



00346
3
29.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**EL METABOLISMO VEGETAL Y ANIMAL EN LA EXPRESION
MUTAGENICA DE ALGUNOS HERBICIDAS CARBAMICOS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)
P R E S E N T A
ELVIA COBALLASE URRUTIA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. SANDRA LUZ GOMEZ ARROYO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1997



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN

LABORATORIOS DE CITOGENETICA Y MUTAGENESIS AMBIENTALES

DEL

CENTRO DE CIENCIAS LA ATMOSFERA UNAM

LABORATORIO DE GENETICA MICROBIANA

DEL

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES

DEDICATORIAS

**A la memoria de mi madre
Profra. Celia Urrutia G.
Por tu ejemplo, amor y comprensión,
he llegado a realizar la más grande de mis metas**

**A mi padre
Ing. Cándido Coballase M.
Por el apoyo, confianza y consejos
que me has dado
con todo mi amor y agradecimiento**

**A mis hermanas
Rocío y Celia Ena
por su ayuda y cariño**

Gracias a ustedes tengo la herencia mas valiosa que pudiera recibir

**A mi director de tesis
Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo
Por ser guía y ejemplo para mi vida profesional**

**Al Dr. Rafael Vimalobos Pietrini
Por su valiosa colaboración**

**A la M en C. Matilde Breña Valle
Por la atención y asesoría al presente trabajo en el laboratorio del ININ**

Infinitas gracias

**A los honorables miembros del jurado
por sus enriquecedoras aportaciones**

**Dr. Rafael Villalobos Pietrini
Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz
Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo
Dr. Stefan Marian Waliszewi Kubiak
M en C. Matilde Breña Valle
Dra. María Cristina Pérez-Amador
Dr. Luis Felipe Jiménez García**

INDICE

CONTENIDO	PAG
Resumen	1
Introducción	2
Metabolismo de xenobióticos	3
Activación metabólica en plantas	4
Metabolismo vegetal de pesticidas	5
Metabolismo animal de pesticidas	7
Fitagüicidas carbámicos	8
Herbicidas carbámicos	11
EPTC	14
Asulam	16
Diferentes agentes químicos empleados como testigos en las pruebas de mutagenicidad	17
Sistemas de evaluación del daño genético	19
Prueba de Ames	20
Prueba de metabolismo vegetal	21
Objetivos	23
Materiales y métodos	24
Resultados y discusión	29
Referencias	32
Tablas y figuras	44

RESUMEN

La introducción de los plaguicidas y de otros agroquímicos en el campo, ha incrementado el contenido de contaminantes, además de ser un riesgo inherente. Su empleo indiscriminado provoca su acumulación en sistemas biológicos, alcanzando niveles tóxicos que hacen peligrar a las especies y al equilibrio ecológico.

Además de la toxicidad de muchos plaguicidas la exposición a ellos representa un riesgo para la salud ya que estos pueden también provocar daño genotóxico cuyas consecuencias al final de una serie de eventos es la iniciación del cáncer. Por ello hay gran interés en valorar la presunta genotoxicidad de una gran variedad de compuestos químicos, entre ellos a los plaguicidas, mediante diferentes tipos de pruebas. Las llamadas de tiempo corto son las más utilizadas y en general manejan microorganismos procariontes. Estas pruebas consisten de (a) las células bacterianas indicadoras del daño genético y (b) un sistema metabolizador donde el compuesto que se quiere evaluar se incuba con una fracción enzimática, simulando el metabolismo realizado por un organismo superior ya sea mamífero o ya sea planta. El daño genético se expresa por un aumento en la frecuencia de bacterias mutadas o por el incremento de células revertantes.

En México los herbicidas carbámicos **Asulam** y **EPTC** se usan ampliamente en el control de hierbas y malezas especialmente en siembras de gramíneas y legumbres, muy importantes en la dieta.

En este estudio se empleó un filtrado de células de tabaco (*Nicotiana tabacum*) de la línea TX1 y la mezcla enzimática S9 de mamífero para la transformación de los herbicidas antes mencionados y como criterio de evaluación del daño genético la frecuencia de mutación revertante de las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium* utilizando el método de metabolismo vegetal y el de Ames.

Como testigos negativos se emplearon medios de cultivo líquido MX+ y MX- y como testigos positivos a 4-nitro-fenilendiamina (4-NPD) y 2-aminofluoreno (2-AF) para la prueba de metabolismo vegetal y en el ensayo de Ames amortiguador de fosfatos (pH 7.4) y como testigos positivos azida de sodio (NaN₃), 4-NPD y 2-AF.

Se valoraron además diversas concentraciones tanto del **asulam** como del **EPTC** con y sin la participación de la mezcla S9 proveniente de plantas o de mamíferos, para determinar el nivel de toxicidad en las bacterias.

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba SALANAL diseñada para experimentos de mutagénesis en *Salmonella*.

Ambos herbicidas dieron resultado negativo tanto con como sin activación metabólica. Sin embargo se notó que en todos los casos, a medida que aumentaba la concentración disminuía el número de revertantes.

INTRODUCCION

La contaminación, considerada en su totalidad ocupa la atención de todo el mundo y el progreso tecnológico de los últimos 40 años la ha agudizado notablemente, pero éste no puede anularse, pues de él se han recibido innumerables beneficios. En la actualidad el uso de productos químicos que se integran al ambiente, representa un peligro potencial para la salud humana (Litterst y Lichtenstein 1971), además de que el riesgo de enfermar de cáncer en la población se ha incrementado de 0.02 por millón de habitantes a 2000, también han aumentado las alteraciones neurológicas, inmunológicas y reproductivas las cuales pueden deberse a tales agentes cuando el ser humano se expone inadvertidamente (Lang 1993, Sullivan et al 1993, Woodruff et al. 1994)

Los plaguicidas se incorporan a los ciclos biológicos, geológicos y químicos de la tierra y sus derivados se pueden detectar en el aire, el suelo, el agua, las plantas, los animales y en el hombre. El empleo indiscriminado provoca su acumulación en diversos sistemas biológicos alcanzando niveles tóxicos que hacen peligrar a las especies y alteran el equilibrio ecológico.

A los plaguicidas se les considera como microcontaminantes y por sus características de reciclaje y biotransformación, crean problemas de acumulación acelerando así los procesos de deterioro ambiental (IPCS 1986)

La habilidad para detectar compuestos mutagénicos en el ambiente entre ellos a los plaguicidas por una gran variedad de sistemas de prueba con diferentes grados de complejidad y sensibilidad se han descrito (Ames et al. 1975b, Shirasu et al 1976, Moriya et al. 1983, de Flora et al. 1984, Plewa et al. 1984a), estos también han incorporado un sistema metabolizador suplido exógenamente que simula el metabolismo realizado en células de mamífero o de vegetal, ya que el hecho de que no sólo los animales sino también las plantas metabolizan a los plaguicidas es de gran interés pues los intermediarios formados pueden causar daño mutagénico en la misma planta, o al ser conjugados y almacenados, pueden liberarse más adelante al ser consumidos por los animales o por el hombre (Sanderman 1988).

Por esta razón el desarrollo y el empleo apropiado de los distintos sistemas de prueba para la valoración de estos procesos es de gran importancia, ya que de los resultados de éstos se podrán establecer leyes además de la reglamentación de sus usos para disminuir el riesgo que puedan implicar, por ello es relevante la realización de ensayos que conduzcan a la demostración de la presencia de productos metabólicos peligrosos en los vegetales y animales de consumo en la dieta.

Metabolismo de xenobióticos

Todo organismo está expuesto a los muchos agentes xenobióticos (agente externo extraño a un organismo, entre los que se encuentran plaguicidas, diferentes partículas suspendidas en el aire, medicamentos, diversos compuestos químicos entre otros) que son globalmente dispersados a través de las vías terrestres, aéreas o acuáticas y que pueden ser metabolizados tanto en plantas como en animales (Sanderman 1982, 1988), está bien documentado que los sistemas enzimáticos de los mamíferos y de las plantas pueden transformarlos en compuestos no mutagénicos (al ser desintoxicados), promutagénicos o mutagénicos (al ser metabolizados) pueden transformarse en un metabolito activo que daña al ADN.

Las propiedades mutagénicas de los xenobióticos y sus metabolitos han recibido especial atención, ya que gran cantidad de carcinógenos químicos también son mutágenos (McCann et al. 1975a, Sigimura 1982, Swenberg 1989, Eder et al. 1993), además en muchos casos la actividad mutagénica de un xenobiótico requiere antes del metabolismo para transformarse en un compuesto activo que pueda dañar al ADN, por lo que se les designa como promutágenos o mutágenos indirectos (Plewa y Gentile 1982, Sanderman 1988).

La mayoría de los sistemas enzimáticos en los mamíferos participan en oxidaciones, hidroxilaciones y conjugaciones y están asociados al sistema de monooxigenasas de función mixta (MFO) del cual forman parte los citocromos P-450. El hígado es el principal responsable de las reacciones de oxidación como la desulfuración, la hidroxilación y la formación de ácido mercaptúrico (Shimabukuro et al. 1982, IPCS 1986, Higashi 1988, Cashman y Olsen 1989) de gran cantidad de pesticidas y contaminantes ambientales (González et al. 1991) y que para causar daño al ADN deben ser antes metabolizados, estas reacciones son las principales rutas de desintoxicación, vía orina o heces focales.

En las plantas las MFO catalizan la transformación de distintos pesticidas, mediante reacciones de oxidación. Además hay peroxidasas y otras oxigenasas involucradas en el metabolismo (Shimabukuro et al. 1982, IPCS 1986, Higashi 1988, Cashman y Olsen 1989, Grant 1994, Jablankai y Hatzios 1994).

Los productos finales en forma de conjugados son polimerizados por las plantas e incorporados a los componentes estructurales, sin que representen ningún daño a la planta (Higashi 1988).

La importancia de que no sólo los animales sino también las plantas activen a los xenobióticos radica en que el metabolito formado en la planta además de causar daño mutagénico en ella misma, al ser conjugado y almacenado, es posible también que se libere cuando es consumido por los animales o el hombre (Sanderman 1988).

Por todas estas razones la evaluación de los efectos genotóxicos provocados por los xenobióticos y principalmente en las plantas no puede ser ignorado, pues éstas son el sustento de muchos organismos, además de ser parte de la cadena alimenticia, sus consecuencias pueden ser nocivas no sólo para las propias plantas si no también para los animales y el hombre.

Activación metabólica en plantas

Los primeros informes de que numerosos xenobióticos presentan actividad mutagénica fueron reportados por Oehlker en los años 1943 y 1949 (citado por Ehrenberg 1971). La utilización de diferentes sistemas de prueba en plantas y los efectos genéticos de éstos han sido ampliamente descritos (Ehrenberg 1971, de Serres y Shelby 1978, Constantin et al. 1981, Grant et al. 1981, Grant 1994, Plewa y Gentile 1982)

Considerando la gran cantidad de agentes químicos existentes y que una parte de ellos puede ser utilizada en la agricultura, así como el hecho de que las plantas pueden activarlos e introducirlos en la cadena alimenticia pudiéndose incorporar a la dieta humana es motivo de interés y preocupación ya que al evaluarse la genotoxicidad de insecticidas, herbicidas y fungicidas, se han descrito resultados positivos en los diferentes sistemas de prueba (Amer et al. 1971, WHO 1976, Mariya et al. 1983, Velemínsky y Gichner 1982, Plewa et al. 1984a, Gentile et al. 1986, Higashi 1988, Zeiger et al. 1992, Valencia-Quintana et al. 1993).

Un mutágeno ambiental es un agente físico o químico liberado al medio que puede alterar al genoma o a sus propiedades funcionales. Un promutágeno es un agente químico que sin ser mutagénico puede ser biotransformado a mutágeno, por lo que al proceso por el cual una sustancia no mutagénica es convertida por la acción biológica de la planta en un mutágeno se denomina activación vegetal (Plewa y Gentile 1982)

Hoy en día una de las fuentes importantes de contaminación son los plaguicidas, sumamente útiles para la agricultura pero que representan riesgo para el ambiente y la salud humana.

El efecto genotóxico de herbicidas e insecticidas ha sido evaluado, mediante varios procedimientos tanto *in vivo* como *in vitro* (Plewa y Gentile 1976, Gentile et al. 1982, Plewa et al. 1984b, Velemínsky y Gichner 1988), usando plantas intactas en condiciones semejantes a los de campos agrícolas. Estos estudios revelaron problemas como: contaminación microbiana del material vegetal, artefactos introducidos en los ensayos con microorganismos, el manejo de la dosimetría en los tratamientos, las posibles modificaciones de los metabolitos, o la inducción de reacciones químicas durante la homogeneización, la extracción y la concentración de las muestras, entre otros (Plewa y Gentile 1982), por lo que se desarrollaron otras técnicas con

homogeneizados de células (Gentile et al. 1982,1985, Takechisa y Kanaya 1982, Higashi 1988), o células de plantas en cultivo (Plewa et al. 1983), teniendo como desventajas: que la pared de los vegetales dificulta la ruptura obstaculizándose la obtención de las fracciones celulares y los fragmentos de membrana contaminan las fracciones.

Un modelo biológico que permite detectar la transformación biológica, así como el daño genético, son las células vegetales empleadas como organismo metabolizador en cocultivo con microorganismos que son los indicadores del daño mutagénico (Plewa y Gentile 1976, 1982, Hanscn et al. 1985, Plewa et al. 1988, Wagner et al. 1989). En esta técnica denominada cocultivo las células vegetales y los microorganismos se incuban en un medio adecuado, junto con el compuesto a evaluar, la activación se detecta por el crecimiento del microorganismo en un medio selectivo, mientras que la viabilidad de ambos tipos celulares se monitorea por separado (Plewa et al. 1988).

Metabolismo vegetal de pesticidas

Los términos biotransformación y metabolismo son usados indistintamente para describir la suma de procesos biológicos que alteran la estructura del plaguicida dentro de las células o el sistema.

Estos pueden o no ser mediados por métodos enzimáticos y no necesariamente ocurren dentro de los organismos, sino que también en el suelo por un ataque microbiano, en la superficie de las hojas o dentro de la planta (Wain y Smith 1976, Shimabukuro 1985).

El uso de plaguicidas para la protección de cosechas en contra de hierbas, insectos, hongos, nemátodos y otros seres vivos, se ha incrementado a lo largo del tiempo. Una gran variedad de plaguicidas entre los que se incluyen insecticidas, herbicidas y fungicidas, entre otros y que se aplican a las plantas, son perjudiciales de manera directa o pueden ser degradados hacia formas tóxicas o no tóxicas. Ello indica la importancia de conocer los productos del metabolismo intermedio y su última fase, cuando se acumulan en las plantas.

Con respecto a su susceptibilidad para sufrir transformación dentro de la planta, a los plaguicidas y en especial a los herbicidas comúnmente se les clasifica en 1) estables, los cuales no sufren transformación 2) metabólicamente desactivados y 3) metabólicamente activados.

La naturaleza química, la cantidad de metabolitos intermedios y los residuos insolubles en las plantas son influenciados por los sitios de absorción, transporte, distribución y tiempo de residencia en la planta. Las raíces y la superficie de las hojas son los principales sitios de absorción, mientras que el transporte y distribución se llevan al cabo en el sistema vascular (xilema y floema), donde se encuentra la mayoría de los centros de actividad metabólica.

