas letalidade e ausência de atividade celular, enquanto para 1,0; 0,5; e 0,1% observou-se diminuição significativa na atividade celular em comparação com as de 0,05 e 0,025%. Estes últimos índices foram comparáveis

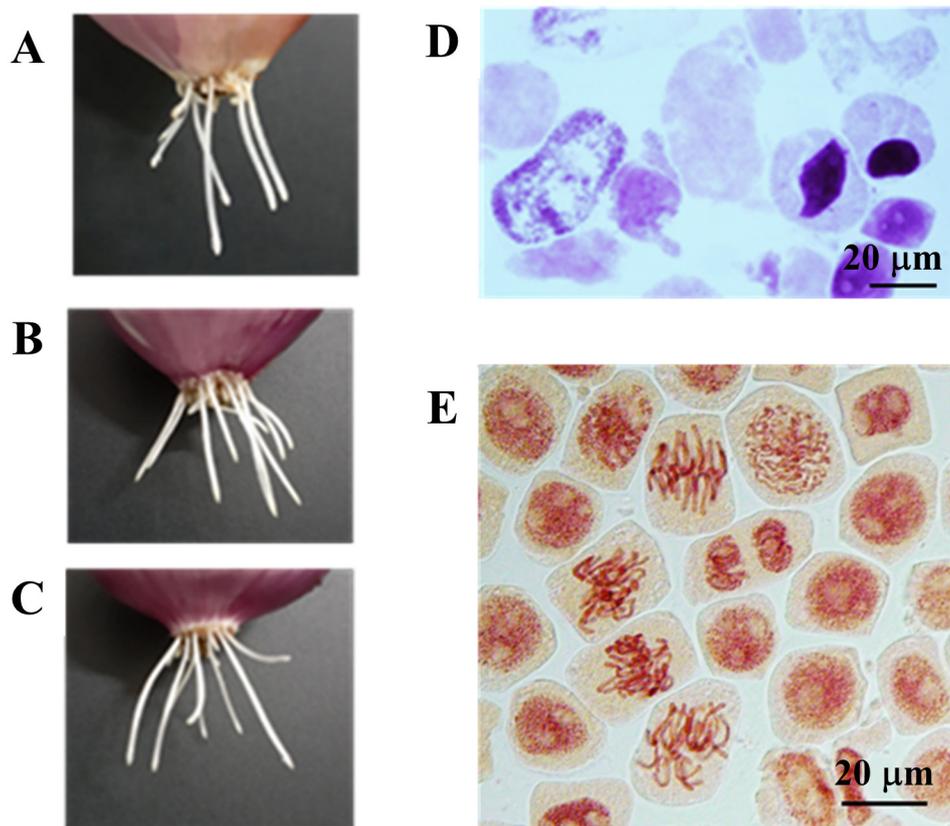


Figure 1 - *Allium cepa* apical meristems exposed to chemicals. **A**, 10% n-Butanol; **B**, collagen suspension (0.5%); **C**, control (distilled water); **D**, Cellular degradation of atypical *Allium cepa* root samples exposed to 10.0% n-butanol; **E**, Cells in active mitosis, metaphase increased using 0.025% n-butanol (Olympus BX51 microscope, Japan, 100X). Bar 20 µm.

Figura 1 - Meristemas apicais de *Allium cepa* expostos a produtos químicos. **A**, n-Butanol, 10,0%; **B**, suspensão de colágeno (0,5%); **C**, controle (água destilada); **D**. Degradação celular de amostras de raiz apical *allium cepa* expostas a n-butanol 10,0%; **E**. Células em mitose ativa, a metafase aumentou usando 0,025% n-butanol (microscópio Olympus BX51, Japão, 100X). Barra 20 µm.

We observed the following cellular level changes produced by n-butanol in *A. cepa* at the metaphase level: partial cytostatic effect at concentrations of 0.5 and 1.0%. Figure 3A shows normal metaphase and figure 3B shows stopped metaphase (c-metaphase), in which the chromosomes were dispersed and highly condensed. This irregular variation was an indicative of the absence or failure of the achromatic spindle formation, as well as signs of chromosomal compaction due to metaphasic stagnation (27). Variants of the normal phases of anaphase and bipolar telophase (Figures 3C and E, respectively) in comparison with the presence of lag chromosomes in anaphase (Figure 3D) and multipolar structure in telophase (Figure 3F), are evidence to contribute to the dysfunction of the achromatic spindle and defective centrosome division, as illustrated in Figure 3F, with four polar centers rather than two. The assembly of the mitotic spindle organized in a bipolar way, with dynamic balance of kinesin-5 and dynein, ensures equitable distribution of chromosomes during segregation in mitosis (28).

aos do controle negativo, da solução de colágeno em 0,5% e da água residual da lavagem final (a décima) do processo de pré-tratamento (Figura 2).

Observamos as seguintes alterações de nível celular produzidas por n-butanol em *A. cepa* no nível de metáfase: efeito citostático parcial em concentrações de 0,5 e 1,0%. A Figura 3A ilustra metáfase normal e, a Figura 3B, a metáfase parada (c-metáfase), na qual os cromossomos estão dispersos e altamente condensados. Essa variação irregular foi um indicativo da ausência ou falha da formação do eixo acromático, bem como sinais de compactação cromossômica devido à estagnação metafásica (27). A presença de cromossomos lag em anáfase (Figura 3D) e estrutura multipolar em telófase (Figura 3F), variantes das fases normais de anáfase e telófase bipolar (Figuras 3C e E, respectivamente) são provas que contribuem para a disfunção do fuso acromático e da divisão centrossômica defeituosa, como é ilustrado na Figura 3F com quatro centros polares em vez de dois. A montagem do fuso mitótico

