



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACION DE LA CAPACIDAD METABOLICA DEL
CILANTRO EN LA MUTAGENICIDAD DE
INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
MARTHA ELENA DIAZ HERNANDEZ



DIRECTORA DE TESIS: DRA. JOSEFINA CORTES ESLAVA

2004



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: Evaluación de la capacidad metabólica del cilantro en la mutagenicidad de insecticidas organofosforados.

realizado por Martha Elena Díaz Hernández

con número de cuenta 9609458-7 , **quien cubrió los créditos de la carrera de:** Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	Dra. Josefina Cortés Eslava
Propietario	
Propietario	Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo
Propietario	Dr. Rafael Villalobos Pietrini
Suplente	Dra. María Elena Calderón Segura
Suplente	M. en C. Ana Rosa Flores Márquez

J.A.H.
Sandra Gómez Arroyo
Rafael Villalobos Pietrini
María Elena Calderón Segura
Ana Rosa Flores Márquez
FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

Juan Manuel Rodríguez Chávez
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a la Dra. Josefina Cortés Eslava por la dirección de esta tesis así como por la invaluable asesoría brindada en el campo teórico y práctico que me permitió concluir de la mejor manera este trabajo.

Agradezco a mis sinodales sus valiosas correcciones y comentarios.

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Dr. Rafael Villalobos Pietrini

Dra. María Elena Calderón Segura

M. en C. Ana Rosa Flores Márquez

Quiero agradecer de manera especial a la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo por el apoyo brindado durante la realización de esta tesis, por el tiempo dedicado a este trabajo y las excelentes revisiones al escrito, mil gracias doctora.

Agradezco Dr. Rafael Villalobos Pietrini por sus destacados comentarios del trabajo escrito.

Agradezco el otorgamiento de beca para la realización de este trabajo, así como el apoyo financiero brindado por PAPITT proyecto No IN222202.

DEDICATORIAS

A mis padres Margarita Hernández y Modesto Díaz, que no flaquearon ni un momento aún en los momentos difíciles para que nosotros realicemos nuestros sueños, además del amor y comprensión que nos dan día a día.

A mis hermanos Reyna, Jose C., Guillermina y Sebastián, así como mi sobrino que me han dado muchos momentos de felicidad.

A Rodrigo López (conejito) por el apoyo y amor que siempre me ofrece, por su ayuda para la realización de este trabajo, mil gracias.

A mis compañeros del Laboratorio de Citogenética Ambiental del Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM: Alejandro F, Ana, Antonio, Carolina, César, Cony, Emmanuel, Erika, Isabel, Toño, Ivonn, Lilia, Alejandro P, Roció y Selene.

A las señoras: Emma, Luz Maria y Victoria del Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM.

A Sofia por su ayuda en la asesoría técnica y por su gran amistad.

A mis amigos de toda la vida: Paty, Olga, Marta, Navarro, Héctor, Damián, Diana, Carlos, Paulina, en los que siempre encuentro apoyo.

ÍNDICE

CONTENIDO

1.RESUMEN	2
2.INTRODUCCIÓN	3
I.Antecedentes	3
II.Activación metabólica plantas y su papel en la mutagénesis ambiental	4
III.Metabolismo vegetal (biotransformación de plaguicidas).....	6
IV.Activación vegetal (oxidaciones)	8
V.Células Vegetales	11
a) Coriandrum sativum	12
VI.Plaguicidas	13
VI.I Organofosforados	16
a)Ometoato.....	19
b)Paratión metílico	19
c)Metil azinfos	20
d)Tamaron	20
3.OBJETIVOS.....	22
4.HIPÓTESIS	23
5.MATERIALES Y MÉTODOS	24
a) Ensayo de Ames.....	24
b) NOP (4- nitro -o-phenilendiamina)	26
c) Ensayo de mutagenicidad	27
d) Ensayo de activación	28
e) Contenido de proteínas y Determinación de la actividad peroxidasa	29
6.RESULTADOS	30
7.DISCUSIÓN.....	34
8.CONCLUSIONES.....	38
9.REFERENCIAS	39
10.TABLAS.....	60
11.FIGURAS	64

RESUMEN

Los insecticidas organofosforados son ampliamente usados en la agricultura, el hogar, la jardinería etc., para el control de diversas plagas, por lo que la población humana está expuesta a éstos. Debido a que su principal actividad tóxica reside en la inhibición de la acetilcolinesterasa una enzima que no es exclusiva de los insectos, estos compuestos pueden producir efectos negativos en la mayoría de los organismos expuestos, más aún, su biotransformación por plantas incrementa la relación con ellos, debido a los residuos que permanecen en éstas, por lo que existe la posibilidad de daño genotóxico a los consumidores, así por ejemplo, el metabolismo del organofosforado paratión en mamíferos *in vivo* genera al paraoxón un potente inhibidor de la acetilcolinesterasa, por su parte los sistemas vegetales han demostrado ser también efectivos para metabolizar a los agentes xenobióticos, como la activación de arilaminas por *Nicotiana tabacum* a productos mutagénicos para *Salmonella typhimurium*. Las enzimas involucradas en la activación definen la genotoxicidad de los productos finales tanto de plantas como de animales destacando las peroxidasas en el sistema vegetal, por lo que en este trabajo se evaluó su actividad. La biotransformación de agentes xenobióticos en mutágenos activos en plantas superiores ha creado la necesidad de evaluar los efectos en ellas y en el ambiente debido a que son la base de la cadena alimentaria y por lo tanto de la salud humana.

Los plaguicidas evaluados en este estudio, no provocan por sí mismos daño mutagénico debido a que son altamente tóxicos, causando muerte a las bacterias, por lo que se decide evaluar su comportamiento promutágeno. En el presente trabajo, se encontró que el metabolismo se ve afectado por el daño de las células vegetales provocado por los insecticidas, aunado a su baja actividad peroxidasa por lo que no se encuentra efecto mutagénico en los tratamientos.

INTRODUCCION

Antecedentes

Algunos factores importantes que favorecen el incremento en la incidencia de cáncer incluyen el estilo de vida, los hábitos personales, la dieta, cambios ambientales causados por actividades industriales que propician la liberación de productos químicos al ambiente, la contaminación de aire, agua, suelo y la contaminación potencial de alimentos. Otras causas de riesgo incluyen ciertos compuestos que son principalmente encontrados en los ambientes laborales (arsénico, asbestos, berilio, cromo, radón, níquel, cadmio, etc.); elementos en la dieta, como es el bajo consumo de frutas y vegetales; componentes genéticos que predisponen a la acción carcinogénica (Yu, 2001).

La mayor parte de la producción agrícola se atribuye al uso de agentes químicos para mantener elevadas cosechas y cultivos de alto rendimiento, siendo parte integral para el éxito de esta industria (Margni *et al.*, 2002). No obstante, los efectos benéficos en el control de diferentes plagas muchos de éstos agentes químicos pueden poner en riesgo al ambiente y al hombre (Hu y Kulkarni, 1998), debido al posible daño genotóxico que causen, considerando su gran uso en las aplicaciones domésticas como industriales (Ündeger y Basaran, 2002). Estudios experimentales revelan que varios ingredientes de agroquímicos tienen efectos a nivel genético, induciendo aberraciones cromosómicas, mutación génica o daño al ADN (Bolognesi y Morasso, 2000). Así, su uso en la agricultura sin la protección necesaria principalmente de los agricultores puede conducir a alteraciones en el material hereditario y el posible desarrollo de algunos tipos de tumores (Ündeger y Basaran, 2002).

El monitoreo biológico se refiere a la medición y la evaluación de agentes químicos y/o sus metabolitos para evaluar la exposición y el riesgo a la salud con base en métodos validados (Hoet, 1996), siendo un elemento importante en estudios de valoración del riesgo de exposición ocupacional particularmente a los que se dedican al trabajo agrícola, con el propósito de prevenir (He, 1999).

La biomasa vegetal del planeta (aproximadamente de 1.8×10^{12} toneladas de peso seco) puede ser una forma de reexposición a los agentes tóxicos ambientales debido a su capacidad metabólica para incorporarlos en diferentes partes de las mismas, por lo que su bioacumulación juega un papel importante en la modificación y la distribución a través de las cadenas tróficas por lo que su estudio puede ser preponderante en la toxicología ambiental (Plewa y Gentile, 1982; Sandermann, 1992; Plewa *et al.*, 1995).

Activación metabólica en plantas y su papel en la mutagénesis ambiental

Los plaguicidas han contribuido sustancialmente al mejoramiento de la productividad agrícola permitiendo obtener altos rendimientos, además de controlar la mayoría de plagas, incluyendo vectores de enfermedades tanto humanas como de animales, así como las especies no deseadas que causan perjuicio o que interfieren con la producción agropecuaria y forestal (SEMARNAP-INE, 1999). El potencial tóxico de los plaguicidas es, en buena parte, responsable de esta dicotomía; por una parte, su capacidad para destruir las plagas es una poderosa herramienta para el control de las mismas y a la vez, esta característica los hace potencialmente dañinos para la salud y el ambiente (Ortega *et al.*, 1994).

La mayoría de los plaguicidas aplicados a tierras agrícolas pueden afectar a diferentes organismos por su baja especificidad, contaminar el suelo, el aire y el agua. En años recientes se ha incrementado la preocupación en cuanto a su uso, ya que

constituyen un riesgo para la población en general a través de sus residuos en el suministro alimenticio (Margni *et al.*, 2002).

Plewa y Gentile (1982) definieron como mutágeno ambiental a un agente físico o químico liberado al ambiente que puede alterar el genoma o sus propiedades funcionales. Un promutágeno es un agente químico, que sin ser mutágeno propiamente, puede ser biotransformado a mutágeno.

Los promutágenos son agentes químicos que requieren del metabolismo para aportar productos mutagénicos (Gichner *et al.*, 2001). La capacidad de las plantas para biotransformar xenobióticos promutagénicos a mutágenos fue demostrado por Velemiský y Gichner (1968) en *Arabidopsis thaliana* que modifica algunas nitrosaminas hacia sus últimas formas mutagénicas, de esta manera el término de activación por plantas se refiere a este evento (Plewa, 1978). Varios estudios se han realizado para establecer los aspectos bioquímicos involucrados en la transformación de promutágenos a productos mutagénicos (Chiapella *et al.*, 2000).

Se han realizado numerosos estudios para entender el destino metabólico de plaguicidas tanto en el sistema vegetal como en el animal (Kulkarni y Hodgson, 1980). Los promutágenos en las plantas pueden ser activados o constituir conjugados estables de peso molecular alto, que pueden ser secuestrados en vacuolas celulares o en el material de la pared celular y se liberan cuando son consumidos por humanos o animales (Plewa y Gentile, 1982). La evaluación de los efectos provocados por los agentes ambientales sobre las propias plantas, además de su acumulación en aquellas que son comestibles, es primordial y lo es aún más si se considera la posible biotransformación de estas sustancias en mutágenos activos, para proteger tanto el ambiente como la salud humana.

Metabolismo vegetal (biotransformación de plaguicidas)

Las plantas son capaces de metabolizar muchos xenobióticos por oxidación, conjugación y pueden compartimentalizar estos productos en sus tejidos (Lamoreux y Rusness, 1986). La biotransformación por plantas o activación metabólica es el proceso por el cual un promutágeno es convertido a mutágeno (Plewa, 1978; Plewa y Gentile, 1982; Lhotka *et al.*, 1987; Seo *et al.*, 1993).

Algunos autores (Sterling, 1994; Romero, 2003) concuerdan en que los productos tóxicos generados por plantas a partir de su metabolismo, dependen de diversos factores como son: el tipo de compuesto, sus propiedades físico-químicas, la concentración aplicada, las rutas metabólicas que se involucran, lo que implica diferencias en su toxicidad, pudiéndose incrementar, disminuir o no afectarse después de la activación.