Los mecanismos de biotransformación están basados en los sistemas enzimáticos de las plantas y las reacciones más importantes son las de oxidación, hidroxilación, conjugación y en menor medida las de reducción (Shimabukuro et al 1982).

Tanto en vegetales como en animales son tres las fases involucradas en estos procesos. La fase 1 de la reacción es la más importante pues la estructura química se relaciona con la reacción que puede llevarse al cabo y que incluye procesos de oxidación, reducción y/o hidrólisis. Se pueden formar metabolitos con toxicidad reducida o modificada o incrementar la predisposición de la molécula original para la fase 2 de la reacción, donde se producen reacciones de síntesis para la conjugación, constituyendo metabolitos que pueden reducir o no la fitotoxicidad, aumentar su solubilidad en agua, limitar su movilidad, e incrementar la excreción o desintoxicación. Por último en la fase 3 de la reacción los conjugados formados se convierten en conjugados secundarios o residuos de uniones insolubles como los biopolímeros de lignina que son prácticamente inocuos para la planta, o pueden unirse a las taninas, pectinas, polisacáridos u otros componentes vegetales, su incorporación depende del herbicida, de su ruta metabólica, de las especies vegetales y de sus partes (tejidos, órganos entre otros) (Shimabukuro et al. 1982, Shimabukuro 1985, Sanderman 1988).

Las reacciones de oxidación catalizadas por la oxidasa de función mixta (MFO), dan por resultado la desintoxicación o activación, las peroxidasas y las oxidasas llevan a cabo N/O-desalquilación, hidroxilación aromática, alquil oxidación, epoxidación, desulfuración, sulfuro oxidación, la hidrólisis de ésteres así como la oxidación de nitrógeno (Lamoureux y Frear 1979).

La reducción es menos frecuente aunque se realiza con plaguicidas que contienen amino anilinas (Shimabukuro et al. 1982). La hidrólisis de ésteres, amidas y nitrilos son reacciones comunes en las plantas que puede formar parte de un mecanismo selectivo de desintoxicación para varios pesticidas (Shimabukuro et al 1982). Mediante la conjugación, los compuestos no polares se convierten a formas más hidrofílicas para su eliminación, se considera como una reacción secundaria y puede determinar la estructura final de la molécula antes de ser excretada. Tiene un papel importante en la desintoxicación, selectividad y actividad biológica en la planta ya que constituye productos conjugados con glucósidos, aminoácidos (predominantemente con herbicidas ácidos) y glutatona; estos conjugados pueden ser compartamentalizados, removidos por otros mecanismos o simplemente ser metabolitos inmóviles en las plantas (Shimabukuro et al. 1978, 1982, Lamoureux y Rusness 1981).

Metabolismo animal de pesticidas

Muchas de las reacciones involucradas en la biotransformación de los pesticidas transcurren en tres fases.

En la primera se dan predominantemente las de oxidación, reducción e hidrólisis es mediada por microsomas y son catalizadas por las isoenzimas del citocromo P-450 dependientes del sistema de monooxigenasas y la flavin dependiente de la monooxigenasa (que se encuentra en grandes cantidades en el hígado, riñón y pulmón).

En la segunda se desarrollan las de conjugación en la cual están involucrados los compuestos elaborados en la fase I con una o varias moléculas solubles en agua y por lo tanto son productos excretables en las que se pueden formar los conjugados con los glucocoronoides (conjugación con glucosa, glutatión o con aminoácidos) entre las reacciones que se llevan al cabo estan la N/O-desalquilación, S-desalquilacion, desaminación, epoxi oxidacion, sulfoxidación, N-oxidación, reducción e hidrólisis (Shimabukuro et al 1982, Kulkarni y Hodgson 1984).

En la fase tres de reacción los conjugados formados son convertidos en conjugados secundarios que son menos tóxicos y fáciles de excretar via orina o heces fecales.

En general los metabolitos son menos tóxicos que el compuesto original y la molécula original del compuesto es mas soluble y fácil de excretar (Shimabukuro et al. 1982).

PLAGUICIDAS CARBAMICOS

Antecedentes históricos

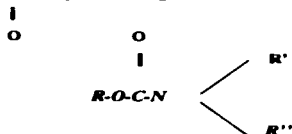
Desde el años 70 A.C. se tiene conocimiento del uso de arseniados como insecticidas. En el siglo pasado se empleaban ya diferentes sales metálicas y en este se utilizan una gran variedad de plaguicidas basados en extractos de plantas y diversos productos químicos. Los primeros han ido perdiendo terreno por su escasa efectividad para algunos insectos y gradualmente han sido reemplazados por los segundos, que se elaboran a partir de compuestos clorados, como el DDT, insecticida residual persistente, el lindano, heptacloro, el aldrin y el dieldrin, entre otros con permanencia en el ambiente por periodos largos. Además tienen efecto sobre muchas otras especies que no son su blanco aparte de aquellas para las que se emplearon y son neurotóxicos, por lo que la mayoría han sido sustituidos por compuestos carbámicos y por organofosforados.

Inicialmente los plaguicidas carbámicos se obtenían de semillas de *Physostigma venenosum* de la que se extrajeron los alcaloides eserina y fisostigmina. Mas adelante a partir de ellos se iniciaron las síntesis de otros derivados nuevos (Moutschen-Dahmen et al. 1976, 1979).

Propiedades generales y usos

Los carbamatos se comienzan a utilizar a partir de 1945 y se caracterizan por su baja toxicidad para los animales de sangre caliente por su poca persistencia en el ambiente y por sus productos de descomposición inocuos.

Todos ellos tienen en común la presencia en la estructura química de un ácido carbámico como grupo funcional HO-C-NH_2 y la fórmula general es :



En donde R' y R'' son casi siempre grupos metilo o átomos de hidrógeno y R diferentes radicales como grupos aromáticos, heterocíclicos y/o pirazólicos.

Estos compuestos se estabilizan por la adición de un grupo alquilo o arilo, tienen actividad anticolinesterasa y entran a los fluidos animales cuando se aplican directamente o al consumir productos contaminados indirectamente, su persistencia en el ambiente es corta, son rápidamente metabolizados por microorganismos, solubles en agua, moderadamente solubles en benceno, tolueno, xileno, cloroformo y diclorometano, ligeramente solubles en metanol, etanol y acetona, susceptibles a la luz, calor y oxidación del aire (Kuhr y Doroug 1976).

Son formulados en granos, polvos y líquidos. Se emplean en la agricultura como insecticidas, herbicidas, fungicidas y nematocidas, para uso doméstico y control sanitario de plagas y enfermedades públicas como paludismo y malaria, entre otras (Kuhr y Doroug 1976).

Efecto genético, tóxico y metabolismo

La toxicidad de este grupo de plaguicidas es debida a que la mayoría de los carbamatos son supresores de la acetilcolinesterasa y pueden no requerir de la activación metabólica, sin embargo varios carbamatos con grupos benzimidazoles pueden carecer de actividad anticolinesterasa. Los productos formados durante el metabolismo son generalmente menos tóxicos que el propio compuesto.

Los carbamatos pueden inhibir las esterasas que tienen serina en su centro catalítico, esto es, la enzima acetilcolinesterasa al unirse al carbamato constituye un complejo que es la enzima carbamilada, la cual ya no se puede hidrolizar y no forma colina ni ácido acético por lo que siguen los impulsos o contracciones nerviosas, por las altas concentraciones de acetilcolina esto puede llegar a la tetanización o a la parálisis. Los efectos tóxicos tienen una variedad de síntomas y eventualmente sucede el paro respiratorio y la muerte.

La regeneración de la enzima carbamilada a acetilcolinesterasa es relativamente rápida al producirse la hidrólisis habiendo un rápido reestablecimiento en el organismo y cuando ocurre esto el efecto es insignificante (Schlagbauer y Schlagbauer 1972, IPCS 1986).

La descomposición hidrolítica de los carbamatos no solo se lleva a cabo en el sistema nervioso y en el plasma por la acetil colinesterasa sino también por el sistema enzimático MFO (Schlagbauer y Schlagbauer 1972, Aldrige y Reiner 1982, Fukuto 1990, González et al. 1991).

La DL₅₀ oral en animales varía de 1 mg/kg/pcso a 5000 mg/kg/pcso, la DL₅₀ dérmica es alrededor de 500 mg/kg/pcso, la toxicidad por inhalación es de 5-7 mg/m³/h en perros a 28 mg/m³/h en cobayos (Moutschen-Dahmen et al. 1984).

La intoxicación aparece a los pocos minutos de la absorción que puede ser a través de la piel, tracto respiratorio o por vía oral. Los síntomas varían por ejemplo: pueden presentarse efectos muscarínicos como (salivación, lagrimeo, broncoconstricción, dilatación de la pupila, vómito, diarrea entre otros) o nicotínicos (fatiga, confusión mental, convulsiones, coma, depresión de la respiración y otros) (Kaloyanova y Fournier 1971, WHO 1976).

Con respecto a su acción a nivel genético se ha descrito que en pruebas de mutagenicidad en microorganismos generalmente dan resultados negativos (Ashwood-Smith et al. 1972, Sieber y Lempert 1974, McCann et al. 1975a, Brusick et al. 1980, Woo 1983, Moutschen-Dahmen et al. 1984). Sin embargo carbendazim, triallato, sulfalato y carbofurán son positivos en el ensayo de Ames, en cepas TA100 utilizando diferentes herbicidas tiocarbámicos que en su estructura química tienen al grupo dimetil, obtienen resultados positivos (Moriya et al. 1983), otro herbicida el benomilo es mutagenico en *E. coli* WP2 y *Aspergillus nidulans* (Moutschen-Dahmen et al. 1984).

Diversos plaguicidas carbámicos causan rompimientos cromosómicos en *Hordeum vulgare* (Wuu y Grant 1966, 1967), anomalías cromosómicas en *Vicia faba* y *Gossypium barbadense* (Amer et al. 1971), agrupamientos y adhesividad en los cromosomas pero no aberraciones estructurales en *Poa ciliata* (Reddy et al. 1974), otros efectos que se han encontrado son alteraciones cromosómicas como fragmentos y puentes sencillos, isocromosomas, alteraciones en el huso acromático además del bajo índice mitótico en células meristemáticas de *Vicia faba* (Valencia-Quintana et al. 1993) asimismo fueron evidenciados rompimientos, intercambios y huecos en fibroblastos de criceto chino (Ishidate y Odashima 1977), en la prueba de micronucleos en ratones se obtuvieron resultados negativos (Seiler 1977).

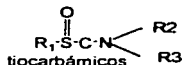
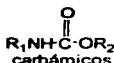
La actividad teratogénica se evaluó en patos, embriones de pollo y en peces sin embargo en perros, ratas albinas y conejo albino, no se evidenciaron efectos (Moutschen-Dahmen et al. 1984) y se han observado además que son carcinogénicos y/o mutagénico en ratas y ratones (Woo 1983).

Las transformaciones que sufren los pesticidas carbámicos y sus derivados dependen de los organismos sobre los cuales actúan. El metabolismo en general se realiza al mismo tiempo que los procesos de desintoxicación, la distribución en los órganos y la excreción es rápida siendo de algunas horas a varios días; se conoce que al ser metabolizados en el cuerpo humano se originan metabolitos menos tóxicos y en raras ocasiones más tóxicos (FAO/WHO 1984).

El metabolismo se efectúa por una amplia gama de reacciones químicas, en general en los mecanismos de desintoxicación se involucran rompimientos de uniones éster y oxidación en donde los productos finales son aminas, CO_2 , alcohol o fenoles. Las oxidasas de función mixta en el hígado, riñón y pulmón son las responsables de la función oxidante (Reiner y Skrinjarí-Spoljar 1968, Sakai y Matsumura 1971), la hidrólisis e hidroxilación es otra manera en que se lleva al cabo la formación de conjugados, esto precedido por la introducción de un grupo hidroxilo o sulfhidrilo, originándose conjugados como glucoronoides, sulfatos y ácidos mercaptúricos que son rápidamente excretados vía orina o heces (Fukuto 1972, Oonithan y Casida 1986).

Herbicidas carbámicos

Los herbicidas carbámicos comprenden los carbamatos, tiocarbamatos y ditiocarbamatos, a cuyos ácidos se asignan las fórmulas estructurales siguientes :



R_1 son grupos alquilo

R_2 son grupos alquilo o aromático

R_3 son grupos alquilo, aromático o cíclico

Los carbamatos fueron los primeros derivados que se estudiaron y a este grupo pertenecen herbicidas como profam, cloroprofam, barbán entre otros, de constitución relativamente sencilla.

Al investigarse la influencia de la estructura molecular en relación a la eficiencia herbicida, se ha comprobado que la prolongación de la cadena unida al oxígeno disminuye la actividad (Barberá 1976).

La penetración de los herbicidas carbámicos se ejerce normalmente por su absorción a través de las raíces y por las hojas, su acción es mediante el bloqueo de la síntesis de amino ácidos, lípidos, carotenoides, celulosa, folatos así como por la inhibición de la división celular y la fotosíntesis (Duke 1990).

En los mamíferos la absorción es a través de la piel, membranas mucosas, tracto respiratorio y gastrointestinal.

Los microorganismos del suelo los degradan rápidamente, por lo que tienen poca persistencia (Barbera 1976).

La toxicidad de este tipo de herbicidas ha sido monitoreada en ratas a las cuales se les han administrado dosis de diallato, triallato, pebulato y molinato (0.5-200 mg/kg) los síntomas observados son anorexia, hipersalivación, lagrimeo, piloerección, hipotermia, depresión, fibrilación muscular, incoordinación, convulsiones, las necropsias han revelado parálisis respiratoria, dilatación vascular en el cerebro, cerebelo, viseras, hemorragia meningeal, daño gonadal y cambio en la estructura de los espermatozoides, no se observaron anomalías fetales (WHO 1976).

En estudios con ratas administradas con diallato (400 mg/kg) durante 90 días, se observó, baja de peso, irritabilidad, hiperactividad, cambios cardíacos pero no muerte, con cicloato administrada a perros en dosis de (240 mg/kg) por 90 días, no se observan síntomas de toxicidad.

Con referencia a su genotoxicidad con la prueba de Ames se han obtenido resultados positivos en las cepas TA100 y TA1535 con S9 utilizando los herbicidas triallato y diallato (WHO 1976).

En estudios con cultivo de linfocitos humanos al aplicar benomilo no se incrementa la frecuencia de aberraciones cromosómicas (Machemer y Pickel 1994) Asimismo, han sido descritas evidencias de carcinogenicidad utilizando zectran, carbaril y benomilo (Woo 1983).

El molinate induce rompimientos cromatídicos e isocromatídicos, anillos cromatídicos, fragmentos y puentes, además de alteraciones en el huso mitótico de *Vicia faba* (Gómez-Arroyo et al. 1992), otros efectos con butilato y molinate en *Vicia faba* son el incremento de ICH y en linfocitos humanos tratados con la fracción S10 de ésta planta (Calderón-Segura 1997 comunicación personal).

La información que se tiene del metabolismo de los carbamatos en las plantas y en los animales y sobre todo en la naturaleza, toxicidad de los residuos y/o productos, así como las características de los sistemas enzimáticos y/o enzimas específicas y de los efectos genotóxicos que producen es escasa.

Estudios de metabolismo en ratas a las que se les administra el herbicida pebulato vía oral, se observa que fue excretado rápidamente en las primeras 24 h en 51% y 80% después de 3 días, siendo de 55% como bióxido de carbono, 23% en orina, 5% en las heces, se encuentran pequeñas concentraciones en órganos como hígado, pulmón y riñón, además de la sangre de la cual se elimina en un periodo de 7 días (WHO 1976).