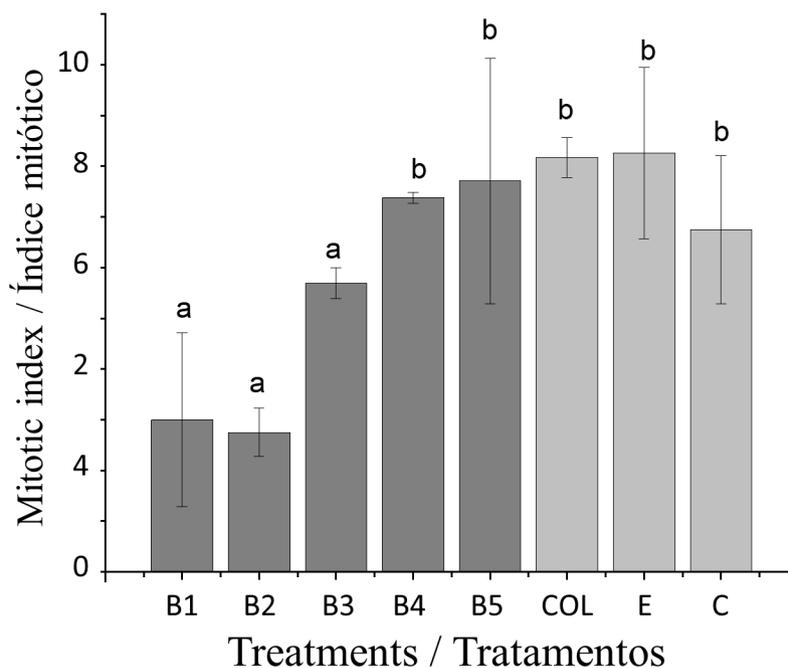


Figure 2 - Mitotic index of *Allium cepa* apical meristem exposed to different treatments. B1, 1% n-Butanol; B2, 0.5% n-Butanol; B3, 0.1% n-Butanol; B4, 0.05% n-Butanol; B5, 0.025% n-Butanol; COL, 0.5% collagen solution; E, Final rinse from collagen extraction pre-treatment; C, Negative control (distilled water). Bar represents SD of $n \geq 3$. Different letters represent significant differences ($p < 0.05$)

Figura 2. - Índice mitótico de meristema apical de *Allium cepa* exposto a diferentes tratamentos. B1, 1,0% n-Butanol; B2, 0,5% n-Butanol; B3, 0,1% n-Butanol; B4, 0,05% n-Butanol; B5, 0,025% n-Butanol; COL. Colágeno 0,5%; E. Última lavagem do pré-tratamento na extração de colágeno; C. Controle negativo (água destilada). Barras representam DP de $n \geq 3$. Diferentes letras representam diferenças significativas ($p < 0,05$)

Furthermore, the dysfunctional organization in supernumerary centrosomes leads to flaws in cytokinesis and numerical variations of chromosomes in the resulting cells (29). Figure 3G-I shows another alteration produced by n-butanol was the breakdown of chromosomes. Figure 3G illustrates a telophase cell with a chromosome bridge; moreover, not clearly defined whether they were delayed or tripolar chromosomes. In the absence of cytokinesis, a tripolar cell with chromosome bridges between chromosome groups would increase to a cell with three nuclei, as in Figure 3H,I. Likewise, the presence of micronuclei (Figure 3I) indicated chromosomal breaks produced in phases prior to mitosis.

organizado de forma bipolar, com equilíbrio dinâmico de cinesina-5 e dineína, garante a distribuição equitativa de cromossomos durante a segregação em mitose (28).

Ademais, a organização disfuncional em centrosomas supranumerários leva a falhas na citocinese e variações numéricas de cromossomos nas células resultantes (29). A Figura 3G-I ilustra que outra alteração produzida pelo n-butanol foi a quebra de cromossomos. A Figura 3G ilustra uma célula em telófase com uma ponte cromossômica; ademais, não está claramente definido se eles estavam atrasados ou se são cromossomos tripolares. Na ausência de citocinese, uma célula tripolar com pontes cromossômicas entre grupos cromossômicos aumentaria para uma célula com três