La biotransformación de los plaguicidas y en general de los xenobióticos puede llevarse a cabo en las plantas superiores a través de diferentes reacciones: primarias "fase I" en la que ocurre la transformación, dada principalmente por las monooxigenasas del citocromo P-450, incluyen reacciones que involucran procesos degradadores y que pueden activar o desactivar al compuesto original como son la oxidación, la reducción y la hidrólisis; secundarias "fase II" representada por reacciones de conjugación principalmente por las glutathion s-transferasas (GSTs) y las glucosiltransferasas (GTs). Los productos conjugados presentan nula o baja fitotoxicidad, pero poseen alta polaridad y son solubles en agua, cuya movilidad limitada los predispone a la acción enzimática de las reacciones de la "fase III", las cuales son de compartimentalización, los intermediarios son conjugados primarios o secundarios de residuos insolubles en agua, que pueden ser incorporados a los organelos celulares (vacuola), ubicarse en el citoplasma o adherirse a polímeros de

lignina (fracciones de pared celular) es posible que no sean fitotóxicos pero de cualquier forma se desconoce su destino final y su actividad tóxica. Las enzimas de estas rutas de desintoxicación (citocromo P450, GSTs, GTs) tienen gran similitud con las que se encuentran en el hígado de mamíferos, de tal manera que las plantas se consideran como "hígados verdes", los cuales pueden actuar como vertederos de agentes químicos ambientales (Sandermann *et al.*, 1977; Shimabukuro *et al.*, 1981; Sandermann, 1994).

El conocimiento sobre los sistemas de desintoxicación en plantas se ha incrementado rápidamente en años recientes, siendo identificados primero en plantas de importancia económica, como trigo, maíz y avena (Frear y Swanson, 1970; Jablonkai y Hatzios, 1993) en árboles (Schöder *et al.*, 1990; Pflugmacher y Schöder, 1995) y también en varios cultivos celulares (Sandermann *et al.*, 1991; Wetzell y Sandermann, 1994). Aunque se tiene poca información en helechos y musgos sobre las actividades de las enzimas, citocromo P450, GSTs y GTs. (Dhindsa, 1991; Pflugmacher y Sandermann, 1998 a, b) limo y macrofitas marinas (Vilter y Glombitza, 1983; Mehrtens, 1994; Pflugmacher y Steinberg, 1998). Sin embargo, cada vez hay mayor evidencia de la existencia de enzimas de desintoxicación de xenobióticos, por ejemplo Pflugmacher *et al.*, (1999) describe 9 especies de macroalgas marinas entre las que se incluyen Rodofitas, Cromofitas y Clorofitas, que presentan enzimas de las fases I y II de la ruta de desintoxicación de xenobióticos.

Activación vegetal (Oxidaciones)

Las plantas tienen un papel clave en la circulación de xenobióticos y sus intermediarios, la xeno-bioquímica involucra el establecimiento de principios moleculares de desintoxicación de compuestos extraños y la identificación de mecanismos de regulación de su metabolismo. El interés por las enzimas participantes en el metabolismo de xenobióticos en plantas se ha incrementado durante los últimos años (Khatishvili *et al.*, 1997), siendo las oxidaciones las reacciones más importantes en la biotransformación de éstos compuestos (Dohn y Krieger, 1981) y varias enzimas que pueden ser importantes en el papel oxidante (Lamoureux y Frear, 1979).

En animales, la oxidación de xenobióticos se considera que es llevada a cabo principalmente por las oxidasas de función mixta usualmente con un citocromo P450 (CYPs) como oxidación terminal. En plantas, varios tipos de enzimas oxidantes como son las CYPS, peroxidasas, lipooxigenasas y posiblemente otros sistemas enzimáticos pueden estar implicadas en la oxidación de xenobióticos, aunque no se sabe exactamente cuales enzimas son las más importantes (Fonné-Pfister *et al.*, 1988; Higashi, 1988; Plumagcher y Sandermann, 1998 a y b; Sandermann, 1988, 1992; Durst y Benveniste, 1993).

En relación a esta actividad, existe gran progreso en la literatura asociada al metabolismo oxidante de plaguicidas, propiedad exclusivamente atribuida por mucho tiempo a la fracción microsómica de las monooxigenasas dependientes del citocromo P450 tanto en animales como en plantas (Kulkarni y Hodgson, 1980). El citocromo P450 (p450 ó CYP) en mamíferos, comprende una superfamilia de enzimas que catalizan la oxidación de una amplia variedad de xenobióticos como drogas, agentes químicos tóxicos y carcinógenos así como sustancias endobióticas como esteroides, ácidos grasos, vitaminas y prostaglandinas. Muchos estudios sugieren que la mayoría

de los carcinógenos químicos en el ambiente no son activos por sí mismos en reacciones con el ADN, no obstante inducen tumores sólo después de la activación metabólica por medio de una gran variedad de enzimas del metabolismo que incluyen a P450 (Oesch-Bartlomowicz y Oesch, 2004).

Durante la década pasada, se ha determinado el papel de las enzimas P450 en la activación de procarcinógenos y promutágenos en mamíferos, en las que se involucran: CYP 1A1 y 1B1, 2E1 y 3A4 entre éstas, P450 CYP 1A1 y 1B1, son proteínas extrahepáticas en humanos y se ha reportado que son capaces de activar carcinógenos en mamíferos (Buratti *et al.*, 2002; Oesch-Bartlomowicz y Oesch, 2004).

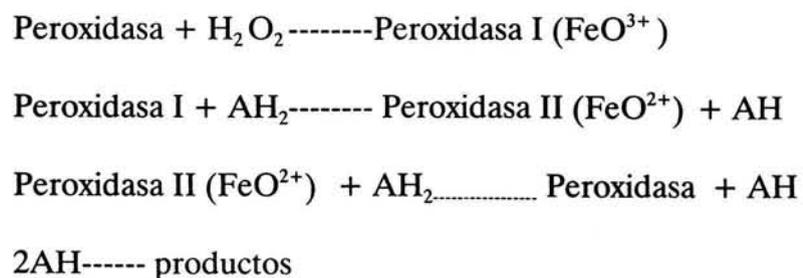
Por otra parte, una función de las CYPs en plantas de importancia económica, y la cual es solo parcialmente entendida, es su papel en la desintoxicación de herbicidas (Moreland *et al.*, 1993; Bolwell *et al.*, 1994; Frear, 1995; Thies *et al.*, 1996), donde proveen el primer paso en el proceso de la desintoxicación, responsable de la selectividad de los herbicidas en una amplia variedad de combinaciones herbicida-planta. En otros sistemas vegetales éstas enzimas participan en numerosas funciones críticas y en muchas rutas biosintéticas, especialmente se involucran en la producción de metabolitos secundarios como: triterpenos, alcaloides, fenilpropanoides, fitoesteroles, pigmentos, fitoalexinas, giberelinas, etc. (Durst y Benveniste, 1993; Durst y O' Keefe, 1995; Hallahan y West, 1995; Schuler, 1996; Schalk *et al.*, 1997; Chaple, 1998; Tijet *et al.*, 1998) así como también intervienen en varias reacciones relacionadas en el metabolismo de xenobióticos (Rivière y Cabanne, 1987; Higashi, 1988; Robineau *et al.*, 1988; Sandermann, 1988, 1992).

En contraste con la abundancia del citocromo P450 en el hígado de mamíferos, en varias especies de plantas esta hemoproteína es usualmente muy baja (Durst *et al.*, 1992). Por consiguiente, existe la necesidad de explorar rutas alternas para la

oxidación de xenobióticos, en este sentido se sabe que las peroxidases son capaces de metabolizar este tipo de compuestos han sido extensamente empleadas por muchos investigadores como modelo hemoproteico en estudios sobre la oxidación de xenobióticos. Estas enzimas son incluso más eficientes en el metabolismo de varios xenobióticos en plantas que las CYPs (Chiapella *et al.*, 2000). En adición a las peroxidases, las lipooxigenasas son otras proteínas catalíticas capaces de realizar una variedad de reacciones de oxidación de xenobióticos de manera eficiente (Hu y Kulkarni, 1998).

Las peroxidases son abundantes y están ampliamente diseminadas en las plantas, pueden constituir en ellas la primera línea de defensa e incrementan su actividad bajo la exposición a ozono, contaminación, radiación, desórdenes nutricionales, lesiones, infecciones, salinidad, edad, además de intervenir en la suberización, la elongación celular y la lignificación (Plewa *et al.*, 1996; Laukkanen *et al.*, 1999). Catalizan en general dos tipos de reacciones de oxidación: la clásica peroxidación, que requiere peróxido de hidrógeno y la oxidación que utiliza oxígeno molecular (Sandermann, 1982).

Las enzimas peroxidases son ubicuas en el reino de las plantas. Pueden catalizar N- ó C- hidroxilación, N-sulfoxidación, N-acetilación, halogenación, deshalogenación ó descarboxilación. Las reacciones de peroxidación normalmente proceden como se muestra:



El peróxido de hidrógeno es el sustrato astringente para la peroxidasa AH_2 ; es un sustrato no específico que funciona como donador de hidrógeno (Plewa *et al.*, 1991).

Por otro lado, las lipooxigenasas fueron redescubiertas como otras proteínas catalíticas eficientes capaces de realizar una variedad de reacciones de oxidación de xenobióticos (Hu y Kulkarni, 1998). Entre sus funciones destacan la regulación del crecimiento, desarrollo, senescencia, respuesta a heridas y otras formas de estrés (Siedow, 1991). Las lipooxigenasas presentan actividad cooxidasa, lo que las involucra en el metabolismo oxidante de varios agentes químicos endógenos y xenobióticos (Siedow, 1991; Kulkarni *et al.*, 1993).

Células Vegetales

La capacidad de las plantas para metabolizar agentes extraños ha sido demostrada en el campo y en el invernadero, siendo difícil establecer diferencias entre las reacciones catalizadas por los microorganismos, por los constituyentes del suelo o por la luz, de las reacciones verdaderas de la planta. El empleo de cultivos celulares evita éstas confusiones (Cortés-Eslava, 1993).

Líneas metabólicamente competentes de varias plantas han sido usadas como indicadoras de daño al ADN. Los promutágenos pertenecen a muchas clases de agentes químicos que han sido activados a genotóxicos, en los que se incluyen, promutágenos solamente activados por el metabolismo de las plantas dependientes de la fotosíntesis (Day *et al.*, 1989), inclusive las algas, han mostrado su capacidad de activar metabólicamente (Plewa, 1989; Plewa *et al.*, 1993, 1996; Podstavkova *et al.*, 1997).

Muchos agentes químicos son mostrados como promutágenos en el sistema de activación por plantas (Plewa y Gentile, 1982), aunque hay poca evidencia sobre el mecanismo o los mecanismos que participan. En algunas sustancias el proceso de activación puede ser similar para el sistema vegetal como animal; otros son activados por plantas, pero no por animales (fracción S-9), como es el caso de los herbicidas atrazina y cianazina (Plewa y Gentile, 1976; Plewa *et al.*, 1984).

Las células en suspensión han demostrado tener elevada capacidad de activación como la línea celular TX1 de tabaco al metabolizar arilaminas a productos que son mutagénicos en las cepas TA98 y YG1024 de *Salmonella typhimurium* (Plewa *et al.*, 1991; Gichner *et al.*, 1995) además de secretar al medio de cultivo donde se encuentran, componentes macromoleculares de matriz: pudiendo ser, polisacáridos de pared celular o materiales intercelulares, además de las enzimas de activación (Stavevra *et al.*, 1997).

Coriandrum sativum

El cilantro (*Coriandrum sativum* L.) es ampliamente distribuido y cultivado por semillas que contienen un aceite esencial (mayor al 1%) además del monoterpenoide linalool como principal ingrediente activo (Wichtl, 1994). Las semillas son una especia popular que tienen uso sobresaliente en la medicina naturista para el tratamiento de parásitos del estómago, indigestión, reumatismo y dolores articulares (Wichtl, 1994). Otros estudios han reportado su acción hipoglucémica y sus efectos sobre el metabolismo de los carbohidratos (Gray y Flatt, 1999; Chithra y Leelamma, 2000). Los componentes volátiles del aceite esencial de semillas y hojas inhiben el crecimiento de microorganismos (Delaquis *et al.*, 2002) y también evita la peroxidación lipídica (Anilakumar *et al.*, 2001; Tanabe *et al.*, 2002). El extracto de las hojas presenta efecto antioxidante en mayor proporción que en las

semillas (Wangensteen *et al.*, 2004), estudios más recientes del extracto evidencian que presenta propiedades antimutágenicas frente a aminas aromáticas en *S. typhimurium* (Cortés-Eslava *et al.*, 2004).