El metabolismo se efectúa rápidamente mediante reacciones de oxidación, con las cuales se forman metabolitos con toxicidad reducida o predisponen a la molécula para una reacción de conjugación, constituyendo metabolitos que pueden reducir la fitotoxicidad o ser reducidos a uniones insolubles que son incorporados a las plantas siendo prácticamente inocuos (WHO 1976).

Los sulfóxidos originados del metabolismo de los tiocarbamatos pueden unirse covalentemente a las biomoléculas que contienen a los grupos sulfidrilos, posiblemente produciendo un agente alquilante, éste puede ser la forma activa del herbicida que daña al ADN, por otra parte quizá actúa potencialmente en las diferentes rutas metabólicas como: síntesis de proteínas, aminoácidos, respiración, fotosíntesis entre otras inhibiéndolas (Fuerts 1987).

Las rutas de biotransformación en los mamíferos son por hidrólisis, oxidación y conjugación y posteriormente son excretados vía orina y heces. La toxicidad aguda de los herbicidas es baja comparada con la de los insecticidas. Se han descrito desórdenes hematológicos como ahemoglobina y estimulación de la médula ósea, leucopenia y anemia hemolítica provocada por los últimos (EPA 1980, Kaloyanova y Batami 1991).

EPTC

Dentro de los herbicidas carbámicos el EPTC (cuyos nombres comerciales son optam o cradicane) es ampliamente usado en México, su nombre químico S-etil dipropil tiocarbamato. Su acción herbicida es a nivel de la división celular e inhibe la elongación celular en los internódulos de las hojas y de la raíz (Worthing 1991)

En estudios con células de hojas de frijol a una concentración de 10^{-4} M se suprime la síntesis de lípidos (52 %), de RNA (28 %), de proteínas (13 %), así como la fotosíntesis (21%) y respiración (14 %) en un periodo de incubación de 2 horas y los mismos procesos son alterados en 15 minutos a una concentración de 10^{-3} M (Ashton et al. 1977).

La toxicidad en los mamíferos es a través de piel, membranas mucuosas, tracto respiratorio y gastrointestinal generalmente es baja (WHO 1976), pero se reporta como ligeramente tóxico para los seres humanos (Whorthing 1991).

Kishore y Share (1988) describen que se afecta la vía enzimática de los aminoácidos en especial la de glutamina sintetasa (GS)

Con referencia a su genotoxicidad Moriya et al (1983) describen resultados negativos empleando 5 cepas de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 y TA1538 y en la cepa WP2 her de *Escherichia coli*, asimismo se han observado anomalías cromosómicas, cromosomas cortos, dobles cromosomas, puentes entre los cromosomas y micronúcleos, reducción de la división celular a medida que aumenta la concentración de éstos (WHO 1976)

Plewa et al (1984a), no observaron efecto utilizando en grado comercial y técnico al EPTC en *S. typhimurium*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zea mays* con la fracción S9 y S1, Zeiger et al. (1992) encuentran que no es mutagénico en TA97, TA98, TA100, TA1535, TA1537 con y sin activación metabólica agregando la fracción S9 de mamíferos

Sin embargo con *Vicia faba* se observa que hay un incremento de ICH a medida que aumenta la concentración hasta llegar a la muerte celular (Rosales 1997 comunicación personal).

Meligan (1991) menciona que este herbicida altera el apareamiento, copulación, fertilización y la cantidad de la progenie de *Gammarus kisoninefrensis*.

La principal vía de desintoxicación en las plantas es por conjugación con glutatión y en ciertas legumbres con homoglutatióna (análogo del glutatión) (Carringer et al. 1978). Los conjugados con glutatión son subsecuentemente metabolizados con el conjugado malonil cisteína o con el ácido malonil 3-tioláctico (Lamoureux y Rusness 1987), que no son considerados como fitotóxicos.

La conjugación se efectúa muy rápido, en las plantas ocurre en pocas horas, sugiriéndose que este herbicida puede ser activado en bajas concentraciones dentro de la planta. El EPTC es oxidado inicialmente a sulfóxido constituyendo un agente carbamilado cuando es conjugado con glutatión por medio del P-450 dependiente de la monooxigenasa de función mixta (Casida et al. 1975, Jablankai y Hatzios 1994), o por peroxidasa (Casida et al. 1974) y el sulfóxido originado puede ser una forma activa del herbicida. La conjugación del sulfóxido con el glutatión sucede vía glutatión S-transferasa quedando inactivo (Lay et al. 1975, Parker 1983, Gronwald et al. 1987).

Un ejemplo de rutas metabólicas es en el robalo rayado (*Morone saxatilis*) donde se describe la producción de sulfóxidos, hidroxilación alifática y formación de ácido mercaptúrico vía la enzima monooxigenasa, el primer metabolito es un sulfóxido eptam y una sulfina que se transforman en agentes carbamilados (Cashman y Olsen 1989), en cambio en sistemas de mamíferos el metabolito en mayor concentración es un sulfóxido-N-dipropil y sulfóxido S-metil, que puede establecer la vía glutatión- S-transferasa, estos son procesos de desintoxicación (Cashman y Olsen 1989, Quistad et al. 1994) son mediados por el sistema de monooxigenasas microsómicas.

Asulam

Este herbicida cuyo nombre químico es metil sulfaril carbamato o asulam de sodio (conocido comercialmente como asulox) es también muy utilizado en México para el control de la maleza postemergente: interfiere con la división celular y con la elongación, causando clorosis en hojas y muerte de la raíz (Worthing 1991).

En las plantas suprime la síntesis de folatos por lo que inhibe la vía metabólica sintetasa que está asociada a los procesos de la división celular, ya que esta tipo de herbicidas se une directamente a las proteínas que forman a los microtúbulos, inhibiéndose la polimerización de la tubulina (Duke 1990).

Kishore y Sha (1988) mencionan que se produce la inhibición de la vía glutamina sintetasa (GS), que participa en la ruta metabólica de los aminoácidos en donde se ha observado que la histidina es la principal afectada.

La toxicidad es baja para los seres humanos (Whorthing 1991)

En relación a sus efectos genotóxicos Shirasu et al. (1976) reportaron con el ensayo rec (sin S9 de mamífero) su acción negativa y Moriya et al. (1983) describieron resultados negativos en 5 cepas de *Xyphimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 y TA1538 así como con la cepa WP2 her de *E. coli* sin S9. Sin embargo en células micrómicas de *Vicia faba* se observa un aumento de ICH (Rosales 1997 comunicación personal).

En estudios de metabolismo en rata con el herbicida asulam (marcado radioactivamente), administrado por vía oral o intravenosa fue excretado por la orina en 24 h de la siguiente manera: como asulam de 70-65%, como N-acetilasulam de 8 a 14% y de 2.5% como N-acetil sulfanilamida además se encontraron en las heces pequeños aumentos de radioactividad (WHO 1976).

En suelos se observa que hay un aumento de actividad de sulfanilamidasa provocada por los microorganismos del suelo resultado de la transformación hidrolítica por lo que hay una rápida degradación de éstos pero los productos no son identificados (Smith y Walker 1977).

Diferentes agentes químicos empleados como testigos en las pruebas de mutagenicidad

Una gran cantidad de agentes químicos han sido incluidos como mutágenos positivos, en pruebas a corto plazo. Estos han sido seleccionados por su alta especificidad y valor predictivo en ensayos con y sin activación metabólica, además de conocer su modo de acción, rutas metabólicas y compuestos intermediarios que se pueden formar (Bartsch et al. 1980).

4-NPD (4-nitro-orto-fenilendiamina)

Históricamente las aminas aromáticas representan una categoría de contaminantes ambientales peligrosos que pueden incrementar el riesgo de cáncer en el hombre (Wynder et al. 1963, Weisburger et al. 1978, EPA 1980, Milman y Peterson 1984), que se presenta en el hígado, pulmón, colon y páncreas al ser metabolizados en mutágenos/carcinógenos por la acetil transferasa (Kadlubar et al. 1992). Son definidas por el comité de interacción de testigos del control de substancias tóxicas (IARC 1978), como testigo para la mutagénesis, teratogénesis y carcinogénesis.

Este compuesto es una anilina comúnmente usada en colorantes para la industria textil, intermediario en la producción de colorantes para cabello, goma, artículos de plástico y agente curtidor de resinas (IARC 1978). Se emplea como modelo de la transformación metabólica por la similitud estructural con los metabolitos de diferentes pesticidas (Lamoreux y Frear 1979) y por las numerosas anilinas que son base de herbicidas (Beroza et al. 1981).

El 4-NPD se utiliza como mutágeno positivo en sistemas de prueba genéticos como en el de Ames o cromosoma (Ames et al. 1975a, Benedict 1976, Perry y Searle 1977, Mayer y Goin 1980). Induce aberraciones cromosómicas y/o intercambio de cromátidas hermanas en cultivo de células de mamíferos (Perry y Searle 1977), también provoca un incremento en la reversión espontánea de *Salmonella* en presencia de S9 de tabaco y de chicharo, pero no con S9 de hígado de rata (Gentile et al. 1985).

También se ha descrito que no induce aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos, ni micronúcleos en células de médula ósea de ratones (Searle et al. 1975, Natarajan y Obe 1986, Soler-Niodziela et al. 1991).

Azida de sodio (NaN₃)

Es empleada en la agricultura como nematocida, herbicida, estimulador de la germinación, desinfectante de granos, para esterilizar suelos; también se ha manejado como preservador, agente hipertenso, inhibidor metabólico en pruebas bioquímicas y bactericida (Sander et al. 1978).

Se utiliza como mutágeno de referencia en cepas de *E. coli*, *Salmonella* y otros microorganismos de prueba (Kleinhofs et al. 1974, Kleinhofs y Smith 1976, McCann et al. 1975a, Sander et al. 1978, Bartsch et al. 1980, de Flora et al. 1984, Veleminsky y Gichner 1988, Zeiger et al. 1992, Hoffack et al. 1995). Induce mutaciones puntuales pero no incrementa la frecuencia de aberraciones cromosómicas en semillas de cebada además de reducir la actividad de la peroxidasa a pH bajos (Nilan et al. 1973, 1976) y aberraciones cromosómicas (Veleminsky et al. 1977).

2-Aminofluoreno (2-AF)

Es un compuesto aromático, caracterizado como procarcinógeno (Arnes et al. 1972, McCann et al. 1975a,b, Shutt y Thargirsson 1978, Brouns et al. 1981, de Flora et al. 1984) o como mutágeno potente en mamíferos, bacterias y plantas (Hansen et al. 1985, Gentile et al. 1986).

Sistemas de evaluación de daño genético

Varios estudios epidemiológicos han evidenciado que personas ocupacionalmente expuestas a diferentes pesticidas han desarrollado distintos tipos de cánceres particularmente leucemia, mieloma múltiple, cáncer de estómago, hígado pancreas y vejiga (IARC 1986), por lo que se ha tratado de relacionar su mutagenicidad y carcinogenicidad en diferentes sistemas de prueba (Ames et al. 1975b, McCann et al. 1975a, Gentile et al. 1986, von der Hude et al. 1988, Gentile y Plewa 1988, Plewa et al. 1993, Le Cunicux et al. 1995).

Los ensayos más empleados para detectar efecto genotóxico de gran cantidad de productos químicos, son los llamados de tiempo corto, en los cuales en general se manejan microorganismos procariotes. Estas pruebas consisten de las células bacterianas que son las indicadoras del daño genético y del sistema metabolizador, donde el compuesto evaluado se incuba con una fracción enzimática suplida exógenamente, simulando el metabolismo realizado en células de mamífero o planta.

El daño genético se expresa por un aumento en la frecuencia de células mutantes o revertantes (Ames et al. 1975b, Gentile et al. 1986, Venitt et al. 1986, Gentile y Plewa 1988, Plewa y Wagner 1993).

Estos ensayos se usan para conocer los mecanismos de carcinogénesis química, las posibles rutas metabólicas, los metabolitos formados, además de diferenciar la mutagénesis *in vitro* e *in vivo* (Bartsch et al. 1980).

Prueba de Ames

Es uno de los métodos para detectar daño genético (Hollstein et al. 1979), siendo de los más validados por diferentes estudios (Ames et al. 1975a, McCann 1975a, Bartach et al. 1980, Zeiger et al. 1992, Hoflack et al. 1995). El organismo utilizado es *Salmonella typhimurium* que es una bacteria patógena del colon en la que se ha inducido una mutación que le impide sintetizar el aminoácido histidina. A consecuencia de esta mutación no puede crecer en medio mineral a menos que se le adicione una suficiente cantidad de histidina o mediante una retromutación (reversión) recupere la capacidad de sintetizar este aminoácido (van der Hoeven et al. 1990).

Las cepas que se emplean en la prueba tienen diferentes mutaciones en el operón de la histidina, además de otras adicionales para detectar el efecto genotóxico como la *rfa* la cual causa pérdida parcial de la barrera de polisacáridos que cubre la superficie de la bacteria e incrementa la permeabilidad a moléculas grandes (Ames et al. 1973) y *uvrB* que provoca defecto en la respuesta del sistema de reparación, aumentando la sensibilidad para detectar mutágenos. También poseen el plásmido pKM 101, que lleva al factor R, y un gen de resistencia a ampicilina, genes *mutA* y *B* que aumentan la frecuencia de mutagenesis tanto espontánea como inducida vía el sistema de reparación SOS promotor de errores con lo cual se eleva su sensibilidad para determinar efecto genotóxico (Maron y Ames 1983).

La mutación *his G46* de las cepas TA100 y TA1536 se localiza en el gen que codifica para la primera enzima en la biosíntesis de histidina y es una sustitución en el triplete (prolina), en vez del triplete (leucina), que se encuentra en organismos silvestres. Debido a lo anterior la cepa reconoce mutágenos cuyo mecanismo de acción es por sustitución de pares de bases (Ames 1971, Kier et al. 1986).

La mutación *his D3052* en TA1538 y TA98 se presenta en el gen que codifica para la histidinol deshidrogenasa, esta secuencia puede ser cambiada por una variedad de mutágenos que actúan agregando o eliminando pares de bases. Tales cepas identifican mutágenos que provocan desplazamientos en el mensaje genético (Isono y Youno 1974).

De acuerdo al protocolo experimental de estas pruebas, se considera como mutagénico al agente que por lo menos incrementa al doble o más la frecuencia de mutaciones espontáneas y al mismo tiempo se observe una relación dosis-efecto además de ser reproducible en experimentos independientes (de Serres y Shelby 1979, Maron y Ames 1983).

Prueba de Metabolismo Vegetal

Una gran variedad de investigaciones se han llevado a cabo con plantas completas, extractos, cultivo de células (Sanderman 1988), incubación de cultivo de plantas y cocultivo con microorganismos para resolver problemas de mutagénesis ambiental (Plewa y Gentile 1982, Plewa et al. 1983, Gentile et al. 1985, 1986, Veleminsky y Gichner 1988, Wagner et al. 1989, 1990).

La propuesta del uso de células de *Nicotiana tabacum* (Wisconsin 38 M) línea TX1 como organismo metabolizador a través de coinubación (al cual se adaptó el sistema de *Salmonella* propuesto por Maron y Ames 1983), fue descrito por Plewa et al. (1985) y Gentile et al. (1986). La comparación de la activación de células de mamíferos con las de plantas en cocultivo con células de *Nicotiana tabacum* dieron resultados similares con lo cual se comprobaba que estos sistemas eran excelentes para los estudios de activación metabólica (Plewa et al. 1985).