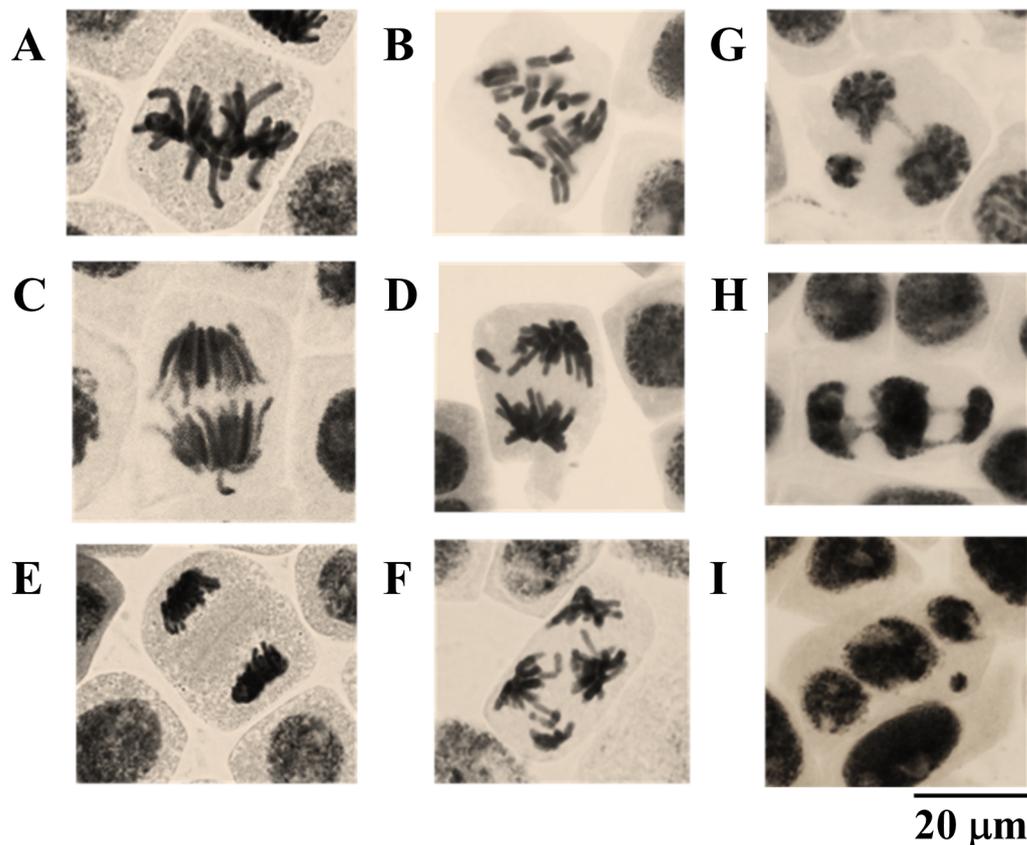


Figure 3 - Changes in the mitosis process of *Allium cepa* apical meristem cells exposed to n-butanol. **A**, normal metaphase; **B**, stopped metaphase; **C**, normal anaphase; **D**, anaphase with a delayed chromosome; **E**, normal telophase; **F**, multipolar telophase; **G**, cell with chromosomal bridge and undefined or delayed multipolar chromosomes; **H**, cell in tripolar telophase and chromosomal bridges to each other; **I**, multinucleated cell and cell at the micronucleus interphase. Bar: 20 μm (Olympus BX51 microscope, Japan, 100X).

Figura 3. - Mudanças no processo de mitose de meristema apical de *Allium cepa* expostas ao n-butanol. **A**, metafase normal; **B**, parou a metafase; **C**, anáfase normal; **D**, anáfase com um cromossomo atrasado; **E**, telófase normal; **F**, telófase multipolar; **G**, célula com ponte cromossômica e cromossomos multipolares indefinidos ou atrasados; **H**, célula em telófase tripolar e pontes cromossômicas umas para as outras; **I**, célula multinucleada e célula na interfase do micronúcleo. Barra: 20 μm (microscópio Olympus BX51, Japão, 100X).

Table 1 - Frequency of chromosomal aberrations in *Allium cepa* meristems under the effect of n-butanol, residual rinse water and collagen solution (SD of n=3, each replica greater than 2000 cells).

Tabela 1 - Frequência de mutações cromossômicas em meristema de *Allium cepa* sob o efeito de n-butanol, água de lavagem residual e solução de colágeno (DP de n=3, cada réplica maior que 2000 células).

Treatment / Tratamento	Micronuclei / Micronúcleos	Altered metaphase / Metáfase alterada	C-metaphase / C-metáfase	Multipolar / Multipolar	Chromosomal bridge / Ponte cromossômica
n-Butanol 1.0%	0.38 ± 0.26	0.28 ± 0.25	0.48 ± 0.17	0.39 ± 0.14	0.01 ± 0.02
n-Butanol 0.5%	0.21 ± 0.16	0.07 ± 0.03	0.02 ± 0.02	0.09 ± 0.11	0.02 ± 0.03
n-Butanol 0.1%	0	0	0	0	0.03 ± 0.03
Residual water pre-extraction / Pré-extração de água residual	0	0	0	0	0
Collagen / Colágeno 0.5%	0	0	0	0	0
Control (distilled water) / Controle (água destilada)	0	0	0	0	0

The alterations recorded after 6 h of exposure were registered at the final stage of replication process (S phase) and G2 phase (premitotic), as well as the presence of multipolar-centers. They can occur as a consequence of the cellular and chromosomal cytoskeleton instability due to the effect of n-butanol, which would have produced fragmentation of the pre-existing centrosome(s) instead of a centrosome amplification. The formation of multipolar spindle regardless of the amplification of the centrosome in HeLa cells after irradiation in G2 phase has been previously observed (30). Moreover, it is known that the centrosome duplication has occurred only once in each cell cycle and began in the G1 (pre-replication)/S phase and completed during G2 phase (31). However, future investigations with a centrosomal labeling should be carried out to determine if it is a fragmentation or amplification.

The quantified changes due to the effect of n-butanol are summarized in Table 1. Multipolar cells were most frequently observed, followed by metaphases with dispersed and condensed chromosomes. Chromosomal changes were not observed in the other treatments, thus verifying the genotoxicity of n-butanol.

The comet assay is one of the methods used to measure DNA damage, using whole blood (22) or white blood cells isolated directly from peripheral blood (5). Among the parameters of genotoxicity, the percentage of DNA in the comet test is used as the most informative parameter due to its relationship with the magnitude of the DNA damage. The greater the DNA breakage, the greater the tail length due to migration, therefore, the visualization will be immediate and the intensity of the tail more evident (32). DNA damage was quantified using the DNA percentage parameter on the tail.

núcleos, na Figura 3H,I. Da mesma forma, a presença de micronúcleos (Figura 3I) foi uma evidência de quebras cromossômicas produzidas em fases anteriores à mitose.

As alterações, após 6h de exposição, foram registradas na fase final do processo de replicação (fase S) e G2 (pré-mitótica), bem como a presença de centros multipolares, nas Figuras 2F e 4A. Eles podem ocorrer como consequência da instabilidade celular e do citoesqueleto cromossômico devido ao efeito do n-butanol, que teria produzido fragmentação do(s) centrôssomo(s) pré-existente(s) em vez de uma amplificação do centrôssomo. Já foi observada a formação de fuso multipolar independentemente da amplificação do centrôssomo em células HeLa após irradiação na fase G2 (30). Ademais, sabe-se que a duplicação do centrôssomo ocorreu apenas uma vez em cada ciclo celular e teve início na fase G1 (pré-replicação)/fase S e concluída durante a fase G2 (31). No entanto, futuras investigações com rotulagem centrôssomal devem ser realizadas para esclarecer se é uma fragmentação ou amplificação.

A Tabela 1 apresenta alterações quantificadas pelo efeito de n-butanol, com as mais frequentes células multipolares, seguidas por metafases com cromossomos dispersos e condensados. Alterações cromossômicas não foram registradas nos outros tratamentos, verificando assim a genotoxicidade do n-butanol.