El cilantro (*Coriandrum sativum*) es una planta incluida en la dieta que se ingiere sin cocinarla como un ingrediente de diferentes ensaladas y salsas pudiendo tener consecuencias epidemiológicas significativas (Cortés-Eslava *et al.*, 2001).

Plaguicidas

Los plaguicidas son productos agroquímicos tóxicos diseñados para prevenir, controlar o combatir las diversas plagas, enfermedades y malezas que atacan los cultivos agrícolas, bloqueando sus procesos fisiológicos (Restrepo, 1992), representando un grupo de agentes químicos con estructuras diversas y actividad biocida (Kulkarni y Hodgson, 1980).

Los plaguicidas cubren un gran rango de componentes incluyendo, insecticidas, fungicidas, herbicidas, molusquicidas, nematocidas, rodenticidas, herbicidas, germicidas (Margni *et al.*, 2002), que contienen más de 1000 sustancias activas, co-formulados con otros materiales incorporados en cerca de 35,000 preparaciones que se conocen como plaguicidas (He, 1999).

Hay muchas clasificaciones de los plaguicidas por su origen: sintético o natural; por el tipo de organismo al que atacan, etc. De acuerdo con su toxicología: los organoclorados presentan cloro en su molécula y agrupan un considerable número de compuestos sintéticos, tienen una gran estabilidad físico-química, además de elevada persistencia en el ambiente, actúan por inhibición de la enzima citocromo oxidasa que interviene en el intercambio gaseoso en animales con sangre y desestabiliza al sistema nervioso; los organofosforados son fundamentalmente ésteres del ácido fosfórico, son

menos persistentes en el ambiente con relación a los organoclorados, pero tienen un alto grado de toxicidad al inhibir la acetilcolinesterasa tanto de insectos como de mamíferos, la mayoría son sistémicos, su biotransformación se realiza mediante las enzimas oxidasas, hidrolasas y transferasas; carbamatos este grupo corresponde en su mayor parte a derivados del ácido N-metil-carbámico, son de acción sistémica similar a los organofosforados y los Piretroides actúan sobre el sistema nervioso además de que no se acumulan en el organismo y no persisten en el ambiente.

Debido a las grandes ventajas que representaban estos productos, su uso se generalizó ingresando a los mercados mundiales, llegándose a utilizar en exceso, lo que ha incrementado la resistencia de plagas, obligando a la aplicación de cantidades cada vez mayores de plaguicidas, lo que ha estimulado la elaboración de productos nuevos y más tóxicos (Ortega *et al.*, 1994).

La exposición a plaguicidas ocurre en los procesos de manufactura (mezcla, carga y empaquetamiento), así como en el almacenamiento, en la preparación y su aplicación. Los efectos tóxicos agudos son fácilmente reconocidos, mientras que los efectos de la exposición a largo plazo a bajas dosis son frecuentemente difíciles de distinguir (He, 1999).

Los plaguicidas son mezclas complejas, que contienen además del ingrediente activo, otros componentes, como disolventes, agentes emulsificantes y aditivos (Ündeger y Basaran, 2002), por lo que existe inquietud mundial, que está relacionada a sus residuos en los alimentos los cuales se han incrementado durante los últimos 30 años. Esta situación ha llevado a implementar regulaciones de límites máximos de residuos (MRLs) en diferentes productos agrícolas (Haib *et al.*, 2003). Los insecticidas son predominantemente neurotóxicos para humanos, presentándose

la mayor proporción en los países en desarrollo (He *et al.*, 2002). Debido al impacto ambiental relacionado a su uso abundante y a la gran población expuesta, es importante determinar los efectos y los riesgos para el desarrollo de parámetros que podrán ser utilizados en la toma de decisiones sobre la seguridad de su uso (Bucheli y Fent, 1995; Castro *et al.*, 1999). Sin embargo, hay un número limitado de bioindicadores para la evaluación de los efectos de exposición a plaguicidas que son reconocidos y validados a nivel mundial (Castro *et al.*, 1999).

Para determinar el potencial de contaminación por plaguicidas existen modelos que se agrupan en cuatro principales: 1) Transferencia de modelos como el desarrollado por Leonard (1990) donde evalúa el destino de las sustancias, el método hace énfasis en la conducta de los plaguicidas en el ambiente y frecuentemente ignora los efectos sobre la población o los ecosistemas; 2) método de Ranking usado por Kovach *et al.* (1992), Jouany (1995) y Newman (1995) en el que se incorporan diferentes efectos en el ambiente, pero la evaluación de cada uno es realizado sin referencia para su cálculo y no considera el impacto ambiental (Kulluru *et al.*, 1996); 3) Evaluación ambiental del ciclo de vida donde se valora el impacto en todos los ciclos de vida. Métodos como son CML 92 ó el Ecoindicador (Goedkoop 1995) incorporan al mismo tiempo varios plaguicidas considerando datos tóxicos y ecotoxicológicos pero no su destino en el ambiente; recientemente el Ecoindicador 99 combina el destino de las sustancias y el análisis de exposición con la estimación toxicológica en humanos y en los ecosistemas; 4) Margni *et al.*, (2002) proponen un modelo para evaluar el impacto de los plaguicidas sobre los ecosistemas terrestre acuático y a la salud evaluando los efectos de exposición (inhalación, vía alimentos o agua potable). Los modelos descritos representan el impacto general ambiental, en los que no pueden ser considerados todos los factores como valores absolutos, ya que dependen del comportamiento de éstos en el ambiente, la cantidad aplicada y su ecotoxicidad.

Los organofosforados

La síntesis química de los organofosforados inicia aparentemente a partir de 1820 con la esterificación de alcoholes hacia ácido fosfórico. A pesar de que la síntesis de numerosos compuestos organofosforados ocurrió a principios de 1900, su toxicidad potencial se desconocía. Entre 1930 y 1940, grupos guiados por Saunders en Inglaterra y en Alemania por Gerhard y Schader produjeron varios compuestos muy tóxicos, para su posible uso en la guerra, los más notables fueron sarin y soman, ambos fosforofluoridatos y tabum un fosforocianidato. El grupo de Schader produjo el primer insecticida organofosforado comercial, incluyendo el tepp en 1937, dimefox en 1940, scharadan (OMPA) en 1942 y el paratión en 1944. Después de la Segunda Guerra Mundial con el conocimiento de los datos de investigación de Schader, el interés en los insecticidas organofosforados creció rápidamente. Los primeros insecticidas resultaron efectivos, al mismo tiempo mostraron una toxicidad elevada para los mamíferos, produciéndose en 1950 el malatión, uno de los organofosforados más seguros que se tenían en el mercado, para 1959 se elaboraron más de 50.000 de éstos compuestos. En 1970 más de 200 insecticidas organofosforados se vendían en todo el mundo. El aumento de la resistencia de plagas y por otro lado, la venta de nuevos insecticidas más seguros comenzó el decremento de su uso, aunque aún permanecen como un grupo importante para el control de diversas plagas (Krieger, 2001).

Estructura química y clasificación de los insecticidas organofosforados

La estructura general de los insecticidas organofosforados (OF) puede ser representada por un fósforo central y cuatro sustituyentes que lo rodean inmediatamente (Fig. 2).

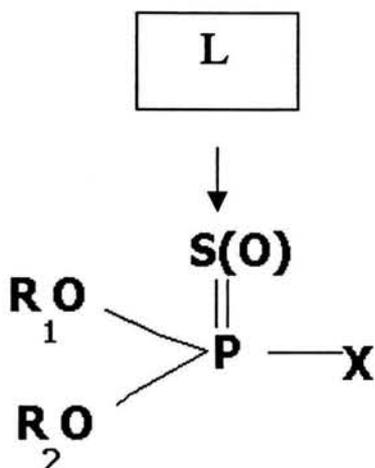


Figura 2. Estructura primaria de los organofosforados

La estructura primaria se representa como: L, el llamado “grupo saliente” es el más reactivo y variable. El termino “grupo saliente” se debe a que este sustituyente es desplazado cuando el organofosforado fosforila la acetilcolinesterasa, la primera enzima blanco, además de tener mayor susceptibilidad a la hidrólisis. R₁ y R₂ son menos reactivos y son comunmente grupos alcoxi pero pueden ser alquil, aril, alquiltio o alquilamino. X, es oxigeno o azufre (Krieger, 2001).

Los (OF) constituyen una gran familia de insecticidas que están relacionados estructuralmente por ser derivados del ácido fosfórico, su forma de acción toxicológica está asociada primariamente con la capacidad del compuesto o sus metabolitos para inhibir la enzima acetilcolinesterasa (AchE) dentro del tejido nervioso y las uniones neuromusculares (Sultatos, 1994). Las tres clases de

insecticidas organofosforados son: los fosforotioatos, los fosforoditioatos y los fosforoamidotiolatos (Mileson *et al.*, 1988; Chambers, 1992) como ejemplo de los insecticidas organofosforotioatos están clorpirifos, paration y diazinon, los cuales son inhibidores débiles de la acetilcolinesterasa, pero activan metabólicamente (desulfuración) a sus análogos de oxígeno correspondientes (oxón), convirtiéndose en potentes inhibidores de la acetilcolinesterasa, esta toxicidad potenciada se debe a que el oxón tiene una alta afinidad para fosforilar el residuo de serina hidroxilado dentro del sitio activo de la acetilcolinesterasa. La potencia tóxica es dependiente del balance entre la dosis llevada al sitio blanco y la tasa de bioactivación y/o desintoxicación (Sultatos, 1994).

La población mundial esta expuesta a los insecticidas organofosforados, debido a su uso en el control de plagas del hogar, césped, jardín y lugar de trabajo, además de su utilidad en la agricultura comercial. Los plaguicidas representan la mayor fuente de contaminación ambiental, anualmente 2.9×10^9 Kg aproximadamente de ingrediente activo se consumen en todo el mundo. De estos, los insecticidas organofosforados son mundialmente empleados y son contaminantes ambientales (Wagner *et al.*, 2003).

La resistencia de las plagas a los insecticidas ha propiciado el incremento de su aplicación y la elaboración de mezclas, como ha ocurrido en China donde se venden 916 tipos de estos compuestos, de los cuales el 94.3% son para uso doméstico (Niu y He, 2001) donde predominan los organofosforados (He *et al.*, 2002).

La mayoría de los OF se encuentran como fosforotioato o formas "tio" (P=S) los cuales son inhibidores débiles de la acetilcolinesterasa (Sams *et al.*, 2000). La presencia de plaguicidas en el desarrollo fetal, produce efectos negativos al inhabilitar ésta enzima (Das y Barone, 1999; Moser, 1999). Además, se han descrito

como inductores de anomalías morfológicas del espermatozoide (Wyrobek y Bruce, 1975; Behera y Bhunya, 1989; Mathew *et al.*, 1992; Jayashree *et al.*, 1994) y por afectar otras características de éste, incluyendo la calidad del semen en humanos (Padungtod *et al.*, 1999), ésta morfología anormal debida a la exposición a plaguicidas es usada como prueba de cambios genéticos en el espermatozoide (Wyrobek *et al.*, 1983). En pruebas puntuales que indican daño genético directo, producen efectos negativos como aberraciones cromosómicas, micronúcleos en médula ósea de ratón (Jayashree *et al.*, 1994) y aneuploidías en espermatozoides de humano (Padungtod *et al.*, 1999).

Ometoato (folimat)

Es un insecticida organofosforado usado ampliamente en países en desarrollo, presenta componentes poco degradables en el ambiente o por tratamientos del suelo (Cheng *et al.* 2002). En procesos de biorremediación se comprueba su toxicidad en especies de *Aspergillus* en altas concentraciones aún cuando éstos tienen una capacidad alta de biodegradación, a concentraciones no tóxicas se logró remover este plaguicida mediante el metabolismo de varios de estos organismos (Meng *et al.*, 2004).