La observación de este modelo y la reafirmación metodológica del ensayo de coinubación se hizo utilizando tres especies de células de plantas en cultivo, siendo éstas de zanahoria algodón y tabaco, evaluando a meta fenilén diamina (m-PDA), como agente mutagénico, con las cuales se determinaron las condiciones ideales para el ensayo, el rango de respuesta de las especies manejadas a diferentes concentraciones y el tipo de respuesta inducida por el m-PDA. Los resultados demostraron que el tiempo de crecimiento, la densidad de las células en los experimentos de coinubación y el periodo de incubación eran los propuestos por Gentile et al. (1986), notando además que las células de *Nicotina tabacum* línea TX1 eran las más sensibles para activar a la m-PDA en concentraciones bajas, aunado a que son más eficientes que los microsomas hepáticos de rata a diferencia de los sistemas celulares de zanahoria y algodón (Lhotka et al. 1987).

La técnica se emplea para verificar si un agente químico puede ser transformado a un mutágeno por medio del sistema metabólico de plantas. La coinubación de microorganismos con células de plantas desarrolladas *in vitro* es empleado para investigar la activación de promutágenos por los sistemas biológicos de las plantas favoreciendo el contacto íntimo de las células, el microorganismo y el compuesto químico (Plewa y Gentile 1982, Plewa et al. 1988).

La coinubación elimina los problemas asociados con el aislamiento de enzimas involucradas en la activación vegetal y al no requerir la aplicación de fuerza mecánica para romper las paredes celulares para tener organelos como vacuolas, microsomas o enzimas, se evita la obtención de fenoles y quinonas que reaccionen o afecten la actividad catalítica de las proteínas o puedan por sí mismos ser mutágenicos (Plewa y Wagner 1993).

Las células de *Nicotiana tabacum* contienen pocos citocromos P-450, limitados a sustratos específicos, sin embargo, las peroxidasas que se encuentran en forma abundante catalizan la oxidación de gran cantidad de sustratos. Se ha medido a lo largo de diferentes estados de crecimiento de los homogeneizados de las células TX1 encontrándose una elevada actividad de peroxidasas a medida que aumenta la curva de crecimiento. La cantidad de proteínas medida en el sobrenadante se incrementa en la fase logarítmica, seguida de un decremento durante la fase estacionaria (Plewa et al. 1991, 1993, Kwang-Young et al. 1993)

Se han propuesto modificaciones al protocolo original dando como resultado no sólo el manejo de las células en cultivos líquidos sino también de fracciones de sobrenadantes (medio MX+ en el cual crecen las células), de cuyos ultracentrifugados se han obtenido componentes celulares con pesos moleculares de 100 a 1000 K Da (Plewa et al 1991, 1993, Kwang-Young et al. 1993). Estas fracciones se trataron con diferentes mutágenos para relacionar los componentes moleculares de acuerdo a su peso y su participación en los diversos procesos de activación.

En esta investigación se utilizó sólo el medio activado el cual contiene los componentes celulares esenciales para que se efectúe el metabolismo de las plantas, evitando así el efecto directo de los herbicidas sobre las células en cultivo de *Nicotiana tabacum* (Gichner et al. 1995).

OBJETIVOS

Debido al uso indiscriminado de plaguicidas en nuestro país y dada la importancia del metabolismo vegetal y animal en la transformación de promutágenos a mutágenos, en este trabajo se pretende comparar la transformación de dos herbicidas carbámicos de amplio uso en México Asulam y EPTC.

- 1) Con y sin la mezcla S9 animal (hígado de ratas)
- 2) Con y sin la mezcla S9 vegetal (extractos de células en cultivo de *Nicotiana tabacum* línea TX1)

MATERIALES Y METODOS

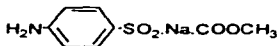
EPTC

Su fórmula molecular $C_9H_{19}NOS$, nombre químico S-etil dipropil tiocarbamato y fórmula química $(CH_3(CH_2)_2)_2NCO.SCH_2.CH_3$, Herbicida tiocarbámico sistémico preemergente usado en cultivo de alfalfa, algodón, almácigo, cártamo, frijol, maíz, mandarino, naranja, papa, toronja y chile.

Este producto es incompatible con otros herbicidas por lo que no se deben sembrar cultivos susceptibles por lo menos seis meses después del suministro, es moderadamente persistente, la dosis normal de aplicación 3-6 kg/H, ligeramente tóxico para las personas (Worthing 1991). La dosis letal media en rata es de 1630 a 2550 mg/kg, la dosis letal media dérmica en rata es de 10000 mg/kg, no hay mortalidad (Barbera 1976), la dosis letal media aguda para conejos es menor de 5000 mg/kg, para abejas de 0.011 mg/kg, en peces de 27 mg/kg (96 h) y en rata de 4.3 mg/kg (4 h) (Worthing 1991).

Asulam

Su fórmula molecular $C_7H_8N_2NaO_4S$, nombre químico metil sulfaril carbamato o asulam, de sodio, con fórmula química:



Utilizado exclusivamente para caña de azúcar, incompatible con otros herbicidas, no se pueden sembrar otros cultivos en áreas tratadas con asulam, ni emplear la caña como forraje para ganado, con persistencia de un mes o más en el ambiente, dosis normal de aplicación 2 kg/h y es ligeramente tóxico para los seres humanos.

Según Worthing (1991) la dosis letal media oral aguda es mayor de 4000 mg/kg en ratas, la dosis letal media aguda en peces es menor a 5000 mg/ml (96 h), la dosis letal media aguda dérmica en ratas es menor a 1200 mg/kg y la dosis letal aguda oral en pollos es menor a 2000 mg/kg.

PREPARACION DE LAS BACTERIAS

Se sembró una colonia de las cepas TA98 ó TA100 en un matraz de 250 ml con medio de Luria Bertani (LB) 100 ml y 2 ml de ampicilina (10 mg/ml), se colocaron en agitación constante durante la noche a 37 ° C (Maron y Ames 1983).

Se centrifugaron a 6500 rpm por 5 minutos a 0°C, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 10 ml de amortiguador de fosfatos pH 7.4 se agitaron con un vortex hasta disolver el botón, se centrifugaron nuevamente por 5 min, se decantó el sobrenadante, se añadió la cantidad suficiente de amortiguador de fosfatos hasta alcanzar una densidad de 1×10^{10} células/ml, que se verificó en un espectrofotómetro de luz ultravioleta a una longitud de onda de 660 nmi de longitud. Las bacterias se mantuvieron en hielo hasta su uso.

PREPARACION DE LAS CELULAS VEGETALES Y TRATAMIENTOS

A partir de los cultivos que se mantuvieron en medio líquido MX+, se sembraron las células de *Nicotiana tabacum* de la línea TX1 en el mismo medio manteniéndose en agitación rotatoria constante a 28 ° C durante 7 días. Posteriormente las células se filtraron y el sobrenadante (que contiene las enzimas) se mantuvo en hielo hasta su empleo.

La viabilidad de las células vegetales se confirmó con el método descrito por Widholm (1972) y para las bacterias según Plewa et al. (1988).

A una serie de frascos se le adicionaron 4.5 ml del sobrenadante que contiene las enzimas, 0.5 ml de las bacterias y 0.5 ml del herbicida a probar, se incubó por 2 h en la oscuridad a temperatura ambiente y en agitación constante, a continuación en tubos que contenían 2 ml de agar blando se les agregó 0.5 ml de esta mezcla, se agitó y se vació en cajas de Petri con agar mínimo, una vez solidificado el agar se incubaron a 37°C durante 48 h para proceder a cuantificar la cantidad de colonias revertantes.

Los testigos negativos utilizados fueron: medio MX+ (solo) y medio MX+ (activado). Los testigos positivos fueron tratados con 4-nitro-fenilén diamina (4-NPD), [100 µg/ml], para TA100 y 2-aminofluoreno (2-AF) [100 µg/m] para T 98.

PRUEBA DE DE AMES

Una colonia de cada una de las cepas con las que se trabajó (TA98 ó TA100) se sembró en un tubo de ensayo con 5 ml de medio líquido (LB) y 10 µl de ampicilina (10 µg/ml). Los tubos se colocaron en un incubador giratorio a 37° C durante 16 h y para asegurar una buena aereación se agitaron a 210 rpm. Por otra parte, en 100 ml de agar blando se diluyeron 10 ml de una solución histidina/biotina 0.5 mM. De éste se agregaron alícuotas de 2 ml a tubos de ensayo, que se acomodaron en un bloque de temperatura a 45° C para luego agregarles, 0.1 ml del cultivo bacteriano, 10 µl del herbicida a estudiar y 0.5 ml de la mezcla enzimática S9 (en experimentos con activación metabólica). El tubo se agitó y se vertió uniformemente en cajas de Petri que contenían medio mínimo, una vez solidificado el agar, las cajas de Petri se voltearon y se cubrieron para evitar los efectos de la luz sobre los agentes químicos. Las cajas se incubaron a 37° C por 2 días, después de este tiempo las colonias revertientes se cuantificaron. Se incluyó un testigo negativo (amortiguador de fosfatos) y uno positivo, estos contenían a los mutágenos específicos de cada cepa, para las pruebas sin activación metabólica se utilizó, para la TA100 la azida de sodio (Na₃N) y para la TA98 (4-NPD), cuando el ensayo se efectuó con activación metabólica (mezcla S9), se empleó 2-aminofluoreno (2-AF), para las dos cepas [20 µg/ml].

A todas las cepas se les corroboró sus respectivos marcadores genéticos

Para la mutación *rfa* se utilizó la prueba de cristal violeta en la forma siguiente: a una caja de Petri con medio Luria se le colocó con un pipeta Pasteur 0.1 ml del cultivo fresco de toda la noche la cepa TA98 o TA100 en forma lineal y paralela a ambos lados de ésta, se dejó secar, luego con otra pipeta se colocó una línea de cristal violeta y como testigo negativo agua destilada en forma perpendicular a las cepas, se dejó secar, se invirtió la caja y se incubó a 37° C. A las 24 horas aparece una zona clara de inhibición por donde pasa la línea de cristal violeta no así en la línea de agua destilada, indicando la presencia de la mutación *rfa* al permitir que las moléculas grandes como las del cristal violeta atraviesen la pared celular de las bacterias y las mate

Para el factor R de resistencia a la ampicilina en la caja de Petri se colocó con una pipeta una solución de ampicilina 8 mg/ml (aproximadamente 0.1 ml) y como testigo negativo solución de tetraciclina aproximadamente (0.1 ml) en forma paralela, luego de manera perpendicular se pusieron las cepas bacterianas en forma lineal y paralela. Después de 24 h de incubación a 37° C se observó el crecimiento de las cepas que poseen este factor, no así del lado con la tetraciclina donde se produjo muerte celular.

La mutación *uvrB* fue confirmada al agregar 0.1 ml de las cepas bacterianas, y se adicionó la cepa TA102 como testigo negativo (no porta la mutación *uvrB*), en forma lineal y paralela, se dejaron secar y después las cajas se irradiaron con una lámpara de luz ultravioleta de 15 W a una distancia de 30 cm por 30, 90 y 120 segundos, se incubaron a 37° C por 24 h, las células bacterianas no crecieron en las zonas irradiadas, no así la cepa TA102.

La reversión espontánea se confirmó en las cajas de medio mínimo, las cuales contenían trazas de histidina /biotina. Se colocó 0.1 ml del cultivo de bacterias TA98 o TA100 en un tubo que contenía 2 ml de agar de superficie fundido a 45 °C, se agitó en vórtex, se vació en la caja y se dejó secar , se incubó por 24 h a 37 °C , contándose la cantidad de revertantes obtenidos, para la cepa TA98 el número de revertantes observados fue de 30 a 50 y para la TA100 de 120 a 200 (Maron y Ames 1983)

Para determinar que concentraciones se utilizarían de los herbicidas asulam y EPTC, además de conocer el efecto tóxico y el porcentaje de supervivencia de las bacterias, mediante la cantidad de revertantes en función de la concentración, se realizaron pruebas de supervivencia.

Las bacterias (cepas TA98 y TA100) fueron ajustadas a un volumen de 1×10^8 células/mlilitro en amortiguador de fosfatos (pH 7.4) y las concentraciones de los dos herbicidas se prepararon con agua destilada

A una serie de tubos que contenían 0.1 ml de la dilución de bacterias se les adicionaron 3000, 2000, 1500, 1000, 800, 500, 450 y 0 $\mu\text{g/ml}$, de las concentraciones de los herbicidas esta mezcla se agregó a los tubos de agar de superficie, se agitaron vigorosamente y se vertieron a cajas de agar de Luria (por triplicado), se incubaron por 24 h y se determinó el número de colonias. Los testigos positivos utilizados fueron 2-AF para TA98 y 4-NPD para TA100.

Con los datos obtenidos se elaboraron las curvas de supervivencia evidenciándose que las concentraciones utilizadas fueron muy tóxicas por lo cual la supervivencia mostró bajo porcentaje.

De acuerdo con los datos obtenidos de los experimentos de supervivencia se eligieron las nuevas concentraciones que permitirían obtener una respuesta en el número de máxima reversión con un mínimo de inhibición del crecimiento (Tabla 1, Figs. 1, 2, 3 y 4)

Para la prueba de Ames con y sin activación metabólica de mamífero solo se utilizó el asulam ya que previamente se ha descrito efecto mutagénico negativo del eradicane o EPTC (Moriya et al. 1983, Plewa et al. 1984a, Zeiger et al. 1992).

Las concentraciones utilizadas se asulam para los ensayos de Ames para la fracción S9 de mamífero fueron. (0, 10, 20, 30, 60, 150, 300 $\mu\text{g/ml}$), para los de activación vegetal (0, 1.5, 2.5, 5, 10, 20, 30, 60, 150, 300 $\mu\text{g/ml}$), para el EPTC con activación vegetal (0, 1.5, 3, 6, 12, 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$).

Se realizaron tres experimentos con tres repeticiones por concentración.

Los criterios para considerar efecto positivos son:

- 1) Un incremento al doble o más de la cantidad de revertantes
- 2) Un aumento de la reversión en función de la concentración
- 3) Reproducibilidad de los datos de por lo menos en tres repeticiones

REACTIVOS

Nicotin adenin dinucleótido fosfato (NADP), Glucosa-6-fosfato, D-biotina, L-histidina, 4-nitro-o-fenilendiamina (4NPD), 2 aminofluoreno (2-AF), azida de sodio (NaN_3), NaCl, fosfato monobásico de potasio ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y fosfato dibásico de potasio ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), nitrato de amonio, nitrato de potasio, cloruro de calcio dihidratado, sulfato de magnesio $7\text{H}_2\text{O}$, fosfato de manganeso H_2O , sulfato de zinc $\cdot \text{H}_2\text{O}$, molibdato de sodio, $2\text{H}_2\text{O}$, yoduro de potasio, sulfato cuprico, cloruro de cobalto $6\text{H}_2\text{O}$, ácido bórico, sulfato de zinc $7 \text{H}_2\text{O}$, glicina, tiamina hidroclicónica, ácido nicotínico, piridoxina hidroclicónica, mioinositol EDTA, sulfato férrico fueron de Sigma Chemicals Co.

Agar bacteriológico, glucosa, peptona de caseína y extracto de levadura fueron de Bioxon.