O ensaio do cometa é um dos métodos utilizados para medir danos ao DNA, utilizando sangue inteiro (22) ou glóbulos brancos isolados diretamente do sangue periférico (5). Entre os parâmetros de genotoxicidade, a porcentagem de DNA no teste do cometa é usada como parâmetro mais informativo devido à sua relação com a magnitude do dano de DNA. Quanto mais o DNA quebrar, maior o comprimento da cauda devido

In our investigation, the toxicity of n-butanol was determined by the percentage of living cells with the differential staining given by propidium iodide in white blood cells isolated from human peripheral blood. Only dead cells were colored, as seen in Figure 4. Concentrations above 0.1% n-butanol were lethal in the white blood cells. The percentage of viability of white blood cells exposed to 0.001% n-butanol was 96.87%. Cellular viability greater than 75% has been reported to be necessary for the validity of genotoxicity tests (33).

DNA damage of white blood cells due to the exposure to n-butanol was demonstrated by the degree of DNA migration in alkaline unicellular electrophoresis (pH > 13). The heterogeneity of the response of white blood cells to a clastogenic compound was observed at the same sub-lethal dose and exposure time recorded in all investigations (34). Figure 5 shows the variable magnitude of DNA damage in white blood cells, from zero level (no damage) in A, mild damage levels in B and C, medium damage in D and high damage in E and F. These types of damage were recorded in all treatments including the positive and negative controls, using the % Tail DNA to determine the clastogenic activity.

à migração, portanto, a visualização será imediata e a intensidade da cauda mais evidente (32). Os dados de dano ao DNA foram quantificados usando o parâmetro percentual de DNA na cauda.

Em nossa investigação, a toxicidade do n-butanol foi determinada pela porcentagem de células vivas com a coloração diferencial dada pelo iodeto de propídio em glóbulos brancos isolados do sangue periférico humano. Apenas células mortas eram coloridas, como na Figura 4. Concentrações acima de 0,1% de n-butanol foram letais aos glóbulos brancos. O percentual de viabilidade dos glóbulos brancos expostos a 0,001% n-butanol foi de 96,87%. Foi relatado que é necessário que a viabilidade das células seja superior a 75% para a validade dos testes de genotoxicidade (33).

O dano de DNA dos glóbulos brancos foi evidenciado pelo grau de migração de DNA na eletroforese unicelular alcalina (pH > 13) quando exposto ao n-butanol. A heterogeneidade da resposta dos glóbulos brancos a um composto clastogênico foi evidenciada na mesma dose sub-letal e tempo de exposição registrado em todas as investigações (34). A Figura 5 ilustra a magnitude variável dos danos do DNA em glóbulos brancos, a partir do nível zero (sem dano) em A, níveis de dano

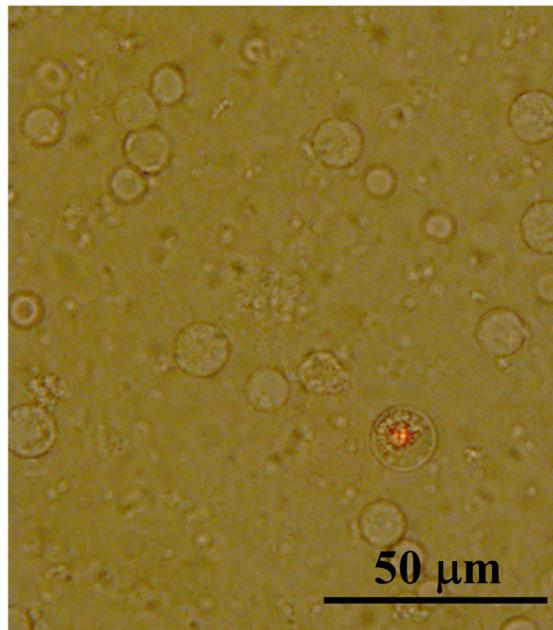


Figure 4 - Cell viability of human peripheral blood white blood cells. Non-colored cells with 1.0mM propidium iodide correspond to living cells. Bar: 50μm (Olympus BX51 fluorescence microscope, Japan, 100X).

Figura 4 - Viabilidade celular de glóbulos brancos do sangue periféricos humanos. Células não coloridas com iodeto de propídio de 1,0mM correspondem a células vivas. Barra: 50μm (Olympus BX51 microscópio de fluorescência, Japão, 100X).