Metil paratión (folidol)

Es un plaguicida organofosforado muy persistente en el suelo y la vegetación, se utiliza ampliamente en la agricultura mexicana (Cortés-Eslava *et al.* 2001), aunque en los Estados Unidos de América, su uso está restringido (Wagner *et al.*, 2003). Es altamente tóxico en mamíferos e insectos, después de ser convertido a metil paraoxón (MePO) a través de la desulfuración realizada por las CYP. Esta reacción de oxidación se lleva a cabo en el hígado y en tejidos extrahepáticos incluyendo el cerebro. El MePO se une estrechamente al grupo hidroxilo del residuo ²³⁰Ser presente en la acetilcolinesterasa, su inhibición da como resultado la acumulación de acetilcolina (Ach), el neurotransmisor que actúa en la sinapsis colinérgica y en las

uniones neuroefectoras en el sistema nervioso central y periférico. La acumulación de Ach, es responsable de estimulación colinérgica excesiva y resulta en toxicidad aguda tanto en mamíferos como en insectos (Albores *et al.*, 2001). En estudios anteriores realizados por Brusick *et al.* (1980) el metil paratión no ha causado mutagénesis en *E. coli* y *S. typhimurium*, sin embargo provoca daño clastogénico en meristemas de raíz de *Allium cepa*, *Vicia faba* y *Gossypium barbadense* (Singh *et al.*, 1970; Ranvidran, 1971; Amer y Farah, 1974).

Metil Azinfos (gusatión)

El metil azinfos [ácido fosforoditioico, S-(3,4-dihidro-4-oxobenzó 1,2,3- *dx*-triazin-3-ilmetil) O,O-dimetil fosforoditioato] no es sistémico, es ampliamente utilizado para el control de gran variedad de insectos en cultivos, en plantas ornamentales, bosques, etc., se encuentra en el séptimo lugar de los plaguicidas más empleados en los EUA en 1997 (USEPA, 1998). En Argentina ha sido reportado como el principal plaguicida aplicado en la producción de frutas en la región del Valle del Río Negro y en los ríos de Neuquén, al norte de la Patagonia (Flocco *et al.*, 2004). Es uno de los plaguicidas organofosforados que resulta más tóxico para organismos como insectos benéficos, aves, pequeños mamíferos, peces, invertebrados acuáticos y el hombre (USEPA, 1998). La combinación de estos efectos tóxicos y su gran uso ha incrementado la amenaza a la vida silvestre y a la salud humana (Flocco *et al.*, 2004).

Tamarón (metamidofos)

Es un organofosforado comercializado como monitor o tamarón (O,S,-dimetil fosforamidotiolato), su acción insecticida tiene amplio uso en cultivos como algodón, col, tabaco, remolacha de azúcar, lechuga, papa y árboles frutales (Khasawinah *et al.*, 1979; WHO, 1993). La actividad anticolinesterasa del metamidofos induce un decremento de dicha enzima en el plasma de ratones (Zayed *et al.*, 1984), la

inhibición de la colinesterasa en sangre puede ser usada como un índice adecuado de exposición (BurrueI *et al.*, 2000). Además de sus efectos anticolinérgicos, es conocido por provocar el "retraso de polineuropatías inducidas por organofosforados" en animales experimentales (Khasawinah *et al.*, 1979; WHO, 1993). La exposición prenatal a tamaron[®] en ratas Wistar resulta en un decremento significativo de los receptores colinérgicos, los cuales regresan a la normalidad entre las 3-4 semanas de edad (Dvergsten y Meeker, 1994). Los OF afectan el desarrollo celular al alterar la actividad y la reactividad de la adenilato ciclasa que forma parte de la cascada de señalización celular y que no está restringida a blancos colinérgicos o tejidos neurales (Song *et al.*, 1997). Asimismo tiene la capacidad para inducir cambios genéticos en células espermatogénicas transmitiéndose los efectos en los hijos de padres expuestos a este OF (BurrueI *et al.*, 2000).

OBJETIVOS:

- ✧ Evaluar la posible actividad mutagénica directa de los insecticidas organofosforados: ometoato (folimat), paratión metílico (folidol), metil azinfos (gusatión) y metamidofos (tamaron) en las cepas TA98 y TA100, de *Salmonella typhimurium*.
- ✧ Analizar la capacidad de las células de cilantro (*Coriandrum sativum*) como sistema activador de los insecticidas organofosforados: ometoato (folimat), paratión metílico (folidol), metil azinfos(gusatión) y metamidofos (tamarón) de inducción de mutaciones revertantes en las cepas TA98 y TA100, de *Salmonella typhimurium*.

HIPÓTESIS

Como los insecticidas organofosforados ometoato (folimat), paratión metílico (folidol), metil azinfos (gusatión) y metamidofos (tamarón) causan daño genotóxico indirecto, se espera que éstos sean promutágenos activados por sistemas vegetales y que por lo tanto se exprese como mutación revertante, al emplear las células de cilantro (*Coriandrum sativum*) en suspensión como sistema metabolizador y como indicador del daño genético las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium* a través del ensayo de cocultivo célula vegetal/microorganismo. Asimismo los mecanismos moleculares de la mutación involucrados son corrimiento del marco de lectura y sustitución de pares de bases.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayo de Ames

El valor del ensayo de mutagenicidad de Ames en *Salmonella typhimurium* ha sido claramente confirmado como una prueba enfocada hacia la detección de mutágenos y carcinógenos potenciales. Desde mediados de los setenta éste ensayo es usado rutinariamente a manera de tamiz para la predicción de carcinógenos en animales (Flückiger-Isler, 2004). Es aceptado ampliamente como un estudio de corto término en bacterias para identificar sustancias capaces de producir daño genético que puede conducir a mutaciones en los genes. Esta prueba utiliza varias cepas de *Salmonella* con mutaciones previas que dejan a la bacteria sin la posibilidad de sintetizar el aminoácido histidina, por lo tanto, no crece ni forma colonias en su ausencia. Nuevas mutaciones en el sitio de las preexistentes o cerca de estos genes puede restaurar nuevamente su función de síntesis de histidina en las células. Así estos nuevos mutantes pueden crecer en ausencia de histidina y formar colonias. Por esta razón, la prueba es frecuentemente referida como el "ensayo de reversión" (Mortelmans y Zeiger, 2000).

Las cepas usadas en la prueba de *Salmonella*, presentan diferentes mutaciones en varios genes dentro del operón de histidina, cada una de estas ha sido diseñada para responder a mutágenos que actúan por medio de diferentes mecanismos, para este estudio se manejaron la cepa TA100 que responde a agentes que causan sustitución de pares de bases y la cepa TA98 a los que provocan corrimiento del marco de lectura (Maron y Ames, 1983). De forma complementaria, son aún más sensibles, debido a mutaciones adicionales para responder a una amplia variedad de sustancias, entre las cuales se encuentran (Mortelmans y Zeiger, 2000):

- ✧ Una deleción en los genes *uvrB*-bio, que elimina el mecanismo de reparación por escisión, permitiendo mayor número de lesiones en el ADN al llevarse a cabo la reparación "propensa al error" en éste, además hay deleción del gen de biotina por lo que no puede sintetizar este aminoácido por sí misma.

- ✧ Una mutación *rfa* que conduce a una pared celular de lipopolisacaridos defectuosa que cubre la superficie de la bacteria, que la hace más permeable a agentes químicos voluminosos que normalmente no penetran en la pared celular normal.

- ✧ La introducción del plásmido pKM101 promueve la mutagénesis causada por agentes químicos y por UV, además de contener el factor R que confiere a la bacteria resistencia a ampicilina siendo este un marcador conveniente para detectar la presencia del plásmido.

Uno de los bioensayos de corto término análogo al sistema de activación por microsomas en mamíferos (prueba de Ames) usado para evaluar la potencia mutagénica de agentes químicos fue desarrollado para analizar la activación de promutágenos por sistemas vegetales y es conocido como el ensayo de coincubación célula vegetal/microorganismo, siendo un método muy sensible (Plewa *et al.*, 1983) cuando se usan células de tabaco (*Nicotiana tabacum*) algodón (*Gossypium hirsutum*), zanahoria (*Daucus carota*), maíz (*Zea mays*) o hierba del pollo (*Trasdescantia paludosa*) (Plewa *et al.*, 1989) coincubadas con un organismo que indique el efecto genético (Cortés-Eslava *et al.*, 2001), como *Salmonella typhimurium*.

4-nitro-*o*-fenilenediamina (NOP)

Es una amina aromática monocíclica derivada de la anilina y sirve como modelo para el estudio de la activación de anilinas por sistemas enzimáticos de plantas (Gentile *et al.* 1985), ya que estos compuestos son productos de degradación de muchos plaguicidas (Lamoreux y Frear 1979). Se ha descrito que la NOP es genotóxica en la prueba de letales recesivos ligados al sexo en *Drosophila* y en la recombinación mitótica de levaduras (Natarajan y Obe 1986). También induce aberraciones cromosómicas en células de mamífero en cultivo (Perry y Searle 1977). Es usado en tintes para piel, formulaciones de colorantes para el cabello, no es carcinógeno y en estudios realizados en células de médula ósea de ratón *in vivo* en el ensayo de micronúcleos no es positivo en los animales tratados (Soler-Niedziela *et al.*, 1991), no obstante se tienen pruebas positivas en ensayos de corto término de genotoxicidad *in vitro*. La NOP se conoce por ser un mutágeno directo, cuyo efecto mutagénico puede ser potenciado bajo condiciones del metabolismo vegetal (Gentile *et al.*, 1985, 1986).

Preparación de bacterias

Las cepas de prueba se mantienen a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. De éstas, se inocula en medio líquido nutritivo Oxoid No. 2, en agitación constante (125 rpm) y a temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su proliferación (16 horas). De este cultivo se siembran en cajas de Petri con medio el cual contiene histidina/biotina para obtener placas patrón.

Para corroborar que las bacterias, tengan las mutaciones preexistentes requeridas, es necesario comprobar si dichas características continúan presentes en las placas patrón. Para esto se realiza la verificación por separado de: 1) el plásmido de resistencia a ampicilina que se realiza a partir del cultivo líquido de bacterias de 16 horas (cultivo de toda la noche), con la ayuda de un asa se forman estrías paralelas en cajas de Petri, que previamente han sido adicionadas con ampicilina, 2) La mutación *rfa*, para la cual, el cultivo de toda la noche (16 horas) se centrifuga a 6500 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

durante 10 minutos, el botón celular se resuspende en 10 ml de amortiguador de fosfato de potasio 10 mM con 7.4 de pH, se siembra 250 μ l de éstas en agar de superficie que contiene histidina/biotina y se procede al vaciado en la caja, una vez solidificado el medio se le coloca un círculo de papel filtro, al que se le agrega cristal violeta 0.1% (20 μ L). Para ambas pruebas las cajas se incuban por 48 horas. La resistencia a ampicilina se observa cuando hay crecimiento donde se realizaron las estrías y la presencia de la mutación *rfa* provoca un halo de inhibición de crecimiento hasta donde alcanzó a difundir el colorante.

Ensayo de mutagenicidad

A partir de la caja patrón se toma una porción de la colonia y se coloca en medio líquido nutritivo Oxoid No. 2, durante 16 horas en agitación constante (125 rpm) a 37 °C. A continuación, las bacterias se centrifugan a 6500 rpm, a 4 °C, durante 10 min. El botón celular se resuspende en amortiguador de fosfato de potasio 10 mM con un pH= 7.4. Las células bacterianas se mantienen en hielo hasta su uso.

En frascos para cocultivo de 8 mL, estériles se adicionan 2.25 mL de amortiguador de fosfato con pH= 7.4, las diferentes concentraciones del insecticida y finalmente 250 μ L de la bacteria y posteriormente se incuban por 90 minutos a 28 °C en agitación constante a 125 rpm en oscuridad.

Una vez incubado, en tubos de ensaye con 2 mL de agar de superficie a 45 °C, se agregan 250 μ L de cada uno de los frascos de cocultivo se agita en vórtex y se distribuye en cajas de Petri que contienen medio mínimo. Se realiza un triplicado por cada frasco. Se mantienen en incubación por 48 horas a 37 °C . Todo el ensayo se efectúa en oscuridad con el fin de evitar que los compuestos fotosensibles tengan algún cambio. El conteo de colonias se realiza, sin conocer los tratamientos debido a la utilización de claves desconocidas para el observador.