Extracto hepático liofilizado de rata (S9) fue de Mol Tox Co

El herbicida EPTC donado por Química Lucaba con 82.2 % de ingrediente activo, y el asulam se adquirió de Rhone Poulenc, cuyo grado de pureza fue indicado como 32.2 %.

Análisis estadístico.

Se realizó mediante la prueba de SALANAL diseñado para experimentos de mutagénesis en microorganismos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Al estudiar los herbicidas asulam y EPTC en *Salmonella typhimurium* los resultados obtenidos con la prueba de supervivencia en el intervalo de 3000 a 450 $\mu\text{g/ml}$, mostraron un decremento a medida que se aumentó la concentración de los herbicidas para ambas cepas (TA98 y TA100) por el efecto tóxico (Tabla 1, Figs 1, 2, 3 y 4).

Las concentraciones usadas en este trabajo para las pruebas de mutación revertante fueron elegidas con base en los resultados obtenidos de las curvas de supervivencia donde se observa que entre 0 y 450 $\mu\text{g/ml}$ con ambos herbicidas en las dos cepas esta no baja de manera significativa (Tabla 1, Figs 1, 2, 3 y 4), dicha disminución de acuerdo con el criterio de Maron y Ames (1983), aun no es relevante para que se afecte la expresión del efecto mutagénico, por ello es importante hacer notar que con ninguno de los dos herbicidas, con y sin activación metabólica animal o vegetal se observó efecto mutagénico en las cepas TA98 y TA100 y además en todos los casos se notó decremento de la frecuencia de colonias revertantes a medida que aumentó la concentración.

Prueba con y sin fracción S9 animal.

Al estudiar los efectos del asulam con y sin la mezcla S9 proveniente de mamífero, con ninguna de las concentraciones estudiadas (10, 20, 30, 60, 150, y 300 $\mu\text{g/ml}$) se encontró un aumento del doble de las colonias revertantes con respecto a las espontáneas, por lo que no se observó efecto mutagénico en ninguna de las dos cepas (Tabla 2, Figs 5 y 6).

Es importante resaltar el hecho de que al adicionar el sistema metabólico, los metabolitos intermedios o secundarios (asulam, N-acetilasulam o N-acetil sulfanil amidas), o tal vez el sulfóxido formado al conjugarse con la glutatona (Casida et al 1974, 1975, Lay et al 1975, WHO 1976, Fuerst 1978), no tuvieron efecto, por lo que presumiblemente la disminución de la frecuencia basal de las bacterias obtenida probablemente sea por la acción directa del herbicida.

En este sentido como se ha descrito para otros herbicidas, se puede producir la inhibición de la vía glutamina sintetasa (GS), que participa principalmente en la ruta metabólica de la biosíntesis de aminoácidos, lo que puede provocar en las bacterias el paro de la síntesis de histidina, causando con ello la muerte celular (Kishore y Sita 1988), que aumenta a medida que se incrementa la concentración del herbicida.

Los resultados negativos de este trabajo coinciden con los de Shirasu et al. (1976) en ensayos Rec de *E. coli*, sin activación y Moriya et al. (1983) en *E. coli*, con y sin la fracción S9 de mamífero.

Las pruebas con EPTC y esta fracción animal no se realizaron ya que previamente se había descrito el efecto negativo de éste (Moriya et al. 1983, Plewa et al. 1984a, Zeiger et al. 1992).

Prueba con y sin S9 vegetal

De las observaciones realizadas con los herbicidas asulam y EPTC se concluye que estos no produjeron efecto mutagénico en las cepas TA98 y TA100 con y sin activación metabólica vegetal (Tablas 3 y 4, Figs. 7, 8, 9 y 10)

La reducción de la frecuencia basal de revertantes de las dos cepas tanto con el asulam como con el EPTC en presencia y en ausencia del metabolismo vegetal posiblemente se debe, como se menciona en el caso anterior, a que el metabolismo de estos compuestos se efectúa por una amplia variedad de rutas metabólicas, en general la formación de sulfóxidos por las peroxidases vía glutatión S-transferasa es una de las principales rutas metabólicas, el sulfóxido formado se une covalentemente a las moléculas que contienen grupos sulfhidrilo originando conjugados que al combinarse con la glutatión se convierten en un producto no tóxico, (Casida et al. 1974, 1975, Lay et al. 1975, Parker 1983, Fuerst 1987, Joblankai y Hatzios 1994, Quistad et al. 1994), pero en este caso tal vez, además estén implicadas otras vías metabólicas de *Nicotiana tabacum* que pueden actuar a otros niveles

Sin embargo el metabolismo vegetal no influye en la expresión de las colonias revertantes ya que de la misma forma que para los de la fracción S9 de mamíferos, hay disminución de la cantidad de revertantes para los ensayos directos posiblemente debido, como se mencionó antes, a bloqueos enzimáticos provocados por estos herbicidas sobre la biosíntesis de histidina como ha sido sugerido por Kishore y Sha (1988)

Mientras que en *Vicia faba* ambos herbicidas incrementan la frecuencia de ICH en células meristemáticas de raíces tratadas siendo más eficiente el EPTC, aunque tuvo mayor toxicidad (Rosales comunicación personal) El hecho de que de manera directa y a través del metabolismo animal agregando la fracción S9 en microorganismos con ambos herbicidas la respuesta es negativa (Moriya et al. 1983, Zeiger et al. 1992 y este trabajo) así como también al emplear la fracción microsómica S9 de *Nicotiana tabacum* en el ensayo de activación vegetal y en vista de que como se menciona anteriormente, en *Vicia faba* los resultados son positivos, es importante considerar que posiblemente estén implicadas diferencias en el metabolismo ya que *Vicia* posee la fracción microsómica S10, por lo cual tal vez se forman otros productos diferentes a partir del Asulam y EPTC que actúan provocando el ICH

Por otro lado los resultados negativos obtenidos en este estudio son similares a los reportados por Moriya et al. (1983), Plewa et al. (1984a) y Zeiger et al. (1992), realizadas en *Saccharomyces cerevisiae*, *Zea mays* y *Escherichia coli* Por ello se puede inferir que éstos no causan efecto mutagénico, además de tener posiblemente diferente ruta metabólica pudiendo no formar metabolitos tóxicos que afecten genotóxicamente a *Salmonella typhimurium*, pero si tienen un efecto directo que reduce la frecuencia basal de revertante para las dos cepas.

Un aspecto importante es el hecho que los resultados positivos obtenidos con diferentes herbicidas carbámicos han sido a nivel citogenético (aberraciones, ICH entre otros) (WHO 1976, Fuerst 1987, Gómez-Arroyo et al 1992, Calderón-Segura 1997 comunicación personal, Rosales 1997 comunicación personal), mientras que los resultados positivos encontrados en *Salmonella* corresponden en su mayoría a estudios hechos con la cepa TA100 con la fracción S9 de mamíferos, pero solamente con herbicidas que presentan en su estructura química el grupo dimetil, que como menciona Moriya et al. (1983), este grupo puede ser esencial para que se efectúe daño mutagénico.

Debido a las evidencias mostradas por diferentes investigadores y a los encontrados en este trabajo se sugiere utilizar sistemas de prueba en los cuales se detecten los efectos a nivel cromosómico, además de los ensayos con microorganismos.

Por otro lado, los testigos positivos utilizados para TA98 (2-AF) y TA100 (4-NPD), produjeron un aumento de células revertantes muy notable en *Salmonella typhimurium* tal como se esperaba. Esta observación confirma que el protocolo fue realizado adecuadamente al obtener la cantidad de células revertantes tanto en los ensayos con y sin activación metabólica previamente reportados por varios autores (Ames et al. 1972, 1975b, McCann et al. 1975 a, b, de Flora et al. 1984, Gentile et al. 1985, 1986, 1987, Hansen et al. 1985 y Plewa et al. 1993).

Las frecuencias obtenidas en los testigos negativos son similares a las descritas por Maron y Ames (1983) de 30 a 50 revertantes por caja para TA98 y de 120 a 200 revertantes por caja para TA100.

Cabe mencionar que en los últimos diez años el uso anual mundial de los pesticidas carbámicos excede a las 20 000 toneladas, además de que el riesgo de enfermar de cáncer en la población se ha incrementado de 0.02 por millón de habitantes a 2000, también han aumentado las alteraciones neurológicas, inmunológicas y reproductivas detectadas en la población mundial (Lang 1993, Woodruff et al 1994). Su empleo indiscriminado ha provocado que se alcancen niveles tóxicos que hacen peligrar a las especies y el equilibrio ecológico. Por lo que los estudios acerca de sus efectos mutagénicos dados por la bioactivación y almacenamiento deben ser investigados de forma sistemática lo que permitiría sugerir las medidas de regulación en relación a su uso y control, para poder así disminuir el posible riesgo genético que implique.

REFERENCIAS

- Aldrige W. N y Reiner E. 1982. **Enzyme inhibitors as substrates interaction of esterases with esters of organophosphorous and carbamic acids** Elsevier, Amsterdam, pp.328 .
- Ames S., Hammouda M. y Farah O. 1971. Cytological and morphological effects of the insecticide N-methyl-1-naphtyl carbamate "Sevin ". *Flora (Jena) Abt.B* **160:433-439**.
- Ames B. N. 1971. The detection of chemicals mutagens with enteric bacteria En: Hollander A (Ed). **Chemical Mutagen. Principles and Methods for their Detection** . Plenum, Nueva York. vol. 1, p. 267-282 .
- Ames B. N., Gurney E. G, James A y Bartsch H. 1972. Carcinogens as frameshift mutagens: metabolites and derivatives 2- acetylaminofluorene and others aromatic amine carcinogens *Proc Natl Acad Sci (USA)* **69** 3128-3132.
- Ames B. N., Lee F. D. y Durston W. E. 1973. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* **70**: 782-786
- Ames B. N., Kammen H. O. y Yamasaky E. 1975a. Hair dyes are mutagenic: identification of a variety of mutagenic ingredients. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **72:2423-2427**.
- Ames B. N., McCann J. y Yamasaki E. 1975b. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* **31:347-364**
- Ashton F. M., de Villers O. T., Glenn R. K. y Duke W. B. 1977. Localization of metabolic sites of action of herbicides. *Pestic. Biochem. Physiol.* **7:122-141**.
- Ashwood-Smith. M., Treviño J. y Ring R. 1972. Mutagenicity of dichlorvos. *Nature* **240:418-420**.
- Barberá C. 1976. **Pesticidas Agrícolas**. Ed. Omega, pp. 382-400.

Bartsch H., Malaveille C., Camus A. M. y Martel-Planche O. 1980. Validation and comparative studies on 180 chemicals with *Salmonella typhimurium* strain and V79 Chinese hamster cell in the presence of various metabolising systems *Mutat. Res.* 76:1-50

Benedict W F 1976 Morphological transformation and chromosome aberrations produced by two hair components *Nature* 260:368-369.

Beroza M, Caswell R. L. y Watts R R. 1981. Analytical Reference Standards and Supplemental Data for Pesticides and Other Organic Compounds HERL, URD USEPA, Research Triangle Park NC (EPA-666-12-81-0011)

Brouns R M E, Van Doorn R., Boss R P, Mulleners L J, y Henderson P Fh. 1981. Metabolic activation of 2-aminofluorene by isolated rat liver cells through different pathways leading to hepato cellular DNA-repair and bacterial mutagenesis *Toxicology* 19: 67-75

Brusick D., Simmon V., Rosenkrasz H., Ray V y Stafford R. 1980 An evaluation of the *Escherichia coli* WP2 y WP2 uvr : A reverse mutation assay. *Mutat Res.* 76:169-190.

Cashman J R y Olsen L. D. 1989. S-oxigenation of eptam in hepatic microsomes from fresh-and salwater striped bass *Morone saxatilis* *Chem Res Toxicol* 2: 393-399

Carringer R. D., Rick C E y Bush L. P. 1978. Metabolism of EPTC in corn (*Zea mays*) *Weed Sci.* 26:157-171.

Casida E. J., Gray R. A. y Tiles H. 1974. Thiocarbamate sulfoxides: potent, selective and biodegradable herbicides. *Science* 184: 573-574.

Casida E. J., Kimmel E. C., Ohkawa O.H. y Ohkawa R. 1975. Sulfoxidation of thiocarbamate herbicides and metabolism of thiocarbamate sulfoxides in living mice and liver enzymes systems. *Pestic. Biochem Physiol.* 5: 1-11.

Constantin M. J., de Serres F. J., Nilan S. y Shelby M. D. 1981. Proceedings of the conference on pollen systems to detect biological activity of environmental pollution. *Environ. Health Perspect.* 31:1-70.

de Flora S., Zaccacchi P., Camoirano A., Benicelli C. y Badolati S. G. 1984. Genotoxic activity and potency of 135 compounds in the Ames reversion test and in bacterial DNA repair test. *Mutat. Res.* 133: 161-198.

de Serres F. J. y Shelby M.D. 1978. Higher plant system as monitors of environmental mutagens. *Environ. Health Perspect* **27**: 1-208.

de Serres F. J. y Shelby M. D. 1979. The Salmonella mutagenicity assay: recommendations. *Science* **203**: 563-565.

Duke O. S. 1990. Overview of herbicide mechanisms of action. *Environ. Health Perspect* **87**:263-271.

Eder E., Scheckenbach S., Deininger C. y Hoffman C. 1993. The possible role of α , β -unsaturated carbonyl compound in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* **136**:233-245

Ehrenberg L. 1971. Higher plant. En Hollander A (Ed.), **Chemical Mutagens Principles and Methods for their Detection** Vol 1 Plenum, Nueva York, pp 365-386.

EPA (Environmental Protection Agency) 1980. Sixth report of the Interagency Testing Committee to the Administrator Receipt of the Report and Request for Comments Regarding Priority List of Chemicals. *Federal Register* **45** (104) pp 35897-35910

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization) 1984. Pesticide residues in food, FAO plant production and protection paper 36 (Report of the 1983 joint meeting of FAO panel of experts on pesticide residues in food and the environmental and the WHO expert group on pesticides residues) Roma

Fuerst E. P. 1987. Understanding the mode of action of the chloroacetamides and thiocarbamate herbicides. *Weed Technol.* **1**:270-277

Fukuto T. R. 1972. Metabolism of carbamate insecticides. *Drug. Metab. Rev.* **1**:117-150.

Fukuto R. T. 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ. Health Perspect* **87**:245-254.

Gentile J.M., Gentile J.G., Dunlap J., Sechrist R., Wagner E.D. y Plewa M.J. 1982. An evaluation of the genotoxic properties of insecticides following plant and animal activation. *Mutat. Res.* **101**:19-29.

Gentile J. M., Gentile G. J., Townsend S. y Plewa M. J. 1985. *In vitro* enhancement of the mutagenicity of 4-nitro-o-phenylenediamine by plant S9. *Environ. Mutagen.* **7**:73-85.

Gentile J. M., Gentile G. J. y Plewa M. J. 1986. **In vitro** activation of chemicals by plants: a comparison of the techniques. *Mutat. Res.* **164**:52-58.

Gentile, J. M. y Plewa M. J. 1988. The use of cell-free systems in plant activation studies. *Mutat. Res.* **197**:173-182.

Gichner T., Staureva D. A., Cerovská N., Wagner E. D. y Plewa M. J. 1995. Metabolic activation of m-phenylenediamine to products mutagenic in *Salmonella typhimurium* by medium isolated from tobacco suspension cell cultures. *Mutat. Res.* **331**:127-132.