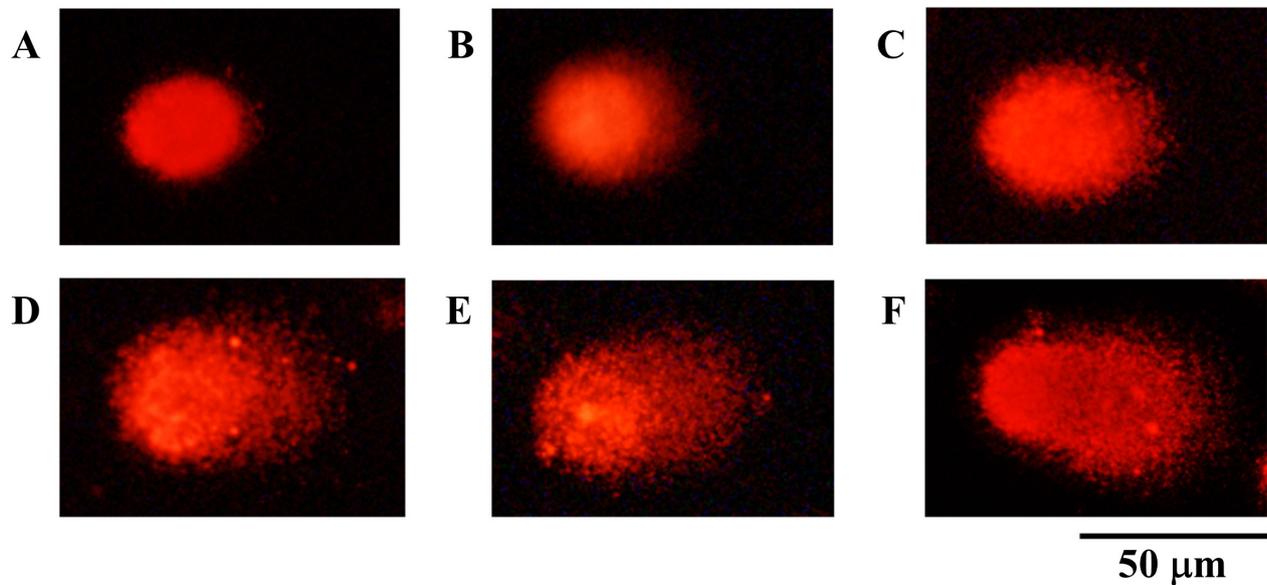


Figure 5 - DNA fragmentation in alkaline comet assay of white blood cells. **A**, Cell with normal DNA; **B** and **C**, Cell with low DNA damage; **D**, Cell with intermediate DNA damage; **E** and **F**, Cell with high DNA damage. Bar: 50 μm . Olympus BX51 fluorescence microscope, Japan, filter 546 nm and barrier filter 590 nm at 400x).

Figura 5 - Fragmentação de DNA no ensaio de cometa alcalino de glóbulos brancos. **A**. Célula com DNA normal; **B** e **C**. Célula com baixo dano de DNA; **D**. Célula com dano de DNA intermediário; **E** e **F**. Célula com alto dano de DNA. Bar: 50 μm . Microscópio de fluorescência Olympus BX51, Japão, filtro de 546 nm e filtro de barreira de 590 nm a 400x).

Figure 6A. shows the comparison of averages of the DNA percentage in the comet tail for the treatment with n-butanol (0.5%), without differences with the positive control and significantly different to the negative control, as well as the collagen extract (0.5%). The percentage of viability evaluated after the n-butanol treatment remained above 95% with an average between treatments of $97.20 \pm 0.12\%$. Concentrations lower than 0.1% n-butanol showed a decrease in the clastogenic effect without significant variations with concentration (Figure 6B). The high variability in the damage degree of the white blood cells exposed to n-butanol within each treatment reflects the variation in the sensitivity of cellular response.

In the cytological tests of *A. cepa* with the rinsing liquid and with 0.5% collagen, the mitotic cycle was normal with no evidence of chromosomal damage. If the rinses were insufficient, chemical residues could remain in the collagen. Fortunately, due to the low-fat content in tilapia skin (3.85%) (35), compared to other species of fish, such as *Sardinella maderensis*, (26.0%) and *S. aurita*, (24.0%) (36), n-butanol could be replaced by ethyl alcohol to remove fat (37). Another alternative treatment to eliminate fat from the raw material is

leve em **B** e **C**, dano médio em **D** e dano elevado em **E** e **F**. Esses tipos de danos foram registrados em todos os tratamentos, incluindo os controles positivo e negativo, sendo a % de causa de DNA o parâmetro que usamos para determinar a atividade clastogênica.

A Figura 6A ilustra a comparação das médias do percentual de DNA na cauda do cometa para o tratamento com n-butanol (0,5%), sem diferenças com o controle positivo e significativamente diferente do controle negativo, bem como o extrato de colágeno (0,5%). O percentual de viabilidade avaliado após o tratamento com n-butanol permaneceu acima de 95% com média entre os tratamentos de $97,20 \pm 0,12\%$. Concentrações inferiores a 0,1% do n-butanol apresentaram diminuição do efeito clastogênico, sem variações significativas entre elas (Figura 6B). A alta variabilidade no grau de dano dos glóbulos brancos expostos ao n-butanol dentro de cada tratamento refletiu a variação na sensibilidade da resposta celular.

Nos testes citológicos de *A. cepa* com o líquido de lavagem e com colágeno a 0,5%, o ciclo mitótico foi normal, sem evidência de dano cromossômico. Se os enxágues não fossem suficientes, os resíduos químicos

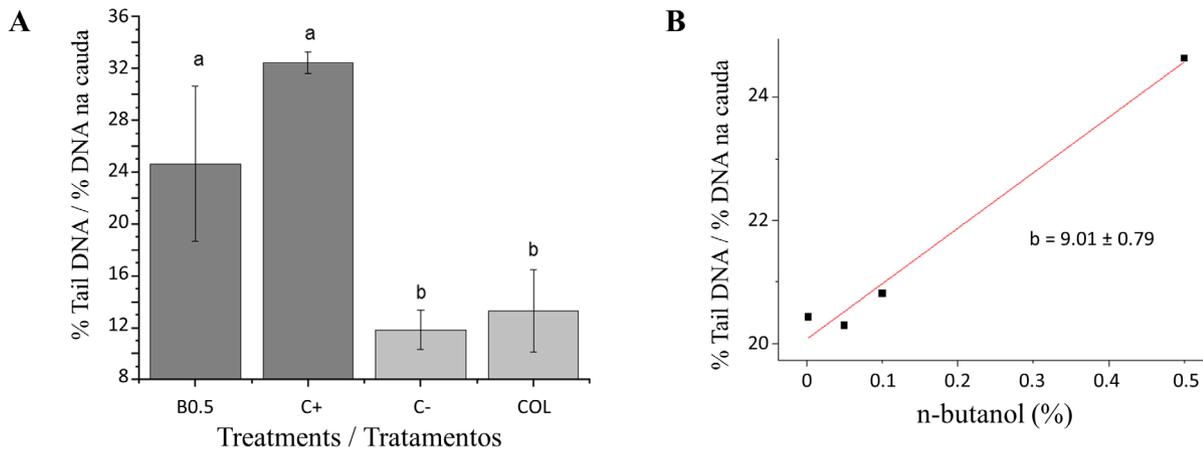


Figure 6 - A. Percentage Tail DNA in human peripheral blood white cells exposed to treatments. C-. negative control, C+. positive control (hydrogen peroxide), COL. 0.5% collagen solution, B0.5. 0.5% n-butanol. Analysis of variance and Tukey statistic, different letters are significant different ($p < 0.05$). **B.** % Tail DNA in function of the concentration variation of n-butanol ($p < 0.05$). Bar represents SD of $n=3$.