En cada ensayo de mutagenicidad directa se incluyen: el testigo de reversión espontánea (testigo negativo) que para la cepa TA98 se encuentra en el intervalo de 20-50 colonias y para la TA100 en el intervalo de 100-200, como valores estándar para éstas cepas (Mortelmans y Zeiger, 2000), este testigo contiene 2.25 mL de amortiguador de fosfato de potasio 10 mM pH= 7.4 y 250 µL de la bacteria; el testigo positivo de mutagenicidad que contiene 2.25 mL de amortiguador de fosfato de potasio 10 mM pH= 7.4, 100 µg de NOP y 250 µL de la bacteria. En este caso se utilizó el DMSO como disolvente para los plaguicidas, por lo cual se incluye el testigo con 2.25 mL de amortiguador, 100 µL de DMSO, 250 µL de la bacteria con lo que se descarta una posible mutagenicidad inducida por dicho compuesto. Los ensayos se efectúan con las cepas TA98 y TA100.

Ensayo de activación metabólica

Preparación de células vegetales de *Coriandrum sativum*

A partir de callos de *Coriandrum sativum* en medio sólido (MX) a 37 °C y protegidos de la luz, se aíslan 3 g para ser sembrados en medio cultivo líquido (MX), por cada 10 mL, manteniendo los matraces protegidos de la luz y en agitación constante 125 rpm a 37 °C durante 7 días. Este cultivo se mantiene en hielo hasta su uso.

En frascos para cocultivo de 8 mL, estériles se adicionan 2.25 mL de células vegetales, las diferentes concentraciones de cada insecticida y 250 µL de bacterias. Se incuba por 90 minutos a 28 °C, en agitación constante a 125 rpm y en la oscuridad. Continuando con el sembrado en cajas de la forma descrita arriba .

En el ensayo de activación metabólica se incluyen; el testigo negativo que contiene 2.25 mL de células vegetales y 250 μ L de la bacteria y el testigo de activación vegetal con 2.25 mL de células vegetales, 100 μ g de NOP y 250 μ L de la bacteria. Los ensayos se efectúan con las cepas TA98 y TA100.

Contenido de Proteínas y determinación de la tasa de reacción peroxidasa

Su cuantificación se realizó después de cada ensayo de cocultivo 90 minutos, para la suspensión de células vegetales y para los tratamientos con la presencia de los diferentes plaguicidas en concentraciones de 10 y 500 μ L por frasco de cocultivo. El contenido de proteínas fue obtenido por el método de Bradford (1976), para lo cual se realizó la curva estándar con albúmina bovina sérica. Asimismo, se analizó la actividad peroxidasa por 5 minutos cada minuto. Se incluyó el dietilditiocarbamato (DEDTC) como testigo ya que es un inhibidor de ésta actividad (Gichner *et al.*, 1994).

La actividad peroxidasa fue determinada como sigue:

$$\text{Tasa de reacción peroxidasa} = \frac{\left(\left(\frac{A_{470}}{\epsilon_{470} \times l} \right) (v) / P \right)}{t_{\text{min}}}$$

Donde A_{470} es la absorbencia a 470 nm, ϵ_{470} es el coeficiente de extinción del tetraguayacol ($26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), l es el ancho de la cubeta en centímetros y v es el volumen de la reacción en litros, p es el contenido de proteína en μ g y t_{min} es el tiempo en minutos (Gichner *et al.*, 1994).

RESULTADOS

Los datos obtenidos se muestran en las tablas 1 a 3 y corresponden a dos experimentos, el análisis estadístico se realizó con el paquete INSTAT, se presentan el promedio, el error estándar, y los datos del análisis de varianza y de Neuman-Keuls para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo. Las tablas 1 y 2 muestran la reversión espontánea de los testigos de mutagénesis directa y con activación metabólica, así como los resultados obtenidos de manera directa y en presencia de las células vegetales. Asimismo se pueden ver las concentraciones crecientes de cada uno de los insecticidas por frasco de cocultivo, cabe señalar que éstas son el resultado de curvas de toxicidad, evitando así dosis muy elevadas y por ende citotóxicas. Por otro lado, es importante hacer referencia a que dichos plaguicidas fueron disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO) una vez que se comprueba que no tienen solubilidad en agua, por lo tanto se incluyeron testigos con dicho compuesto con el fin de corroborar su actividad mutagenica nula como se ha reportado. El criterio utilizado de inducción mutagénica es que se rebase al menos el doble de revertantes espontáneos ($\text{factor} > 2$) y un efecto dosis-respuesta (Aßmann *et al.*, 1997). En ambas cepas las frecuencias de reversión espontánea en los testigos negativos estuvo dentro de los valores esperados (Maron y Ames, 1983). En la figura 1 se muestra la reversión de la cepa TA98.

En el testigo positivo para la cepa TA98 de mutagenicidad (NOP) sin activación metabólica, el aumento de colonias es significativo al compararlo con el testigo de reversión espontánea indicando su mutagénesis directa. El testigo positivo con activación que incluye la suspensión de células vegetales y la NOP, presenta gran aumento de colonias revertantes comparándolo con el testigo de reversión y el testigo directo de la NOP, corroborando así la capacidad metabólica de las células de cilantro para potenciar su actividad mutagénica (Fig. 2). El testigo de mutagenicidad

directa (NOP) en la cepa TA100 presenta un número mayor de colonias revertantes que el descrito para el testigo de reversión con diferencias significativas. El testigo de activación al compararse con los testigos anteriores es significativamente mayor (Tabla 1)

En la tabla 1 también se muestran los resultados de los organofosforados con la cepa TA98. El ometoato provoca incremento significativo en las colonias revertantes, en la aplicación directa y con células vegetales en las concentraciones de 10 μg a 100 μg por frasco de cocultivo al compararse con el testigo de reversión espontánea, el comportamiento de los tratamientos (sin activación y con activación) fue la disminución de colonias revertantes conforme aumenta la concentración, hasta que en concentraciones de 750 μg y 1000 μg por frasco de cocultivo no hay crecimiento de colonias. Por otro lado, el metil paratión en las concentraciones de 10 μg a 250 μg presentan promedios similares con y sin activación metabólica a la reversión espontánea. En las concentraciones de 500 μg a 1000 μg se observa que, por un lado sin activación metabólica hay decremento drástico en el número de revertantes, mientras que con activación metabólica el descenso ocurre gradualmente hasta que en 1000 μg por frasco de cocultivo no se observa crecimiento bacteriano.

En el caso del metil azinfos cepa TA98 se nota la inhibición total del crecimiento bacteriano sin activación vegetal en todas las concentraciones evaluadas, mientras que en presencia del metabolismo se encuentran colonias revertantes en la concentración de 10 μg por frasco de cocultivo mostrando un promedio parecido a la reversión espontánea, después de ésta se observa la disminución gradual hasta que en la concentración de 1000 μg por frasco se evidencia el mismo comportamiento que en los tratamientos directos.

Con el insecticida metamidofos en las concentraciones de 10 a 500 $\mu\text{g}/\text{frasco}$ de cocultivo el promedio de revertantes es similar a la reversión espontánea, aun cuando se incrementan las concentraciones, sin embargo en 750 y 1000 $\mu\text{g}/\text{frasco}$ de cocultivo no hay colonias revertantes. Cuando se agregan las células vegetales se observa un comportamiento semejante, no hay una respuesta de aumento o disminución de colonias en las concentraciones de 10 a 500 μg , por frasco de cocultivo y en 750 y 1000 $\mu\text{g}/\text{frasco}$ de cocultivo el descenso número de colonias es drástico hasta su total desaparición.

En la tabla 2, se muestran los resultados de la evaluación de los insecticidas organofosforados en la cepa TA100. El ometoato presentó un comportamiento similar aplicado de forma directa y con la presencia de células vegetales en las concentraciones de 10 a 100 $\mu\text{g}/\text{frasco}$ de cocultivo con valores semejantes a la reversión espontánea, la disminución de colonias revertantes ocurre a partir de 250 μg y la ausencia total de éstas de 500 a 1000 $\mu\text{g}/\text{frasco}$ de cocultivo. En el caso del paratión metílico aplicado directamente se nota que para las concentraciones de 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{frasco}$ de cocultivo el número de colonias revertantes es parecido al espontáneo, continuando con su disminución a partir 250 $\mu\text{g}/\text{frasco}$ de cocultivo y en concentraciones por arriba de ésta no hay crecimiento. En presencia de células de cilantro, no hay diferencia en las concentraciones desde 10 a 100 $\mu\text{g}/\text{frasco}$ de cocultivo con respecto a la cantidad de revertantes espontáneos, mientras que de 250 a 750 $\mu\text{g}/\text{frasco}$ de cocultivo se observa la disminución gradual de las colonias revertantes y en 1000 μg no hay crecimiento de colonias.

Cuando la cantidad de colonias de ambas cepas de *Salmonella* disminuyó a valores menores al de los testigos negativos y antes de que se suprimiera totalmente su crecimiento, se observó un fondo muy abundante, que denota la toxicidad (Figs. 3 y 4), lo que contrasta con un desarrollo normal como se evidencia en la figura 5.

En el metil azinfos, sin células vegetales se evidencia que el crecimiento de colonias revertantes es menor a la reversión espontánea desde la concentración de 10 μg , reduciéndose ésta cantidad excesivamente en 50 y 100 μg / frasco de cocultivo, posterior a éstas se nota la ausencia de colonias. Cuando es cocultivado con las células de cilantro el número de revertantes en 10 μg es similar al valor basal, siguiendo su disminución en 50, 100, 250 μg , hasta que en 500 μg /frasco de cocultivo ya no se encuentra crecimiento. Para el metamidofos con y sin metabolismo vegetal exhiben un comportamiento similar a la reversión espontánea, de 10 a 100 μg /frasco de cocultivo, en 250 y 500 μg se muestra un efecto de disminución conforme aumenta la dosis, hasta que en 750 y 1000 μg /frasco de cocultivo se suprime el crecimiento de colonias revertantes (Fig. 6).

La tabla 3 presenta el contenido de proteínas y la actividad peroxidasa después de la realización del cocultivo. Los testigos tienen el comportamiento esperado, las células vegetales presentan el mayor contenido de proteínas y de actividad peroxidasa, mostrándose su inhibición con el dietilditiocarbamato con una menor cantidad de proteínas y de la actividad enzimática. La NOP no inhibe la actividad peroxidasa ni el contenido de proteínas. Los plaguicidas ometoato, metil paratión, gusation y metamidofos en la concentración de 10 μg /frasco de cocultivo presentan la mayor cantidad de proteínas y de actividad peroxidasa y se encuentran en el orden siguiente: ometoato, seguido por metamidofos, metil paration y gusación. En la concentración de 500 μg /frasco de cocultivo se observa una disminución considerable del contenido de proteínas y la actividad peroxidasa en todos los plaguicidas incluso, su inhibición casi por completo como ocurre con el gusación.

DISCUSIÓN

El conocer los mecanismos por los cuales ocurre daño genotóxico en el ADN por exposición a plaguicidas es esencial para evaluar el riesgo a la salud y tomar decisiones sobre la seguridad de su uso (Bucheli y Fent 1995; Castro *et al.*, 1999), ya que dichos eventos son el factor principal para considerar los efectos de la carcinogénesis y la toxicología reproductora. Muchos de los plaguicidas han sido investigados en una amplia variedad de ensayos de mutagenicidad involucrando mutaciones en los genes, alteraciones cromosómicas y daño directo al ADN (Bolognesi y Morasso *et al.*, 2000). Los resultados de monitoreos biológicos o métodos citogenéticos para la detección de riesgos a la salud por el uso de plaguicidas han dado lugar a resultados tanto positivos como negativos de mutagenicidad (Ündeger y Basaran, 2002).