Gómez-Arroyo S., Rodríguez-Madrid P y Villalobos-Pietrini R. 1992. Chromosomal alterations induced by the thiocarbamate herbicide molinate (ordram) in *Vicia faba*. *Contam. Ambient* **8**:77-80

Gonzalez F. J., Cresp Ch L y Gelbion H V. 1991. cDNA-expressed human cytochrome P450s: new age of molecular toxicology and human risk assessment. *Mutat. Res.* **257**:113-127

Grant W. F., Zinov'eva-Starevitch E. A. y Zura K. 1981. Plant genetic test system for the detection of chemical mutagens. En Stich H T y San R.H.C. (Eds.). **Short term Tests for Chemical Carcinogens**. Springer Verlag, Nueva York, pp 200-201

Grant W. F. 1994. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutat. Res.* **310**:175-185

Gronwald J. E., Fuerst E. P., Eberlein C. U y Egli M. A. 1987. Effects of herbicide antidotes on glutathione content and glutathione S-transferase activity of Sorghum shoots. *Pestic. Biochem. Physiol.* **29**:66-76

Hansen C. L., Plewa M. J., Blair L. C y Gentile J. M. 1985. Activation of 2-aminofluorene by cultured plant cells using the forward mutation assay of *Salmonella typhimurium* SV 50. *Environ. Mutagen.* **7** Suppl 3:320-331.

Higashi K. 1988. Metabolic activation of environmental chemicals by microsomal enzymes of higher plants. *Mutat. Res.* **197**:273-288.

Hoflack J. C., Lanbolez L., Elias Z y Vasseur P. 1995. Mutagenicity of ethyleneglicol ethers and of their metabolites in *S. typhimurium* his-. *Mutat. Res.* **341**:281-287.

Hollstein M. J., Angelosanto R., Muir F y Nichols W 1979. Short-term test for carcinogens and mutagens. *Mutat. Res.* **65**:133-229.

IARC (International Agency for Research of Cancer) 1978. **Monographs of the evaluation of carcinogens risk of chemicals to man** Vol 16 **Some aromatic amines and related nitro compounds, hair-dyes, colouring agents and miscellaneous industrial chemicals** Lyon, Francia pp 111-120

IPCS (International Programme and Chemical Safety) 1986. **Environmental Health Criteria for Carbamate Pesticides A General Introduction** (Eds) WHO Finlandia, pp. 1-136

Ishidate M y Odashima S. 1977. Chromosome test with 134 compounds in Chinese hamster cells *in vitro*. A screening for chemical carcinogens. *Mutat. Res.* **48**:337-354

Isono K y Youno J 1974. Chemicals carcinogens as frameshift mutagens *Salmonella* DNA sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **71**:1612-1617

Jablankai I y Hatzios K. 1994. Microsomal oxidation of the herbicides EPTC and acetachlor and of the safener MG-191. *Maize Pest. Biochem. Physiol.* **48**:98-109

Kaldubar F.F., Buler M. A., Kadrhik R. K., Chou H. C. y Long V. P 1992. Polymorphisms for aromatic amine metabolism in humans. Relevance for human carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* **78**:69-74

Kaloyanova F. y Fournier E. 1971. **Les Pesticides de l'homme**. Coll de méd legale et toxicol medicale. Masson & Cie. Paris pp. 166

Kaloyanova F. y Batami M. A. 1991. **Carbamates in human. Toxicology of pesticides**. CRS Press. Boca Raton, S pp 166

Kier L.E., Brusick D. J., Auletta A. E., Simmon V. F y MCCann J. 1986. **The Salmonella typhimurium/mammalian microsomal assay. A report the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program**. *Mutat. Res.* **168**:69-240.

Kishore, G. M. y Shah D. P. 1988 Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Ann. Rev. Biochem* **57**: 627-663.

Kleinhofs A., Sander C., Nilan A. y Konzak C. F. 1974. Azide mutagenicity. Mechanism and nature of mutants. En **Polyploidy and Induced Mutation in Plant Breeding** I. A. E. A. Viena, pp 195-199.

Kleinhofs A. y Smith J. A. 1976. Effect of excision repair on azide-induced mutagenesis *Mutat Res* **4**:237-240.

Kuhr J. y Doroug H. M. 1976. Carbamate insecticides chemistry, biochemistry and toxicology. CPC. Press, Nueva York, pp. 1-250

Kulkarni A. P y Hodgson E. 1984. The metabolism of insecticides: the role of monooxygenase enzymes. *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol* **24** 19-42

Kwang-Young S., Riley, J., Cortez, D., Wagner D. E. y Plewa M.J.1993. Characterization of stable high molecular weight mutagenic product (s) of plant-activated m-phenylenediamine *Mutat Res* **299** 111-120

Lamoureux G. L. y Frear D. S. 1979. Pesticide metabolism in higher plant: in vitro enzymes studies. En **Xenobiotic metabolism: in vitro methods** American Chemical Society, Washington D. C, pp 77-128

Lamoureux G. L. y Rusness D. G. 1981. Catabolism of glutathione conjugates of pesticides in higher plants. En Rosen J. D. Magee P.S. y Casida J. E. (Eds.) **Sulfur Chemistry and Biochemistry in Relation to Pesticide Metabolism and Action**. American Chemical Soc. Washington D. C. Vol. 158, pp. 153-164

Lamoureux G. L. y Rusness D. G. 1987. EPTC metabolism in corn, cotton and soybean: identification of a novel metabolite derived from the metabolism of glutathione conjugate. *J. Agric. Food Chem.* **35**. 1-7.

Lang L. 1993. Are pesticides a problem? *Environ. Health Perspect.* **101**: 578-583.

Lay M. M., Hubell J. P. y Casida E. J. 1975. Dichloroacetamide antidotes for thiocarbamate herbicides: mode of action. *Science* **189**: 287-288

Le Curieux, G., Gauthier L., Erb F. y Marzin D. 1995. Use of the SOS chromotest, the Ames fluctuation test and the new micronucleus test to study the genotoxicity of four trihalomethanes. *Mutagenesis* **16**:3-341.

- Lhotka M. A., Plewa M. J. y Gentile J. M. 1987. Plant activation of m-phenylenediamine by tobacco, cotton and carrot cell suspension cultures. *Environ. Mol. Mutagen.* **10** : 79-88
- Litterst Ch. L. y Lichtenstein E. P. 1971. Effects and interactions of environmental chemicals on human cell in tissue culture. *Arch. Environ. Health* **22**:454-459.
- Machemer H. y Pickel M. 1994. Carbamate herbicides and fungicides. *Toxicology* **91**:105-109.
- Maron D. y Ames B. N. 1983 Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**:173-215.
- Mayer V. W. y Going C. J. 1980. Induction of mitotic recombination by certain hair-dye chemicals in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* **167**:243-252.
- McCann J., Choi E., Yamasaki E. y Ames B. N. 1975a. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **72** 5135-5139.
- McCann J., Spingarn E.S., Kabory K. y Ames B. N. 1975b. Detection of carcinogens as mutagens bacterial tester strain with R-factor plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **72** 971-983.
- Meligan R. I. 1991. Effects of the Eptam. *Hidrobiol. J.* **27**:33-36.
- Milman H. A. y Peterson C. 1984. Apparent correlation between structure and carcinogenicity of phenylenediamines and related compounds. *Environ. Health Perspect.* **56**:261-273.
- Moutschen-Dahmen J., Moutschen-Dahmen H., Degraeve N., Houbrechts N. y Colizzi A. 1976. Cytotoxicity of carbaryl alone and combined with nitrites. *Mutat. Res.* **38**:122-123.
- Moutschen-Dahmen J., Moutschen-Dahmen H., Gilot-Delhalle J., Colizzi A. y Degraeve N. 1979. Comparison of the efficiency of different tests to evaluate mutagenicity of organophosphates. *Mutat. Res.* **64**:114 (Abst).
- Moutschen-Dahmen J., Moutschen-Dahmen M. y Degraeve N. 1984. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of pesticides. En. Kirsch-Volders M. (Ed.) *Mutagenicity, Carcinogenicity and Teratogenicity of Industrial Pollutants*. Plenum Press, Nueva York, pp. 127-203.

Moriya M., Otha T., Watanabe K., Miyazawa T., Kato K. y Shirasu Y. 1983. Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay system. *Mutat. Res.* **116**:185-216.

Natarajan A. T y Obe G. 1986 How do *in vivo* mammalian assays compare to *in vitro* assays in their ability to detect mutagens *Mutat. Res.* **167** 189-201.

Nilan R. A., Sideris E. G., Kleinhofs A., Sander C. y Konzak C. 1973 Azide a potent mutagen. *Mutat. Res.* **17** 153-155.

Nilan R. A., Kleinhofs A y Sander C 1976. Azide mutagenesis in barley. En: Gaul H (Ed.) *Barley Genetics* III, thieming Munich, pp 122-133

Oonnithan E. S y Casida J. E. 1986 Oxidation of methyl and dimethylcarbamate insecticide chemicals by microsomal enzymes and anticholinesterase activity of the metabolites *J. Agric. Food Chem* **16** 28-44

Parker C. 1983 Herbicide Antidote- A Review *Pestic. Sci.* **14** 40-48.

Perry P. y Searle C 1977 Induction os sister-chromatidid exchange in Chinese hamster cells by the hair dye constituents 2-nitro-p-phenylenediamine and 4-nitro-o-phenylenediamine *Mutat. Res.* **56** 207-210

Plewa M. J. y Gentile J. M. 1976 Mutagenicity of atrazine a maize microbe bioassay. *Mutat. Res.* **38** 287-292

Plewa M. J. y Gentile J. M. 1982. The activation of chemicals into mutagens by green plants En: de Serres F. J y Hollander A. (Eds.) **Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection.** Plenum Press, Nueva York. Vol 7, pp. 401-420

Plewa M. J., Weaver D. I., Blair L. C y Gentile J.M. 1983. The activation of 2-aminofluorene by cultured plant cells *Science* **219**.1427-1429.

Plewa M. J., Wagner E. D., Gentile G. J y Gentile J. M. 1984a. An evaluation of the genotoxic properties of herbicides following plant and animal activation. *Mutat. Res.* **136**:233-245

Plewa M. J., Dowd P. A. y Wagner E. D. 1984b. Calibration of the maize y g2 assay using gamma radiation and ethyl methane-sulfonate. *Environ. Mutagen.* **6**:781-795.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Plewa M J., Blair L. C. y Gentile J. M. 1985. A preincubation procedure for the plant cell/microbe coinoculation assay for the detection of plant activated promutagens. *Environ. Mutagen.* 7: 40 (Abst).

Plewa M J., Wagner E. D. y Gentile J. M. 1988. The plant cell /microbe coinoculation assay for the analysis of plant-activated promutagens. *Mutat. Res.* 197:207-219.

Plewa M.J., Shannon R., y Wagner D.E. 1991. Diethylthiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibit tobacco cell peroxidase. *Mutat. Res.* 247:57-64.

Plewa M.J. y Wagner E.D. 1993. Activation of promutagens by green plants. *Ann. Rev. Genet.* 2:93-113.

Plewa M. J., Gichner T., Xin H. y Kwang-Young S. 1993. Biochemical and mutagenic characterization of plant-activated aromatic amines. *Environ. Toxicol Chem.* 121: 353-363.

Quistad G. B., Sparks S. E. y Casida E. J. 1994. Aldehyde dehydrogenase of mice inhibited by thiocarbamate herbicides. *Life Sci.* 55:1537-1544

Reddy P., Reddy G. y Subramanya S. 1974. Cytological effect of the insecticide "sevine" on the meiotic cell of *Poecilocerus pictus*. *Curr. Sci.* 43:187-189.

Reiner E. y Skrinjari Spoljar M. 1968. Hidrolysis of some monomethyl carbamates in human sera. *Croat. Chem. Acta.* 2:48-87.

Sakai K. y Matsumura F. 1971. Degradation of certain organophosphorous and carbamate insecticides by human brain esterases. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2:19-160.

Sander C., Nilan R. A., Kleinhofs A. y Vig B. A. 1978. Mutagenic and chromosome breaking effects of azide in barley and human leukocytes. *Mutat. Res.* 30:67-75.

Sanderman H. Jr. 1982. Metabolism of environmental chemicals: a comparison of plant and liver enzyme systems. En: Klekowsky E. J. Jr. (Eds). **Environmental Mutagenesis, Carcinogenesis and Plant Biology** PRAEGER, Nueva York. Vol 1, pp. 3-32.

Sanderman H. Jr. 1988. Mutagenic activation of xenobiotics by plant enzymes. *Mutat. Res.* 197:183-194.

- Schlagbauer B. G. y Schlagbauer A. W. 1972. The metabolism of carbamate pesticides. A literature analysis. Part I. En. **Residue Review**. Vol 42, WHO. (Eds.). Alemania, pp. 1-73.
- Sarle C. E., Harned D. G., Venitt S. y Gyde O.H. 1975. Carcinogenicity and mutagenicity test of some hair colourants and constituents. **Nature** **225**: 506-507.
- Seiler J. 1977. Nitrosation *in vitro* and *in vivo* by sodium nitrite, and mutagenicity of nitrogenous pesticides. **Mutat Res** **48**: 225-236.
- Shimabukuro R. H., Lamoureux G. L. y Frear D. S. 1978. Glutathione conjugation: a mechanism for herbicide detoxication and selectivity in plant. En: Pailos F. M. y Casida J. E. (Eds.) **Chemistry and Action of Herbicide Antidotes**. Academic Press, Nueva York. pp. 133-149.
- Shimabukuro R. H., Lamoureux G. L. y Frear D. S. 1982. Pesticide metabolism in plant reactions and mechanisms. En: Matsumuta F. y Krishna Murti C. R. (Eds.) **Biodegradation of Pesticides**. Plenum Press, Nueva York, pp. 21-66.
- Shimabukuro R. H. 1985. Detoxication of herbicide. En: Duke S. O. (Ed.) **Weed Physiology**. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 215.
- Shirasu Y., Moriya M., Kato K. y Koda T. 1976. Mutagenicity screening of pesticides in the microbial system. **Mutat Res** **40**: 19-30.
- Shutt H. A. y Thargeirsson S. S. 1978. *In vitro* metabolism and mutagenic activation of 2-acetylaminofluorene by subcellular liver fractions from cotton rats. **Cancer Res** **38**: 2501-2507.
- Siebert D. y Lemperle E. 1974. Genetic effects of herbicides: induction of mitotic gene conversion in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutat. Res.** **22**: 111-120.
- Sigimura T. 1982. A review of cancer research environmental mutagen. En: Sigimura T., Kondo S. y Takabe H. (Eds.) **Environmental Mutagens and Carcinogens**. University of Tokyo Press Tokio, Alan R. Liss, Nueva York, pp. 1-20.
- Smith A. E. y Walker A. 1977. A quantitative study of asulam persistence in soils. **Pestic. Sci.** **8**: 449-450.
- Soler-Niedziela L., Shi X., Nath J. y Ong T. 1991. Studies on three structurally related phenylenediamines with the mouse micronucleus assay system. **Mutat. Res.** **259**: 43-48.

Sullivan N., Gatehouse D y Tweats D. 1993. Mutation, cancer and transgenic models, relevance to the toxicology industry. *Mutagenesis* **8**:167-174.