Figura 6.- A. Percentual de cauda de DNA em glóbulos sanguíneos periféricos humanos expostos a tratamentos. C-. controle negativo, C+. controle positivo (peróxido de hidrogênio), solução de colágeno de 0,5%, B0,5. 0,5% n-butanol. Análise de variância e estatística de Tukey, letras diferentes são significativas diferentes ($p < 0,05$). **B.** % de DNA na cauda em função da variação de concentração de n-butanol ($p < 0,05$). A barra representa DP de $n=3$.

fermentation with *Bacillus velezensis*, which has a high capacity to metabolize fat and proteins (38).

It has been shown that 1-butanol or n-butanol is absorbed through the skin and respiratory tract and produces pathological changes in the liver and kidneys in rats, but not a mutagenic or carcinogenic effect (39). Likewise, investigations in pregnant rats exposed to 1.0% n-butanol administered through water reported toxicity and a decrease in maternal and fetal body weight (40). For the Ames test, non-mutagenicity was reported for n-butanol (16). In contrast, zebrafish embryos exposed to n-butanol exhibited severe oxidative damage with consequent damages in liver and brain tissues, according to a recent study (41). However, our study revealed the possibility of genetic changes if n-butanol is continuously used for long periods of time.

In summary, we revealed the DNA fragmentation of interphase, specialized and viable cells exposed *in vitro* to n-butanol with the comet assay. Moreover, alterations in addition to DNA breaks were detected with the *Allium* test. However, further study is required to provide information about the mechanisms of action of the n-butanol DNA damage.

poderiam permanecer no colágeno. Devido ao baixo teor de gordura na pele da tilápia (3,85%) (35), em comparação com outras espécies de peixes, como *Sardinella maderensis* (26,0%) e *S. aurita* (24,0%) (36), o n-butanol poderia ser substituído por álcool etílico para remover a gordura (37). Outro tratamento alternativo para eliminar a gordura da matéria-prima é a fermentação com *Bacillus velezensis*, que tem alta capacidade de metabolizar gordura e proteínas (38).

Foi demonstrado que 1-butanol ou n-butanol é absorvido pela pele e trato respiratório e produz alterações patológicas no fígado e rins em ratos, mas não um efeito mutagênico ou cancerígeno (39). Da mesma forma, investigações em ratas gestantes expostas a 1,0% de n-butanol administrado através da água relataram toxicidade e diminuição do peso corporal materno e fetal (40). Para o teste de Ames, foi relatado efeito não mutagênico para o n-butanol (16). Em contraste, os embriões de peixes-zebra expostos ao n-butanol apresentaram danos oxidativos graves com consequentes danos nos tecidos hepáticos e cerebrais, de acordo com um estudo recente (41). No entanto, nosso estudo revelou a possibilidade da ocorrência em alterações genéticas se o n-butanol for continuamente utilizado por longos períodos de tempo.

Conclusions

In the safety assessment of collagen extract obtained from the tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin for cosmetic use, we concluded that n-butanol was a genotoxic compound used, with significant changes in the mitotic apparatus and chromosomes of *Allium cepa* as well as a high percentage of DNA in the tail of the comets. In addition, we revealed clear evidence to consider partial (n-butanol) replacement or the verification of its complete elimination with successive (water) washes to minimize its presence in the raw material for further preparations containing natural products, such as this collagen derived from sustainable sources. We note the importance of providing multiple proofs of the genotoxic activity of the chemicals used in the collagen extraction process to ensure the absence of potentially harmful contaminants in the materials to be used within cosmetic formulations.

Em resumo, revelamos a fragmentação de DNA de células em interfases, especializadas e viáveis expostas *in vitro* ao n-butanol com o ensaio do cometa. Outras alterações são evidenciadas, além de quebras de DNA com o teste de *Allium*. No entanto, mais evidências são necessárias para fornecer informações sobre os mecanismos de ação de danos de DNA do n-butanol.

Conclusões

Na avaliação de segurança do extrato de colágeno obtido da pele da tilápia (*Oreochromis niloticus*) para uso dermocosmético, concluímos que o n-butanol foi um composto genotóxico utilizado no processo, com alterações significativas no aparelho mitotístico e cromossomos de *Allium cepa*, bem como alta porcentagem de DNA na cauda dos cometas. Ademais, revelamos uma evidência clara para considerar a substituição parcial (do n-butanol) ou verificação de sua eliminação total por lavagens sucessivas para minimizar sua existência remanescente na matéria-prima para preparos adicionais contendo produtos naturais, como o colágeno derivado de fontes sustentáveis. Observamos a importância de fornecer evidências da atividade genotóxica dos produtos químicos utilizados no processo de extração de colágeno para garantir a ausência de possíveis contaminantes químicos nos materiais utilizados para outras formulações dermocosméticas.

Authors Contributions Statement

Conceptualization, Z.A.P., C.A.-J.; methodology, L.S.-T., N.R.-P.; formal analysis, A.R.B., D.S., C.A.-J., R.F.; investigation, Z.A.P., R.Q.-L., A.R.B., A.L.M.-J., C.A.-J., D.S.; writing - original draft preparation, Z.A.P., A.L.M.-J., F.D.S., A.R.B.; writing—review and editing, A.R.B., R.M.M., A.L.M.-J.; supervision, Z.A.P., C.A.-J.; project administration, Z.A.P., C.A.-J.; funding acquisition, Z.A.P., R.Q.-L., A.R.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

Authors are very thankful to CONCYTEC-FONDECYT, process E041-01 (Contract number 123-2018-FONDECYT-BM-IADT/AV), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Process 305250/2019-1, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) Finance Code 001 and Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD).

Acknowledgments

The authors are very thankful to Mónica Arqueros, biologist, for her help with the Comet Test.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Ethical Statement

This research was developed under the Ethical Process N°: 001-2020/CEI-UNT (Universidad de Trujillo).