Se ha establecido que la anilina **NOP** (4- nitro- *o* - fenilendiamina) presenta actividad mutagénica directa en ensayos con *Salmonella typhimurium* (Gentile *et al.*, 1985; Cortés-Eslava *et al.*, 2001), corroborándose en este trabajo esta característica en ambas cepas, mientras que los plaguicidas ometoato, paratión metílico y metamidofos no lo inducen, por otro lado se expresa una enorme toxicidad. La disminución de colonias conforme aumenta la concentración indica la probable muerte por toxicidad, que se corroboró con la realización de observaciones del crecimiento de fondo o “background” al microscopio óptico (objetivo 10x), demostrándose la reducción en su cantidad y su ausencia a concentraciones iguales o mayores a 500 µg por frasco de cocultivo, con lo que se confirma el evento de toxicidad. Este comportamiento concuerda con las propiedades perjudiciales de los organofosforados por ejemplo, Cortés- Eslava *et al.* (2001) encuentran que el metil paratión en la prueba de cocultivo célula vegetal/microorganismo con la cepa TA98 de *Salmonella* es tóxico de manera directa a partir de los 45 µg por frasco de incubación. En el ensayo de *Salmonella* en tratamientos directos no es mutagénico para la cepa YG1024 (Wagner *et al.*, 2003).

Las plantas tienen diversos paquetes enzimáticos con funciones múltiples; una de ellas es la desintoxicación de compuestos, trabajo continuo que evita el daño al ADN ocasionado por los compuestos tanto endógenos como exógenos, sin embargo los productos biotransformados no tienen forma de ser eliminados por un órgano excretor como en los animales, específicamente los mamíferos, por lo que simplemente son almacenados e inmovilizados en diferentes componentes de la planta, desconociéndose su toxicidad en ellas, así el estudio del metabolismo en los vegetales ha dado lugar a dos vertientes para su análisis. Por un lado, esta capacidad se ha utilizado en los procesos de biorremediación logrando disminuir la toxicidad de los compuestos además de atraparlos reduciendo así su cantidad en el ambiente, esta acción no es exclusiva de los organismos utilizados para dicho proceso, lo que involucra a la mayoría de los sistemas vegetales, incluyendo las que son para consumo, por lo que hay un riesgo de liberación de estos metabolitos, causando daño a los consumidores secundarios incluyendo el hombre, por lo que es indispensable la realización de pruebas de genotoxicidad y mutagenicidad de los plaguicidas y otros agentes químicos utilizados durante la agricultura ya que puede darse un comportamiento sinérgico entre todos éstos potenciando su capacidad mutagénica.

Mientras que con los insecticidas organofosforados en la cepa TA98 únicamente en el caso del ometoato se observan diferencias significativas con relación al testigo negativo, en los tratamientos sin y con la participación del metabolismo de las células de cilantro. Sin embargo no se nota incremento de la frecuencia de mutación revertante al aumentar la concentración ya que a partir de 250 µg las frecuencias disminuyen hasta abatirse completamente (Tabla 1), además de que no rebasan el doble del testigo de reversión espontánea (Aßmann *et al.*, 1997). En el caso del metil paratión, metil azinfos y metamidofos no hubo incremento significativo de las colonias revertantes, sin y con activación, siendo el caso más drástico el del metil azinfos sin el metabolismo, donde el crecimiento fue nulificado completamente por la acción tóxica de este compuesto (Tabla 1).

Aplicados a las mismas concentraciones estos insecticidas en la cepa TA100 de *Salmonella typhimurium* no incrementaron la frecuencia de revertantes, evidenciándose nuevamente la mayor toxicidad del metil azinfos (Tabla 2).

Es importante resaltar el hecho de que la similitud en las frecuencias encontradas entre los experimentos sin y con activación metabólica en ambas cepas de *Salmonella*, posiblemente son debidos a que todos ellos produjeron disminución de la actividad peroxidasa (Tabla 3), lo cual implica que estos compuestos tienen efecto citotóxico ya que están provocando la muerte de las células de cilantro, estos resultados coinciden con los obtenidos por Calderón-Segura (1998) quien describe el efecto fitotóxico del herbicida tiocarbámico butilate en *Vicia faba*, lo que ocasiona que al morir las células de la planta se evite el metabolismo de dicho compuesto.

Asimismo, se ha mencionado que algunos agentes además de afectar la frecuencia de reversión, también pueden disminuir la viabilidad de las células vegetales en cultivo (Plewa *et al.*, 1993). En el presente trabajo la amina aromática NOP no provoca alteraciones en la viabilidad de las células vegetales ni tampoco de *Salmonella*, por lo que permite que las células de cilantro transformen eficientemente el compuesto observándose así su actividad promutágena; pero, cuando se realizan los tratamientos con los plaguicidas, la toxicidad provocada por estos compuestos no permite la actividad metabólica, la cual se ve reflejada en la baja cantidad de proteínas y en la disminución de la actividad peroxidasa. Sin embargo en muchos de los estudios donde se muestra la genotoxicidad, la presencia metabolismo es esencial para potenciarla, por ejemplo el metil paration es transformado a metil paraoxon por medio de las enzimas del citocromo P450 en mamíferos e insectos (Albores *et al.*, 2001) además, en la prueba de Ames se obtienen metabolitos mutagénicos en *Salmonella* cepa YG1024 con la fracción S9 de mamíferos (Wagner *et al.*, 2003).

Como se observa en este trabajo el metil azinfos presenta alta toxicidad la que es débilmente suprimida por la presencia del metabolismo vegetal, sin embargo la baja capacidad metabólica esta posiblemente relacionada con la disminución tan drástica de la actividad peroxidasa causada por este insecticida, cuya inhibición es aun mayor que la provocada por el DEDTC que se ha descrito como un eficiente supresor de dichas enzimas (Gichner *et al.*, 1991). Con otros sistemas de prueba se ha demostrado que el metabolismo vegetal, es una condición para obtener un comportamiento promutagénico, así por ejemplo las células vegetales de tabaco tienen alta actividad peroxidasa (Chiapella *et al.*, 1997) y pueden activar arilaminas en productos mutagénicos además se ha demostrado su capacidad para activar a este plaguicida detectando las mutaciones en las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella* (Cortés-Eslava, 1993), en este trabajo esta actividad no se obtuvo debido a la muerte de las células de cilantro y por ende la baja cantidad de proteínas y peroxidasas que no fueron suficientes para que se llevara a cabo su posible activación.

El metil azinfos ha sido probado en ensayos de mutagenicidad en *Saccharomyces cerevisiae* dando resultados negativos en estudios realizados por Bianchi *et al.*, 1994, pero con la adición del diazinón presentó sinergia mutagénica. Asimismo fue positivo en la formación de aductos en presencia de S-9 por el método *in vitro* de pos-marcaje radioactivo con ^{32}P - (Shah *et al.*, 1997).

Con el metamidofos no hubo incremento significativo en ninguna de las cepas de *Salmonella*, notándose además que también hubo inhibición del metabolismo de las células de cilantro lo cual se relaciona con la inhibición de la actividad peroxidasa y disminución de la concentración de proteínas. En las concentraciones mayores del insecticida produjo la muerte de las bacterias. En otros trabajos la exposición a metamidofos está correlacionada con un incremento en el porcentaje de micronúcleos en células hematopoyéticas de ratón *in vivo* e *in vitro* (Amer y Sayed, 1987), provoca intercambio de cromátidas hermanas en células de médula ósea de ratón *in vivo* y cultivo de células de bazo *in vitro* (Amer y Sayed, 1987).

CONCLUSIONES

Los plaguicidas evaluados en este estudio, no provocan por sí mismos daño mutagénico debido a que son altamente tóxicos, causando muerte a las bacterias. Al evaluar su comportamiento promutágeno, mediante el ensayo de cocultivo célula vegetal/microorganismo se encontró que el metabolismo se ve afectado por el daño a las células vegetales provocado por los insecticidas, aunado a su baja actividad peroxidasa comparado con otros estudios donde se reporta mayor actividad enzimática, sin embargo las células vegetales disminuyen la toxicidad de los plaguicidas observándose colonias en las concentraciones más altas, sin embargo no se observa efecto mutagénico en los tratamientos.

Las enzimas involucradas en la activación definen la genotoxicidad de los productos finales en plantas, las peroxidasas son las más importantes en la activación de xenobióticos, y en este estudio su actividad fue menor a la reportada en estudios anteriores con células de cilantro aún así se obtuvo la mutagenicidad de la NOP, lo que indica que probablemente los insecticidas fueron muy tóxicos aún para las células vegetales.

REFERENCIAS

- Aßmann, N., Emmrich, M., Kampf, G. y Kaiser, M. (1997). Genotoxic activity of important mitrobenzenes and nitroanilines in the Ames test and their structure-activity relationship. *Mutat. Res.* 395: 139-144.
- Aguiar, L.H., Moraes, G.I., Marchioni, A., Eneas, A.A. y Ferro, C.C. (2004). Metabolical effects of Folidol 600 on the neotropical freshwater shmatrinxa, *Brycon cephalus* *Environ. Res.* 95: 224–230.
- Albores, A., Ortega-Mantilla, G., Sierra-Santoyo, A., Cebrián, M.E., Muñoz-Sánchez, J.L., Calderón-Salinas, J.V. y Manno, M. (2001). Cytochrome P450 2B (CYP2B)-mediated activation of methyl-parathion in rat brain extracts. *Toxicol. Lett.* 124: 1–10.
- Amer, S. y Farah, O. (1974). Cytological effects of pesticides. VI. Effect of insecticide 'rogor' on the mitosis of *Vicia faba* and *Gossypium barbadense*. *Cytologia* 39: 507–514.
- Amer, S.M. y Sayed, M.A. (1987). Cytogenetic effects of the insecticide methamidophos in mouse bone marrow and cultured mouse spleen cells. *Z. Naturforsch.* 42c: 21-30.
- Anilakumar, K.R., Nagaraj, N.S. y Santhanam, K. (2001). Effect of coriander seeds on hexacholocyclohexane induced lipid peroxidation in rat liver. *Nutrit. Res.* 21: 1455-1462.

- Behera, B.C. y Bhunya, S.P. (1989). Studies on the genotoxicity of asataf (acephate), an organophosphate insecticide, in a mammalian *in vivo* systems. *Mutat. Res.* 223: 287-293.
- Bianchi, L., Zannoli, A., Pizzala, R., Stivala, L.A. y Chiesara E. (1994). Genotoxicity assay of five pesticides and their mixtures in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 321: 203–211.
- Bolwell, G.P., Bozak, K.R. y Zimmerman, A. (1994). Plants cytochrome P-450. *Phytochemistry* 37: 1491-1506.
- Bolognesi, C. y Morasso, G. (2000). Genotoxicity of pesticides: potential risk for consumers. *Trends. Food Sci. Technol.* 11: 182-187.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein –dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brusick, D., Simmon, V., Rosenkranz, H., Ray, V. y Stafford, R. (1980). An evaluation of the *Escherichia coli* WP2 and WP2 uvr. A reverse mutation assay. *Mutat. Res.* 76: 169-190.
- Bucheli, T. y Fent, K. (1995). Induction of cytochrome P-450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Tech.* 25: 201-268.

- Buratti, M.F., Volpe, M.T., Meneguz, A., Vittozzi, L. y Testai, E. (2002). CYP-specific bioactivation of four organophosphothioate pesticides by human liver microsomes. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 186:143-154.
- Burrue, R.V., Raabe, G.O., Overstreet, W.J., Wilson, W.B. y Wiley, M.L. (2000). Paternal Effects from Methamidophos administration in mice. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 165:148-157.
- Calderon-Segura M. E. (1998) Evaluación del efecto genotóxico provocado por los herbicidas tiocarbámicos molinate y butilate en dos sistemas de prueba con la participación del metabolismo vegetal. Tesis de Doctorado. UNAM. 93p
- Castro, V., Silveira, M. y Perez, M. (1999). Application of clinical indicators of exposition in the evaluation of family agriculture health: the Sumaré case, Brazil. *Int. J. Sustainable Dev. World Ecol.* 6:172-184.
- Cheng, S.P., Vidakovic-Cifrek, Z., Grosse, W. (2002). Xenobiotics removal from polluted water by a multifunctional constructed wetland. *Chemosphere* 48: 415-41.
- Chapple, C., (1998). Molecular- genetic analysis of plant cytochrome P-450-dependent monooxygenases. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:311-343.
- Chiapella, C., Ysern, P., Rivera, J., Llagostera, M. (1995). A plant metabolic activation systems from *Persea americana* with cytochrome P450- dependent and peroxidase activities. *Mutat. Res.* 329:11-18.