Swenberg J. A. 1989. The role of DNA damage, repair and replication in hepatocarcinogenesis. En : Banrasch P. Keppler D y Weber G. (Eds.). *Liver Cell Carcinoma*. Kluwer Academic Pub. Lancaster, pp 261-293.

Takehisa S. y Kanaya N. 1982. SCE induction in human lymphocytes by combined with aniline and norharman. *Mutat. Res.* **101**:165-172.

Valencia-Quintana R., Gómez-Arroyo S y Villalobos-Pietrini R. 1993. Cytological effects of some carbamate insecticides 1 methomyl and oxamyl in *Vicia faba*. *Contam. Ambient.* **9**:65-69.

van der Hoeven N., Kooijman S. A. y de Raat W. K. 1990. *Salmonella* test: relation between mutagenicity and number of revertant colonies. *Mutat. Res.* **234**:289-310.

Veleminsky J., Gichner T. y Pokorni V. 1977. Induction of DNA single-strand breaks in barley by sodium azide applied at pH3. *Mutat. Res.* **42**:65-79.

Veleminsky J. y Gichner T. 1982. The mutagenic activity of nitrosamines in *Arabidopsis thaliana*. *Mutat. Res.* **5**:479-431.

Veleminsky J. y Gichner T. 1988. Mutagenic activity of promutagen in plants: indirect evidence of their activation. *Mutat. Res.* **197**:221-242.

Venitt S., Bartsch H., Becking G., Fuchs R. P.P., Hofnung M., Malaveille C., Matsushima T., Rajewsky M. R., Roberfroid M y Rosenkranz H. S. 1986. Short-term assay using bacterial in "long-term and short-term assays for carcinogens: a critical appraisal". IARC Scientific Publications. Lyon. **83**:143-161.

von der Hude W., Behm C. C., Gurtler R. y Baster A. 1988. Evaluation of the SOS chromotest. *Mutat. Res.* **203**:81-94.

Wagner E. D., Gentile J. M. y Plewa M. J. 1989. Effects of especific monooxygenase and oxidase inhibitors on the activation of 2-aminofluorene by plant cell. *Mutat. Res.* **216**:163-178.

Wagner D. E., Verdier M. M. y Plewa M. J. 1990. The biochemical mechanism of the plant activation of promutagenic, aromatic amines. *Environ. Mol. Mutagen.* **15**: 236-224.

Wain R. L. y Smith M. S. 1976. Selectivity in relation to metabolism in herbicides. En: Audus L.J. (Ed.) **Physiology, Biochemistry, Ecology**. Vol 2. Academic Press Nueva York, pp 279.

Weisburger E. K., Russfield A. B., Homberger F., Weisburger J. H., Burger E., van Dangen C. G. y Chu K. C. 1978. Testing of twenty-one environmental aromatic amines or derivatives for long-term toxicity of carcinogenicity. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 2:325-356.

WHO (World Health Organization). 1976. Technical Report Series No. 356. Safe use of pesticides in public health) W H O Finlandia (Eds.) p p.1-40.

Widholm M. J. 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosafranin for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol.* 47:184-194.

Woo Y. 1983. Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of carbamates, thiocarbamates and related compounds an overview of structure-activity relationships and environmental concerns *J. Environ. Sci. Health* 1:97-153.

Woodruff T. J., Kyle A. D. y Bois F. Y. 1994. Evaluating health risk from occupational exposure to pesticides and the regulatori response. *Environ. Health Perspect.* 102:1088-1096

Worthing R. C. 1991. The Pesticide Manual. A world compendium. 9a. ed. Worthing R. C. y Hance, R.J. (Eds.). **The British Crop Protection Council**, 336 pp.

Wuu K. y Grant W.F. 1966. Morphological and somatic chromosomal aberrations induced by pesticides in barley *Hordeum vulgare*. *Can. J. Genet. Cytol.* 8:481-501.

Wuu K. y Grant W. F. 1967. Chromosomal aberrations induced by pesticides in meiotic cell of barley. *Cytologia* 32:31-41.

Wynder E. L., Ondermark J. y Matel N. 1963. An epidemiological investigation of cancer of the bladder. *Cancer* 16:1388-1407.

Zeiger E., Anderson B., Howorth S. y Morthelmans K. 1992. Salmonella mutagenicity test. V. Results from the testing of 311 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* 19 (Suppl. 21):2-141.

TABLA I
PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA DE *Salmonella typhimurium* CEPA TA98 Y TA100 TRATADAS CON LOS
HERBICIDAS ASULAM (A) Y EPTC (B).

A

µg/ml	% Sup. TA98	% Sup. TA100
0	100.00	100.00
450	37.10	66.30
500	31.13	50.00
800	31.00	37.20
1000	27.70	4.50
1500	17.10	3.17
2000	8.50	0.00
3000	2.85	0.43

B

µg/ml	% Sup. TA98	% Sup. TA100
0	100.00	100.00
450	51.40	25.00
500	37.00	29.00
800	26.00	23.00
1000	14.20	13.00
1500	8.50	7.20
2000	23.75	3.40
3000	2.85	1.36

TABLA 2

PROMEDIO DE REVERTANTES DE *Salmonella typhimurium* CEPAS TA98 y TA100 TRATADAS CON EL HERBICIDA ASULAM SIN (A) Y CON (B) ACTIVACION METABOLICA (FRACCION S9 DE MAMIFEROS).

A

$\mu\text{g/ml}$	TA 100-S9	TA98-S9
0	207 \pm 3.0	36.2 \pm 0.05
10	205 \pm 5.0	34.0 \pm 0.81
20	196 \pm 0.5	33.0 \pm 0.08
30	156 \pm 2.2	29.0 \pm 0.58
60	140 \pm 4.0	27.0 \pm 0.81
150	128 \pm 2.0	25.0 \pm 1.4
300	116 \pm 1.2	26.0 \pm 2.0
NaN	5402 \pm 64	
4-NPD		3530 \pm 28

B

$\mu\text{g/ml}$	TA100-S9	TA98-S9
0	268 \pm 6.0	30 \pm 1.9
10	249 \pm 2.5	30 \pm 1.7
20	209 \pm 3.3	23 \pm 0.62
30	192 \pm 4.0	20 \pm 1.1
60	128 \pm 1.7	23 \pm 1.3
150	114 \pm 5.4	24 \pm 1.0
300	109 \pm 1.8	23 \pm 0.5
2AF	3168 \pm 64	2878 \pm 57

TABLA 3

PROMEDIO DE REVERTANTES DE *Salmonella typhimurium* CEPA TA98 TRATADA CON LOS HERBICIDAS ASULAM (A) Y EPTC (B) SIN Y CON ACTIVACION METABOLICA (FRACCION S9 DE PLANTAS)

A

	-S9	+S9
0		32.5 ± 1.3
1	33.6 ± 0.9	32.9 ± 2.3
2	33.1 ± 1.5	35.1 ± 1.1
3	31.1 ± 1.5	28.6 ± 1.3
4	30.4 ± 1.3	26.9 ± 1.3
5	29.6 ± 1.4	34.8 ± 1.3
6	28.3 ± 1.6	23.3 ± 1.7
7	24.6 ± 1.7	14.9 ± 2.0
8	13.0 ± 2.6	445.0 ± 12.3
9	44.3 ± 2.6	

B

	-S9	+S9
0		32.5 ± 0.90
1	33.6 ± 1.2	29.7 ± 1.5
2	29.7 ± 1.4	27.4 ± 1.6
3	29.6 ± 1.3	26.1 ± 1.3
4	28.6 ± 1.4	24.8 ± 1.3
5	27.5 ± 1.1	21.6 ± 1.3
6	26.9 ± 1.7	22.1 ± 1.6
7	26.3 ± 1.1	12.9 ± 2.3
8	17.6 ± 2.0	445.0 ± 12.3
9	44.3 ± 2.1	

TABLA 4

PROMEDIO DE REVERTANTES DE *Salmonella typhimurium* CEPA TA100 TRATADA CON LOS HERBICIDAS ASULAM (A) Y EPTC (B) SIN Y CON ACTIVACION METABOLICA (FRACCION S9 DE PLANTAS)

A

$\mu\text{g/ml}$	-S9	+S9
0	224.5 ± 4.9	204.0 ± 6.2
1.0	127.0 ± 1.9	126.0 ± 1.8
2.5	127.8 ± 0.8	125.0 ± 0.8
5.0	125.5 ± 1.0	123.9 ± 0.8
10.0	124.8 ± 1.1	122.6 ± 0.6
20.0	124.8 ± 0.9	122.5 ± 1.1
30.0	122.1 ± 3.9	120.5 ± 2.6
60.0	93.7 ± 5.7	96.6 ± 2.5
100.0	93.3 ± 5.0	87.3 ± 1.1
200.0	71.0 ± 6.5	83.6 ± 3.0
400.0	473.5 ± 29.1	921.3 ± 19.9

B

$\mu\text{g/ml}$	-S9	+S9
0	224.5 ± 4.9	204.0 ± 6.2
1.0	124.3 ± 1.1	123.0 ± 1.7
2.5	122.3 ± 1.1	122.3 ± 3.3
5.0	122.4 ± 1.1	119.5 ± 1.2
10.0	117.6 ± 2.4	117.4 ± 2.3
20.0	110.6 ± 3.5	115.0 ± 2.3
30.0	108.1 ± 1.7	112.2 ± 2.7
60.0	106.1 ± 3.2	75.6 ± 6.3
100.0	96.6 ± 2.5	58.6 ± 6.3
200.0	79.3 ± 4.5	51.3 ± 3.8
400.0	473.5 ± 29.1	921.3 ± 19.9

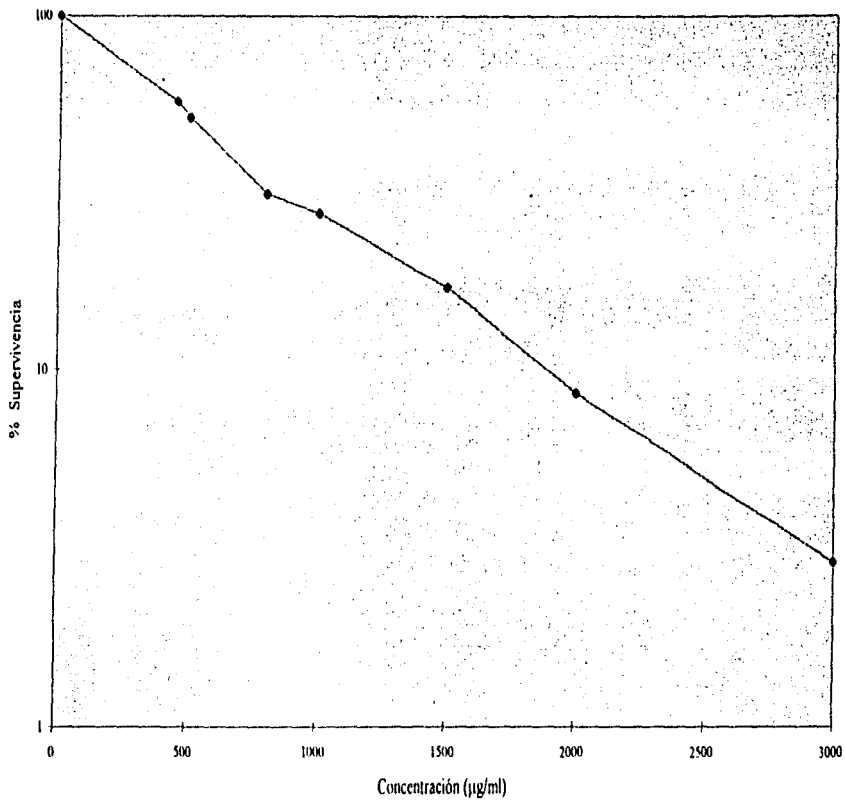


Fig. 1. Porcentaje de supervivencia de *Salmonella typhimurium* cepa TA98 tratada con el herbicida asulam

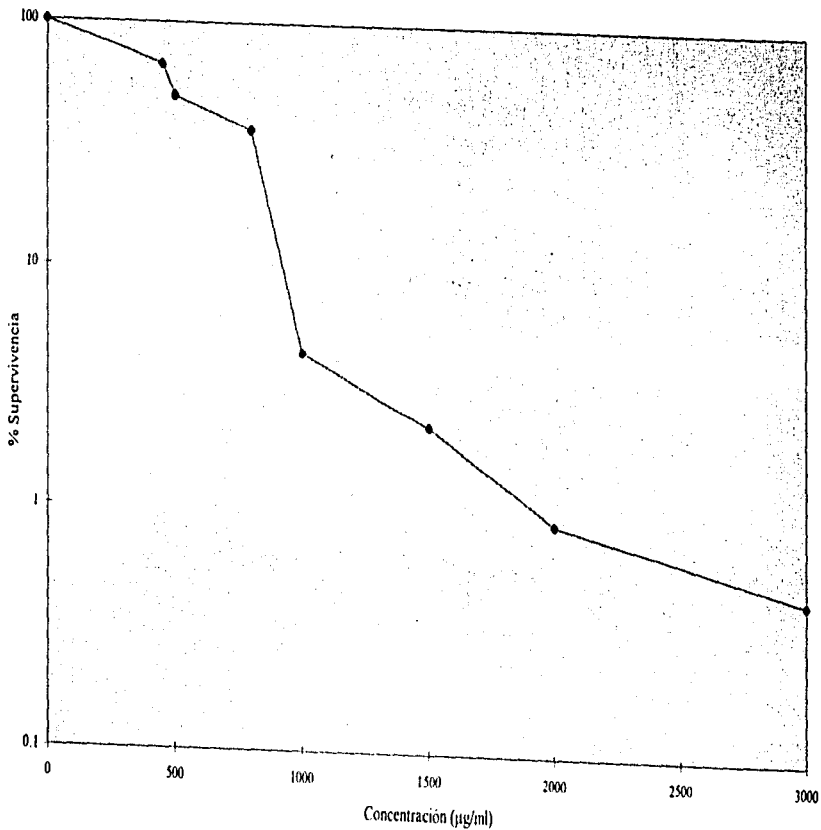


Fig. 2. Porcentaje de supervivencia de *Salmonella typhimurium* cepa TA100 tratada con el herbicida asulam

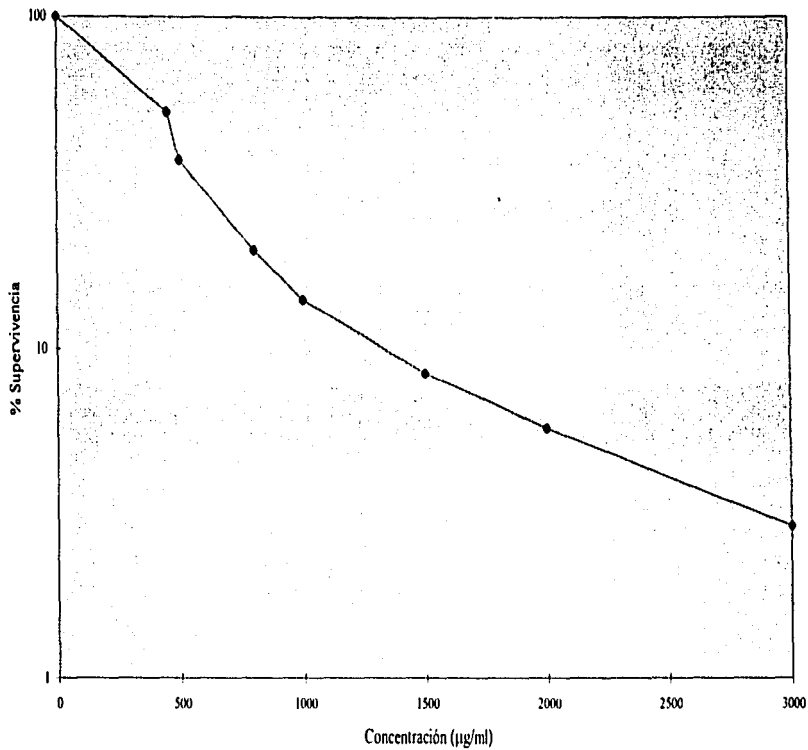


Fig. 3. Porcentaje de supervivencia de *Salmonella typhimurium* cepa TA100 tratada con el herbicida EPTC