Declaração sobre as contribuições do autor

Conceituação, Z.A.P., C.A.-J.; metodologia, L.S.-T., N.R.-P.; análise formal, A.R.B., D.S., C.A.-J., R.F.; investigação, Z.A.P., R.Q.-L., A.R.B., A.L.M.-J., C.A.-J., D.S.; redação - preparação original do rascunho, Z.A.P., A.L.M.-J., F.D.S., A.R.B.; redação e edição, A.R.B., R.M.M., A.L.M.-J.; supervisão, Z.A.P., C.A.-J.; administração de projetos, Z.A.P., C.A.-J.; aquisição de financiamento, Z.A.P., R.Q.-L., A.R.B. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Financiamento

Os autores são muito gratos ao CONCYTEC-FONDECYT, processo E041-01 (Contrato n° 123-2018-FONDECYT-BM-IADT/AV), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Processo 305250/2019-1, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) Código Financeiro 001 e Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD).

Reconhecimento

Os autores são muito gratos a Mónica Arqueros, bióloga, por sua ajuda com o Teste do Cometa.

Conflitos de Interesse

Os autores não declaram conflito de interesses.

Declaração Ética

Esta pesquisa foi desenvolvida no âmbito do Processo Ético N°: 001-2020/CEI-UNT (Universidad de Trujillo).

References / Referências

1. Salvatore, L., Gallo, N., Natali, M. L., Campa, L., Lunetti, P., Madaghiele, M., Blasi, F. S., Corallo, A., Capobianco, L., & Sannino, A. (2020). Marine collagen and its derivatives: Versatile and sustainable bio-resources for healthcare. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 113, 110963. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110963>
2. Venkatesan, J., Anil, S., Kim, S. K., & Shim, M. S. (2017). Marine Fish Proteins and Peptides for Cosmeceuticals: A Review. *Marine drugs*, 15(5), 143. <https://doi.org/10.3390/md15050143>
3. Hong, H., Fan, H., Chalamaiah, M., & Wu, J. (2019). Preparation of low-molecular-weight, collagen hydrolysates (peptides): Current progress, challenges, and future perspectives. *Food chemistry*, 301, 125222. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125222>
4. Halim, N.R., Yusof, H., & Sarbon, N.M. (2016). Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. *Trends in Food Science and Technology*, 51, 24-33. doi:10.1016/j.tifs.2016.02.007
5. Ge, B., Wang, H., Li, J., Liu, H., Yin, Y., Zhang, N., & Qin, S. (2020). Comprehensive Assessment of Nile Tilapia Skin (*Oreochromis niloticus*) Collagen Hydrogels for Wound Dressings. *Marine drugs*, 18(4), 178. <https://doi.org/10.3390/md18040178>
6. Mei, F., Liu, J., Wu, J., Duan, Z., Chen, M., Meng, K., Chen, S., Shen, X., Xia, G., & Zhao, M. (2020). Collagen Peptides Isolated from *Salmo salar* and *Tilapia nilotica* Skin Accelerate Wound Healing by Altering Cutaneous Microbiome Colonization via Upregulated NOD2 and BD14. *Journal of agricultural and food chemistry*, 68(6), 1621–1633. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08002>
7. Aguirre-Cruz, G., León-López, A., Cruz-Gómez, V., Jiménez-Alvarado, R., & Aguirre-Álvarez, G. (2020). Collagen Hydrolysates for Skin Protection: Oral Administration and Topical Formulation. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(2), 181. <https://doi.org/10.3390/antiox9020181>
8. Liao, W., Guanghua, X., Li, Y., Shen, X. R., & Li, C. (2018). Comparison of characteristics and fibril-forming ability of skin collagen from barramundi (*Lates calcarifer*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International journal of biological macromolecules*, 107(Pt A), 549–559. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.022>
9. Li, J., Wang, M., Qiao, Y., Tian, Y., Liu, J., Qin, S., & Wu, W. (2018). Extraction and characterization of type I collagen from skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its potential application in biomedical scaffold material for tissue engineering. *Process Biochemistry*, 74, 156-163. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.009>
10. Yamamoto, K., Igawa, K., Sugimoto, K., Yoshizawa, Y., Yanagiguchi, K., Ikeda, T., Yamada, S., & Hayashi, Y. (2014). Biological safety of fish (tilapia) collagen. *BioMed research international*, 2014, 630757. <https://doi.org/10.1155/2014/630757>
11. Pati, F., Datta, P., Adhikari, B., Dhara, S., Ghosh, K., & Das Mohapatra, P. K. (2012). Collagen scaffolds derived from fresh water fish origin and their biocompatibility. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 100(4), 1068–1079. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33280>
12. Hong, H., Fan, H., Roy, B. C., & Wu, J. (2021). Amylase enhances production of low molecular weight collagen peptides from the skin of spent hen, bovine, porcine, and tilapia. *Food chemistry*, 352, 129355. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129355>
13. Sun, L., Hou, H., Li, B., & Zhang, Y. (2017). Characterization of acid- and pepsin-soluble collagen extracted from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International journal of biological macromolecules*, 99, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.057>
14. Liu, W., Zhang, Y., Cui, N., & Wang, T. (2019). Extraction and characterization of pepsin-solubilized collagen from snakehead (*Channa argus*) skin: Effects of hydrogen peroxide pretreatments and pepsin hydrolysis strategies. *Process Biochemistry*, 76, 194-202. doi:10.1016/j.procbio.2018.10.017.
15. Benhusein, G. M., Mutch, E., Aburawi, S., & Williams, F. M. (2010). Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay. *The Libyan journal of medicine*, 5, 10.3402/ljm.v5i0.4637. <https://doi.org/10.3402/ljm.v5i0.4637>
16. McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., & Ames, B. (1975). Detection of Carcinogens as Mutagens in the Salmonella/Microsome Test: Assay of 300 Chemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(12), 5135-5139. <http://www.jstor.org/stable/65363>
17. Demir, Y., Uckaya, M., & Demir, N. (2019). Evaluation of the efficacy in cosmetic products safety: Comparison with biochemical substrates. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, 104, 56–58. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.03.001>
18. Prantl, E. M., Kramer, M., Schmidt, C. K., Knauer, M., Gartiser, S., Shuliakevich, A., Milas, J., Glatt, H., Meinel, W., & Hollert, H. (2018). Comparison of in vitro test systems using bacterial and mammalian cells for genotoxicity assessment within the "health-related indication value (HRIV) concept. *Environmental science and pollution research international*, 25(5), 3996–4010. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8166-z>
19. Fiskesjö G. (1985). The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102(1), 99–112. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>
20. Collins, A., Koppen, G., Valdiglesias, V., Dusinska, M., Kruszewski, M., Møller, P., Rojas, E., Dhawan, A., Benzie, I., Coskun, E., Moretti, M., Speit, G., Bonassi, S., & ComNet project (2014). The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. *Mutation research. Reviews in mutation research*, 759, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2013.10.001>
21. Giménez-Abián, M.I., Torre, C., & López-Sáez, J.F. (1987). Growth and cell proliferation in Allium roots at different oxygen tensions. *Environmental and Experimental Botany*, 27, 233-237..
22. Azqueta, A., & Collins, A. R. (2013). The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of toxicology*, 87(6), 949–968. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1070-0>
23. Amésquita, L., Cruz-Briceño, M. N., & Prieto, Z. (2018). Daño en el ADN de linfocitos humanos por efecto de cloroquina [Damage to human lymphocyte DNA from chloroquine effect]. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 35(3), 471–475. <https://doi.org/10.17843/rpmpesp.2018.353.3166>
24. Reisinger, K., Blatz, V., Brinkmann, J., Downs, T. R., Fischer, A., Henkler, F., Hoffmann, S., Krul, C., Liebsch, M., Luch, A., Pirow, R., Reus, A. A., Schulz, M., & Pfuhler, S. (2018). Validation of the 3D Skin Comet assay using full thickness skin models: Transferability and reproducibility. *Genetic toxicology and environmental mutagenesis*, 827, 27–41. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.01.003>