- Chiapella, C., Moreno, J. A., Radovan, R. D., Gaubert, N., Llagostera, M. (1997). Activation of arylamines to mutagenic products by two in vitro plant systems. *Mutat. Res.* 394: 45–51.
- Chiapella, C., Radovan, R.D., Moreno, J.A., Casares, L., Barbé, J., Llagostera, M. (2000). Plant activation of aromatic amines mediated by cytochromes P450 and Flavin-containing monooxygenases. *Mutat. Res.* 470: 155-160.
- Chithra, V., Leelamma, S. (2000). *Coriandrum sativum*- effect on lipid metabolism in 1,2-dimethyl hydrazine induced colon cancer. *J. of Ethnopharmacol.* 71: 457-463.
- Cortés-Eslava, J. (1993). Evaluación del daño mutagenico provocado por los insecticidas organofosforados foxim y metil azinfos en *Salmonella typhimurium* a través del metabolismo vegetal. Tesis de Maestria. UNAM. 70p.
- Cortés-Eslava, J., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R. y Espinosa-Aguirre, J.J. (2001). Metabolic activation of three arylamines and two organophosphorus insecticides by coriander (*Coriandrum sativum*) a common edible vegetable. *Toxicol. Lett.* 125: 39–49.
- Cortés-Eslava, J., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini R. y Espinosa-Aguirre J. J. (2004). Antimutagenicity of coriander (*Coriandrum sativum*) juice on the mutagenesis produced by plant metabolites of aromatic amines. *Toxicol. Lett.* 153: 283-292.

- Day, J., Gentile, G.J., Gentile, J.M., Plewa, M.J. (1989). Promutagen activation by photosynthetic and non photosynthetic plant cell cultures. *Environ. Mol. Mutagen.* 9: 28-35.
- Das, K. y Barone, S. (1999). Neuronal differentiation in PC12 cells is inhibited by chlorpyrifos and its metabolites: is acetylcholinesterase inhibition the site of action ? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 160: 217-230.
- Dhindsa, R. S. (1991). Drought stress enzymes of glutathione metabolism oxidation injury and protein synthesis in *Tortula ruralis*. *Plant Physiol.* 95: 648-651.
- Delaquis, P.J., Stanich, K., y Girard, B. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucaliptus essentials oils. *International Journal of Foodmicrobiol.* 74: 101-109.
- Dohn, D.R. y Krieger, R.I. (1981). Oxidative metabolism of foreign compounds by higher plants. *Drug metabol. Rev.* 12: 119-157.
- Durst, F. y Benveniste, I., (1993). Cytochrome P-450 in plants. *Hanbook Exp. Pharmacol.* 105: 293-310.
- Durst, F. y O´Keefe, D.P. (1995). Plants cytochrome P-450: an overview. *Drug Metabol. Interact.* 12: 171-187.
- Dvergsten, C. y Meeker, R. (1994). Muscarinic cholinergic receptor regulation and acetylcholinesterase inhibition in response to insecticide exposure during development. *Int. J. Devl. Neurosci.* 12: 73-75.

- Flocco, C.G., Carranza, M.P., Carvajal, L.G., Loewy, R.M., Pechen de D'Angelo, A.M. y Giulietti, A.M. (2004). Removal of azinphos methyl by alfalfa plants (*Medicago sativa* L.) in a soil-free system. *Sci. the Total Environment*. 327: 31–39.
- Flückiger-Isler, S., Baumeister, M., Braun, K., Gervais, V., Hasler-Nguyen, N., Reimann, R., Van Gompel, J., Wunderlich, H.-G. y Engelhardt, G. (2004). Assessment of the performance of the Ames IITM assay: a collaborative study with 19 coded compounds. *Mutat. Res.* 558: 181–197.
- Fonné-Pfister, R., Simon, A., Salaun, J.-P. y Durst, F. (1988). Xenobiotics metabolism in higher plants. Involvement of microsomal cytochrome P450 in aminopyrine N-demethylation. *Plant Sci.* 55: 9-20.
- Frear, D.S. y Swanson, H.S. (1970). Biosynthesis of S-4 (-ethylamino-6-isopropylamino-2-s-triazino) glutathione: partial purification and properties of a glutathione S-transferase from corn. *Phytochem.* 9: 2123-2132.
- Frear, D.S. (1995). Wheat microsomal cytochrome P-450 monooxygenases: characterization and importance in the metabolic detoxification and selectivity of wheat herbicides. *Drug metabol. Drug Interact.* 12: 329-357.
- Galal, E.E., Samaan, H.A., Nour El Dien, S. y Kamel, S. (1977). Studies on the acute and subchronic toxicities of some commonly used anticholinesterase insecticides in rats. *J. Drug Res. Egypt* 9: 1 - 17. En: *Environmental Toxicology and Pharmacology* 14 (2003) 91- 98.

- Gentile, J.M. Gentile, J.M., Townsed, 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, J.M. y Plewa, M.J. (1986). *In vitro* activation of chemicals by plants: a comparison of techniques. *Mutat. Res.* 188: 185-196.
- Gichner, T., Cabrera, L, G., Wagner, E.D. y Plewa, M.J. (1994). Induction of somatic mutation in *Tradescantia* clone 4430 by three phenylene isomers and the antimutagenic mechanisms of diethyldithiocarbamate and ammonium metavanadate. *Mutat. Res.* 306: 165-172.
- Gichner, T., Stavevra, D.A., Čeřovská, 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.
- Gichner, T., Stavevra, D.A. y Breusegem, F.A. (2001). *o*- Phenylenediamine-induced DNA damage and mutagenicity in tobacco seedlings is light-dependt. *Mutat. Res.* 495: 117-125.
- Goedkoop, M. (1995) Eco-indicator 95, weighing method for environmental effect that damage ecosystems or human health on a European scale, Final report, National Institute of Public Health and Environmental Protection (RIVM), Bilthoven, The Netherlands 85 p.

- Gray, A.M. y Flatt, P.R. (1999). Insulin- releasing and insulin-like activity of the traditional anti-diabetic plant *Coriandrum sativum* (Coriander). *Brit. J.Nutrit.* 81:203-209.
- Haib, J., Hofer I. y Jean-Marc, R. (2003). Analysis of multiple pesticide residues in tobacco using pressurized liquid extraction, automated solid-phase extraction clean-up and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatog.* 1020 A. 173-187.
- Hallahan, D.L. y West, J.M. (1995). Cytochrome P-450 in plants/ insects interactions: geraniol 10-hydroxylase and the biosynthesis of iridoid monoterpenoid. *Drug metabol. Drug Interact.*12: 369- 382.
- He, F., Chen, S., Tang, X., Gan, W., Tao, B y Wen, B. (2002). Biological monitoring of combined exposure to organophosphates and pyrethroids. *Toxicol. Lett.* 134: 119–124.
- Higashi, K. (1988). Metabolic activation of environmental chemicals by microsomal enzymes of higher plants. *Mutat. Res.* 197: 273-288.
- Hoet, P. (1996). General principles. En: *Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace*, vol. 1. World Health Organization, Ginebra. pp 1–19.
- Hu, J. y Kulkarni, A.P. (1998). Lipoxygenase-mediated demethylation of pesticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 61: 145-153.

- Jablonkai, I. y Hatzios, K. H. (1993). *In vitro* conjugation of cloroacetanilide herbicides and atrazine with thiols and contribution of nonenzymatic conjugation to their glutathione-mediated metabolism in corn. *J. Agric. Food Chem.* 41:1736-1742.
- Jayashree, I.V., Vijayalaxmi, K.K., y Rahmin, M.A. (1994). The genotoxicity of hinosan, an organophosphorous pesticide in the *in vivo* mouse. *Mutat. Res.* 322:77-85.
- Jouany, J.M. (1995). Etablissement d'une liste de substances phytosanitaires utilisées en agriculture à surveiller dans le bassin lémanique: Methodologie. *Rapp. Comm. Int. Prot. eaoux Léman contre Pollution, Campagne 1994*, 217-233.
- Khan, P.K. y Awasthy K.S (2003). Cytogenetic toxicity of neem. *Food Chem. Toxicol.* 41:1325-1328.
- Khasawinah, A.M.A., March, R.B., Fukuto, T.R. (1979). Insecticide properties, anticholinesterase activities and metabolism of methamidophos. *Pestic. Biochem. Physiol.* 9:211-221.
- Khatisashvili, G., Gordeziani, M., Kvesitade, G., Korte, F. (1997). Plant monooxygenases: Participation in xenobiotic oxidation. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 36:118-122.
- Kolluru, R., Bartell, S., Pitblado, R. y Stricoff, S. (1996). *Risk Assesment and Management Handbook for Enviromental, Health, and Safety Professionals.* McGraw-Hill, Inc., New York, USA.

- Kovach, J., Petzoldt, C., Degni, J., Tette, J. (1992). A method to measure the environmental of pesticides. New York's Food life Sciences Bulletin, pp 139.
- Krieger, R. (2001). Handbook of pesticide toxicology (Agents) Vol.2 Academic Press.
- Kulkarni, A.P. y Hodgson, E. (1980). Metabolism of insecticides by microsomal mixed function oxidase systems. Pharmacol. Thor. 8: 379.
- Kulkarni, A.P., Naidu, A.K. y Dauterman, W.C. (1993). Oxidative metabolism of insecticides, En: *Recent Advances in Insect Physiology and Toxicology* (Ed.) G.T Gujar. Capitulo 13, pp 303- 319, Agricole Publishing Acad., Nueva Delhi, India.
- Lamoreux, G.L. y Rusness, D.G. (1986). Xenobiotic conjugation in higher plants. En: *Xenobiotic conjugations chemistry*. Paulson G.D., Caldwell J., Hutson D.H. y Menn J.J (Eds.). ACS Symp. Ser. 229, American Chemical Society, Washington D.C. pp 102-105.
- Laukkanen, H., Häggman, H., Kontunen-Soppela, S. y Hohtola, A. (1999). Tissue browning of *in vitro* cultures of Scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. *Physiol. Plantarum*. 106: 337-343.
- Leonard, R.A. (1990). Movement of pesticides into surfaces waters. En: *Pesticides in the soil environment: Processes, Impacts, and Modelling-SSSA*. Book Series, No.2, Segoe Road, Madison, WI.

- 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.
- Margni, M., Rossier, D., Crettaz, P. y Jolliet, O. (2002). Life cycle impact assesment of pesticides on human health and ecosystems. *Agric. Ecosys. Environ.* 93: 379-392.
- Maron, D.M. y Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113: 173-215.
- Mathew, G. K., Vijayalaxmi, K.K., Rahiman, M.A. (1992). Methyl parathion-induced sperm shape abnormalities in mouse. *Mutat. Res.* 280: 169-173.
- Mehrtens, G. (1994). Haloperoxidase activity in arctic macroalgae. *Polar Biology* 14: 351-354.
- Meng, C, S. Chngchun, G. Y., Shi Xian'ai, C. y Jianfeng, Y.F. (2004). Study on characteristics of biocometabolic removal of omethoate by the *Aspergillus* spp. *Water Research* 38: 1139-1146.
- Moreland, D.E., Corbin, F.T. y McFarland, J.E. (1993). Effects of safeners on the oxidacion of multiples subtrates by grain sorghum microsomes. *Pestic. Biochem. Physiol.* 45: 43-53.
- Mortelmans, K. y Zeiger, E. (2000). The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* 455: 29-60.