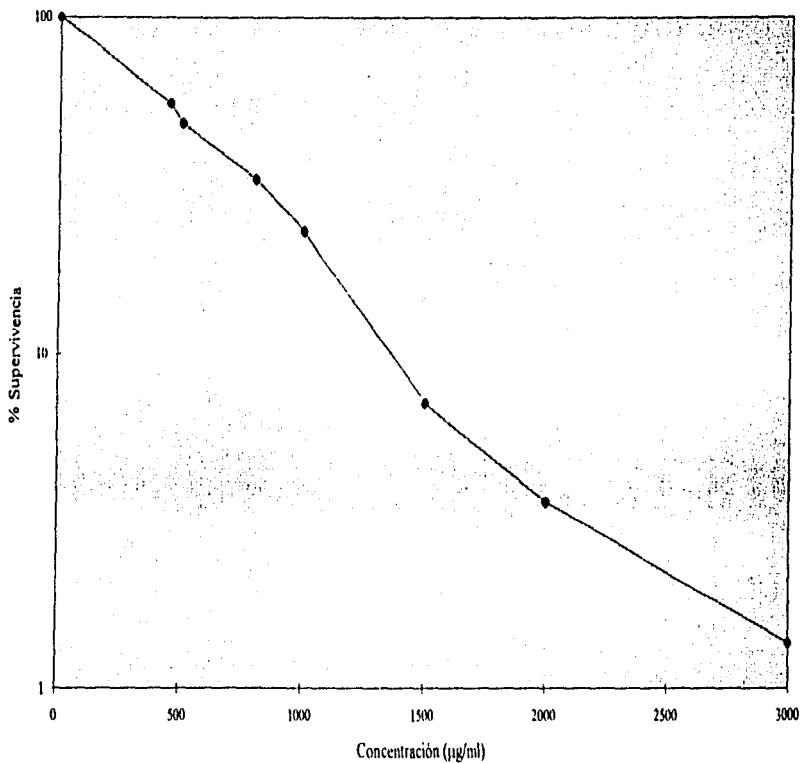


Fig. 4. Porcentaje de supervivencia de *Salmonella typhimurium* cepa TA100 tratada con el herbicida EPTC

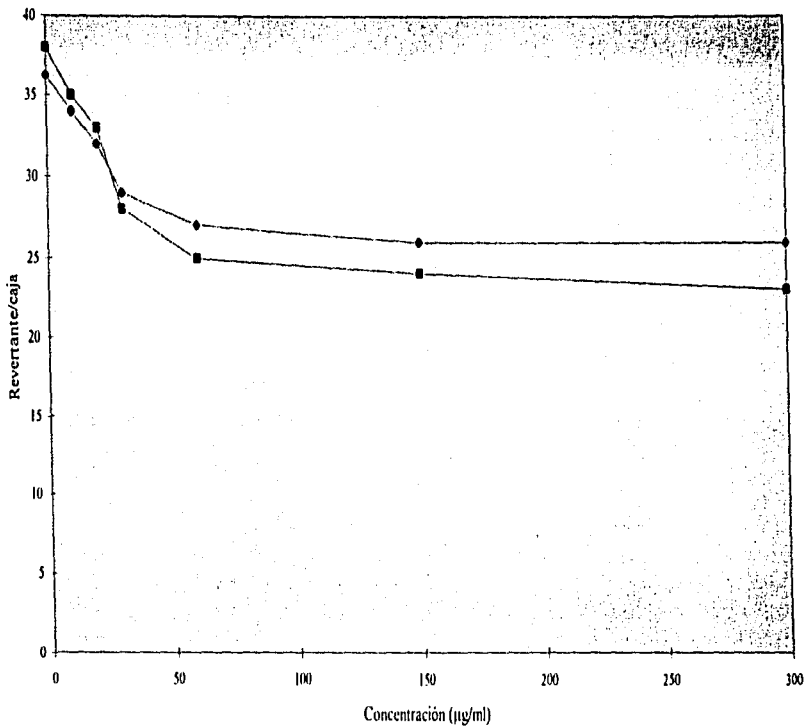


Fig. 5. Promedio de revertantes de *Salmonella typhimurium* cepa TA98 tratada con el herbicida asulam sin (●) y con (■) activación metabólica (fracción S9 de mamíferos)

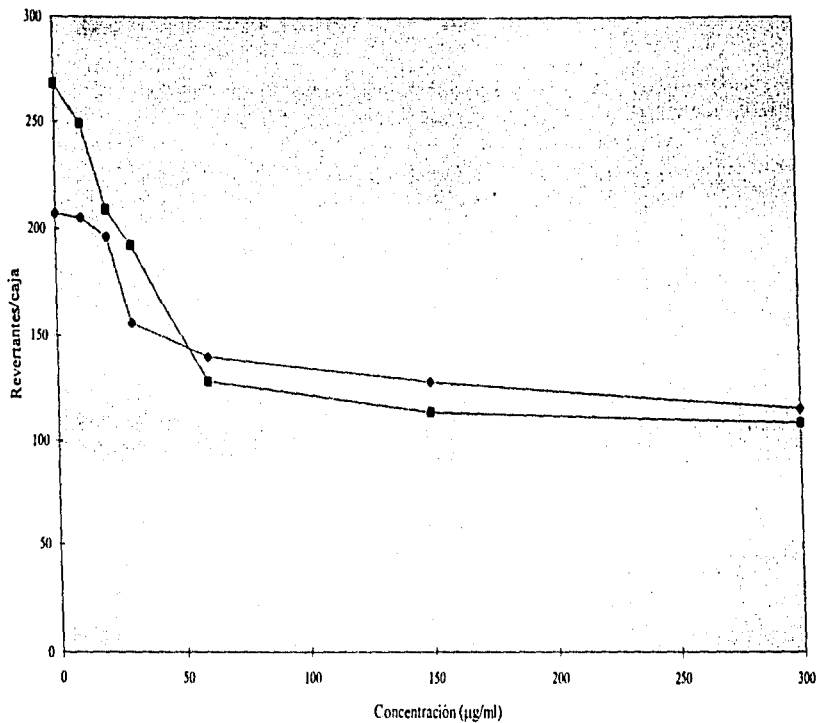


Fig. 6. Promedio de revertantes de *Salmonella typhimurium* cepa TA100 tratada con el herbicida asulam sin (●) y con (■) activación metabólica (fracción S9 de mamíferos)

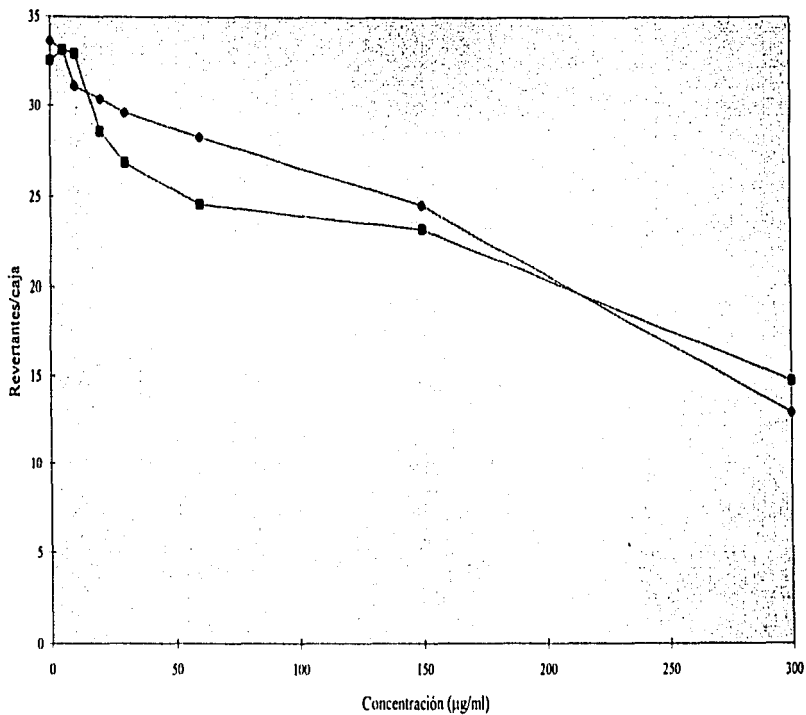


Fig. 7. Promedio de revertantes de *Salmonella typhimurium* cepa TA98 tratada con el herbicida asulam sin (●) y con (■) activación metabólica (fracción S9 de plantas)

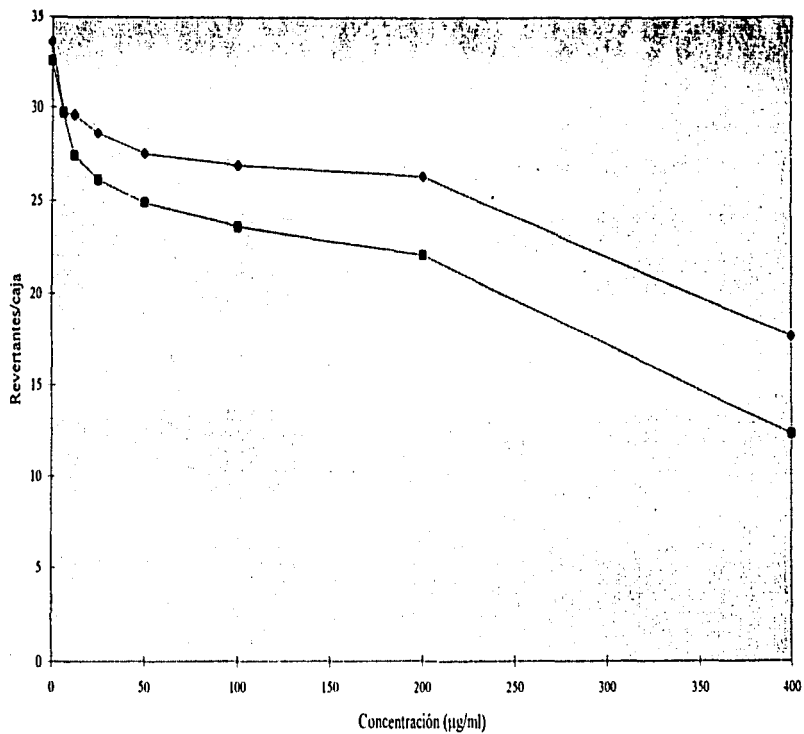


Fig. 8. Promedio de revertantes de *Salmonella typhimurium* cepa TA98 (tratada con el herbicida EPTC sin (●) y con (■) activación metabólica (fracción S9 de plantas)

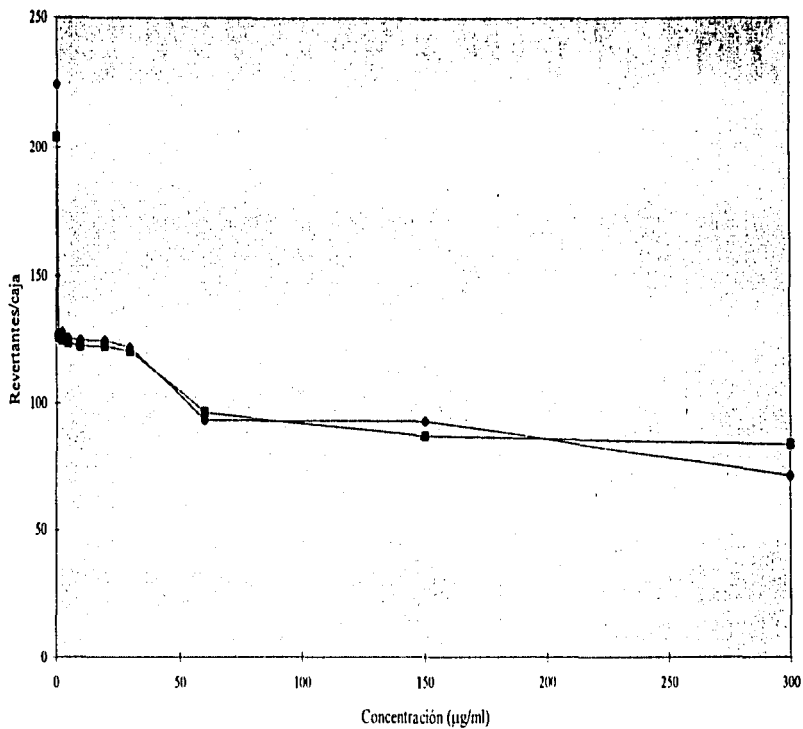


Fig. 9 Pronoio de revertantes de *Salmonella typhimurium* cepa TA100 (tratada con el herbicida asulam sin (●) y con (■) activación metabólica (fracción S9 de plantas)

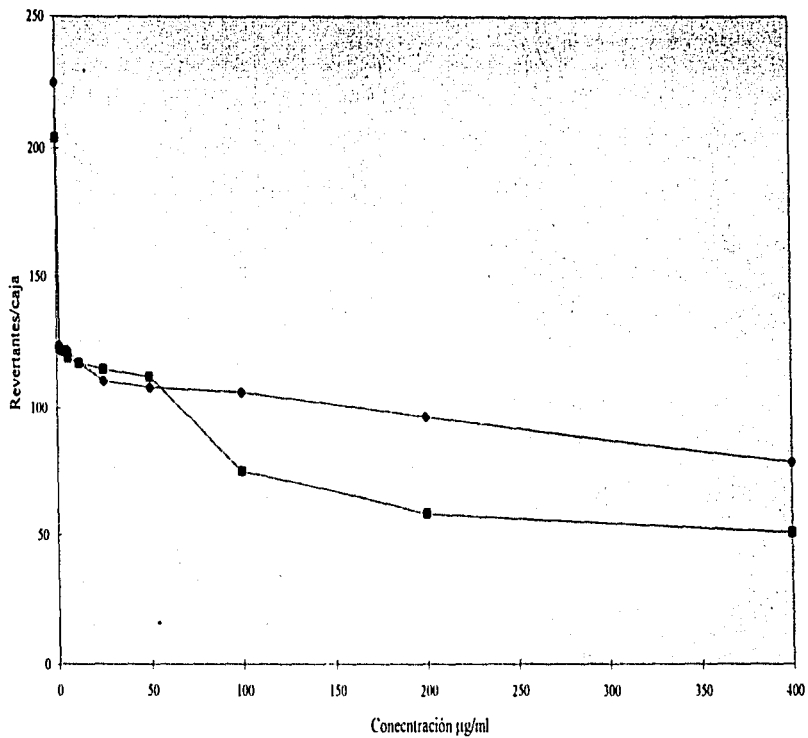


Fig. 10. Promedio de revertantes de *Salmonella typhimurium* cepa TA100 tratada con el herbicida EPTC sin (○) y con (■) activación metabólica (fracción S9 de plantas)