25. Calvo, A., Cruz, J.L., Gutiérrez, C., García-Herdugo, G., Giménez-martin, G., & López-Sáez, J.F. (1982). Analysis of cell cycle in root meristems. *Journal of Theoretical Biology*, *96*, 295-308. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(82\)90226-0](https://doi.org/10.1016/0022-5193(82)90226-0).
26. Bonciu, E., Firbas, P., Fontanetti, C.S., Wusheng, J., Karaismailoğlu, M.C., Liu, D., Menicucci, F., Pesnya, D.S., Popescu, A., Romanovsky, A., Schiff, S., Ślusarczyk, J., Souza, C.P., Srivastava, A., Şuğan, A., & Papini, A. (2018). An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. *Caryologia*, *71*, 191 - 209. doi:10.1080/00087114.2018.1503496
27. Thadani, R., Kamenz, J., Heeger, S., Muñoz, S., & Uhlmann, F. (2018). Cell-Cycle Regulation of Dynamic Chromosome Association of the Condensin Complex. *Cell reports*, *23*(8), 2308–2317. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.082>.
28. Batty, P., & Gerlich, D. W. (2019). Mitotic Chromosome Mechanics: How Cells Segregate Their Genome. *Trends in cell biology*, *29*(9), 717–726. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.05.007>
29. Leone, M., & Engel, F. B. (2019). Pseudo-bipolar spindle formation and cell division in postnatal binucleated cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, *134*, 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.07.005>
30. Fletcher, L., & Muschel, R. J. (2006). The centrosome and the DNA damage induced checkpoint. *Cancer letters*, *243*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.01.006>
31. Tanaka K. (2014). Centrosome duplication: suspending a license by phosphorylating a template. *Current biology : CB*, *24*(14), R651–R653. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.06.008>.
32. Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C. C., & Stetina, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, *23*(3), 143–151. <https://doi.org/10.1093/mutage/gem051>
33. 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>
34. Olive, P. L., & Durand, R. E. (2005). Heterogeneity in DNA damage using the comet assay. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, *66*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20154>
35. Alfaro, A.T., Fonseca, G., Balbinot, E., Machado, A.G., & Prentice, C. (2013). Physical and chemical properties of wami tilapia skin gelatin. *Food Science and Technology International*, *33*, 592-595. doi.org/10.1590/S0101-20612013005000069
36. Njinkoué, J. M., Barnathan, G., Miralles, J., Gaydou, E. M., & Samb, A. (2002). Lipids and fatty acids in muscle, liver and skin of three edible fish from the Senegalese coast: *Sardinella maderensis*, *Sardinella aurita* and *Cephalopholis taeniops*. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, *131*(3), 395–402. [https://doi.org/10.1016/s1096-4959\(01\)00506-1](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(01)00506-1)
37. Menezes, M., Ribeiro, H. L., Abreu, F., Feitosa, J., & Filho, M. (2020). Optimization of the collagen extraction from Nile tilapia skin (*Oreochromis niloticus*) and its hydrogel with hyaluronic acid. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, *189*, 110852. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110852>
38. Song, Z., Liu, H., Chen, L., Chen, L., Zhou, C., Hong, P., & Deng, C. (2021). Characterization and comparison of collagen extracted from the skin of the Nile tilapia by fermentation and chemical pretreatment. *Food chemistry*, *340*, 128139. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128139>
39. International Programme on Chemical Safety, United Nations Environment Programme, International Labour Organization & World Health Organization. (1987). Butanols - four isomers: 1-butanol, 2-butanol, tert-butanol, isobutanol. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/37266>
40. Ema, M., Hara, H., Matsumoto, M., Hirose, A., & Kamata, E. (2005). Evaluation of developmental toxicity of 1-butanol given to rats in drinking water throughout pregnancy. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, *43*(2), 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.11.003>
41. Köktürk, M., Alak, G., & Atamanalp, M. (2020). The effects of n-butanol on oxidative stress and apoptosis in zebra fish (*Danio rerio*) larvae. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, *227*, 108636. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108636>