- Moser, V. (1999). Comparison of aldicarb and methamidophos neurotoxicity at different ages in the rat : behavioral and biochemical parameters. *Toxicol. Appl. pharmacol.* 157:94-106.
- Mutch, E., Blain, G. P. y Williams, F.M. (1999). The role of metabolism in determining susceptibility to parathion toxicity in man. *Toxicol. Lett.* 107:177-187.
- 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.
- Newman, A. (1995). Ranking pesticides by environmental impact. *Environ. Sci. Technol.* 29: 324-326.
- Niu, Y. y He, F. (2001). The registered pesticides in China in 1999. *Chin. J. Ind. Hyg. Occup. Dis.* 19:307-308.
- Oesch-Bartlomowicz, B. y Oesch, F. (2004). Modulation of mutagenicity by phosphorylation of mutagen-metabolizing enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 423:31-36.
- Ortega, C. J., Espinosa-Torres, F. y Lopez-Carrillo, L. (1994). El control de los riesgos para la salud generados por los plaguicidas organofosforados en México: retos ante el tratado de libre comercio. *Salud Pública de México* 36: 624-632.
- Padungtod, C., Hassold, T.J., Ryan, L.M., Savitz, D.A., Christiani, D.C. y Xu, X. (1999). Sperm aneuploidy among Chinese pesticide factory workers: Scoring by the FISH method. *Am. J. Anat.* 99: 507-516.

- Perry P. y Searle C. (1977). Induction of sister chromatid exchange in Chinese hamster cells by the hair dye constitutes 2-nitro-o-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 bioassays *Mutat. Res.* 38:287-292
- Plewa, M.J. (1978). Activation of chemicals into mutagens by green plants a preliminary discussion. *Environ. Health Perspect.* 27:45 -50.
- Plewa, M.J. y Gentile, J.M. (1982). The activation of chemicals into mutagens by green plants. En: *Chemicals Mutagens: Principles and Methods for their Detection*, Hollaender, A. (Ed.) Vol 7. Plenum Press, Nueva York, pp 401-420.
- Plewa, M.J., Wagner, E.D., Gentile, G.J. y Gentile, J.M. (1984). An evaluation of the genotoxic properties of herbicides following plant and animal activation *Mutat. Res.* 136: 233-245.
- Plewa, M.J., Wagner, E.D., y Gentile, J.M. (1988). The plant cell/microbe coincubation assays for the detection of plant activated promutagens. *Environ. Mutagens.* 7:40-46.
- Plewa, M.J., Shannon, S.R. y Wagner, E.D. (1991). Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibing 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.* 27:93-113.

- Plewa, M.J., Gichner, T., Xin, H., Seo, K.Y., Smith, S.R. y Wagner, E.D. (1993). Biochemical and mutagenic characterization of plant-activated aromatic amines. *Environ. Toxicol. Chem.* 12: 1353–1363.
- Plewa, M.J., Wagner, E.D., Stavebra, D.A y Gichner, T. (1996). Plant activation and its role in environmental mutagenesis and antimutagenesis. *Mutat. Res.* 350: 163-171.
- Pflugmacher, S y Shöder, P. (1995). Glutathione S- transferasa in trees: inducibility by various organics xenobiotics. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 158: 71-73.
- Plugmacher, S., y Steinberg, C. E. W. (1998). Activity of phase I and phase II detoxication enzymes in aquatic macrophytes. *J. App. Botany* 71: 144-146.
- Pflugmacher, S y Sandermann, H. (1998a). Cytochrome P-450 monooxygenases for fatty acids and xenobiotics in marine macroalgae. *Plant Physiol.* 117: 123-128.
- Plugmacher, S., y Sandermann, H. (1998b). Taxonomic distribution of plant glucosyltransferases acting on xenobiotics. *Phytochem.* 49: 507-511.
- Pflugmacher, S., Wiencke, C. y Sandermann, H. (1999). Activity of Phase I and phase II detoxication enzymes in Antarctic and Arctic macroalgae. *Marine Environ. Res.* 48: 23-36.

- Ranvindran, P. (1971). Cytological effects of folidol. *Cytologia* 36: 504–508.
- Restrepo I. (1992). Los plaguicidas en México. Comisión Nacional de Derechos Humanos, 2ª ed. México, D.F. 296p.
- Riva, M.C., Lopez, D. y Fabian, L. (1998). Toxicity of organophosphorus pesticides in aquatic algae. *Boletín Intexter del Instituto de Investigación Textil y de Cooperación Industrial* 113: 25-29
- Rivière, J.L. y Cabanne, F. (1987). Animal and plant cytochrome P-450 systems. *Biochimie* 69: 743- 752.
- Robineau, T., Batard, Y., Nedelkina, S., Cabello-Hurtado, F., LeRet, M., Sorokine, O., Didierjean, L. y Werck-Reinchchart, D. (1988). The chemically inducible plant cytochrome P450 CYP76B1 actively metabolizes phenylureas and others xenobiotics. *Plant. Physiol.* 118: 1049-1056.
- Rojanapo, W. y Tepsuwan, A. (1992). Mutagenic and antimutagenic activities of some vegetables (in Thai). *Bull. Depart. Medical Ser.* 17: 461–469.
- Romero, M.I. (2003). Evaluación del daño al ADN en linfocitos humanos a través del ensayo de electroforesis unicelular alcalina provocado por el herbicida asulam activado metabólicamente por *Vicia faba*. Tesis Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Rueff, J., Chiapella, C., Chipman, J.K., Darroudi, F., Silva, I.D., Duverger-van Bogaert, M., Fonti, E., Glatt, H.R., Isern, P., Laires, A., Leonard, A., Llangostera, M., Mossesso, P., Natarajan, A.T., Palitti, F., Rodrigues, A.S.,

- Schinoppi, A., Turchi, G. y Werle- Schneider, G. (1996). Development and validation of alternative metabolic systems for mutagenicity testing in short-term assays. *Mutat. Res.* 353:151-176.
- Sams, C., Mason, H.J. y Rawbone, R. (2000). Evidence for the activation of organophosphate pesticides by cytochromes P450 3A4 and 2D6 in human liver microsomes *Toxicol. Lett.* 116:217-221.
- Sandermann, H., Diesperger, H., y Scheel, D. (1977). Metabolism of xenobiotics by plant cell cultures. In: W. Barz, E. Reinhard, y M.H. Zenk (Eds), *Plant tissue culture and its biotechnological application* (178-196 pp.) Berlin: Springer.
- Sandermann, H. (1982). Metabolism of environmental chemicals: a comparison of plant and liver enzyme systems En: *Environ.Mut. Carcinog. and plant biology* Klekowski, E.J. (Ed)., Vol. I, Praeger, Nueva York, pp 1-32.
- Sandermann, H. (1988). Mutagenis activation of xenobiotics by plant enzymes. *Mutat. Res.* 49:203-212.
- Sandermann, H., Schimt, R., Eckey, H., y Bauknecht, T. (1991). Plant biochemistry of xenobiotics: isolation and properties of soybeans *O*- and *N*-glucosyl and *O*- and *N*- malonyltransferases for chlorinated phenols and anilines. *Arch. Biochem. Bhiophys.* 278:341-350.
- Sandermann, H. (1992). Plant metabolism of xenobiotics. *Trends Biochem. Sci* 17: 82-84.

- Sandermann, H. (1994). Higher plant metabolism of xenobiotics: the 'green liver' concept. *Pharmacogenetics*. 4:225-241.
- Schöder, P., Lamoreaux, G.L., Rusness, D.G. y Rennenberg, H. (1990). Glutathione S-transferase in spruce needles. *Pestic. Biochem. Physiol.* 37:211-218.
- Seo, K., Riley, J., Cortez, D., Wagner, E.D. y Plewa, M.J. (1993). Characterization of stable high molecular weight mutagenic product(s) of plant-activated -phenylenediamine. *Mutat. Res.* 299:111-120.
- SEMARNAP-INE. (1999). ¿Por qué, para qué y cómo se evalúan los riesgos para la salud y el ambiente de los plaguicidas? Serie Plaguicidas No. 2
- Shah, R.G., Lagueux, J., Kapur, S., Levallois, P., Ayotte, P., Tremblay, M., Zee J. y Poirier, G.G. (1997). Determination of genotoxicity of the metabolites of the pesticides Guthion, Sencor, Lorox, Reglone, Daconil and Admire by ³²P-postlabeling *Mol. Cell. Biochem.* 169:177-184.
- Shalk, M., Batard, Y., Sever, A., Nedelkina, S., Durst, F. y Werck-Reinchart, D. (1997). Design of fluorescent substrates and potent inhibitors of CYP 73As P450s that catalyze 4-hydroxylation of cinnamic acid in higher plants. *Biochemistry* 36:15253-15261.
- Shimabukuro, R.H., Lamoureux, J.L. y Frear, F.S. (1981). Pesticide metabolism in plants: principles and mechanism En: *Biological degradation of pesticides*. Matsumura, F. (Ed). Plenum Press, Nueva York, pp 123-145.

- Schuler, M. (1996). Plants cytochrome P-450 monooxygenases. *Crit. Rev. Plant Sci.* 15: 235-284.
- Siedow, J.N. (1991). Plant lipoxygenase: Structure and function, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 145.
- Singh, B., Singh, R., Singh, Y. y Singh, J. (1970). Effect of insecticides on germination, early growth and cytogenetic behaviour of barley *Hordeum vulgare*. *Environ. Exp. Bot.* 19: 127-132.
- Soler-Niedziela, L., Shi, X., Nath, J. y Ong, T. (1991). Studies on three structurally related phenylenediamines with the mouse micronucleus assays systems. *Mutat. Res.* 259: 43-48.
- Song, X., Seidler, F., Saleh, J., Zhang, S., Padilla, S. y Sotkin, T. (1997). Cellular mechanisms for developmental toxicity of chlorpyrifos: targeting the adenyl cyclase signaling cascade. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145: 158-174.
- Sultatos, L.G. (1994). Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides. *J. Toxicol. Environ. Health.* 43: 271-289.
- Stavevra, D.A., Wagner, E.D., Plewa, M.J. y Gichner, T. (1997). Characterization of a macromolecular matrix isolated from tobacco suspension cell cultures and its role in the activation of promutagenic *m*-phenylenediamine. *Mutat. Res.* 379: 191-199.
- Sterling, T.M. (1994). Mechanisms of herbicide absorption across plant membranes and accumulation in plant cells. *Weed Sci.* 42: 263-276

- Tanabe, H., Yoshida, M. y Tomita, N. (2002). Comparison of the antioxidant activities of 22 commonly used herbs and spices on the lipid oxidation of pork meat. *Animals Sci. J.* 73: 389-393
- Thies, F., Backhaus, T., Bossmann, B. y Grimme, L.H. (1996). Xenobiotic biotransformation in unicellular green algae: Involvement of cytochrome P-450 in the activation and selectivity pyridazinone pro-herbicide metflurazon. *Plant Physiol.* 112: 361-370.
- Tijet, N., Helving, C., Pinot, F., Le, Bouquin R., Lesot, A., Durst, F., Salaun, J.P. y Benemiste, I. (1998). Functional expression in yeast and characterization of a clofibrate-inducible plant cytochrome P-450 (CYPP94A1) involved in cutin monomers synthesis. *Biochem. J.* 332: 583-589.
- Ündeger, U. y Basaran, N. (2002). Assessment of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures by the alkaline comet assays. *Arch. Toxicol.* 76: 430-436.
- USEPA. (1998). Public dockets on the organophosphate pesticides. Azinphos methy. Washington, DC: Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances.
- Velemiský, J. y Gichner, T. (1968). The mutagenesis activity of nitrosamines in *Arabidopsis thaliana*. *Mutat. Res.* 5: 429-431.
- Vilter, H., y Glombitza, K.W. (1983). Peroxidases from Phaeophyceae. I. Extraction and detection of the peroxidases. *Bot. Marina* 26: 331-340.

- Wagner, D.E., Marengo, S.M. y Plewa, M.J. (2003). Modulation of the mutagenicity of heterocyclic amines by organophosphate insecticides and their metabolites. *Genetic Toxicol. and Environ. Mutagen.* 536:103-115.
- Wangensteen, K., Samuelsen, A.B. y Malterud, K.E. (2004). Antioxidant activity in extracts from coriander. *Food Chem.* 88:293-297.
- Wetzel, A. y Sandermann, H. (1994). Plant biochemistry of xenobiotics: isolation and characterization of soybean *O*-glucosyltransferase of DDT metabolism. *Archives of Biochem. Biophys.* 314:328-339.
- Wichtl, M.W. (1994). *Herbal drugs and phytopharmaceuticals.* Stuttgart: Medpharm GmbH Scientific Publishers.
- Wyrobek, A.J. y Bruce, W.R. (1975). Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:4425-4429.
- Wyrobek, A. J., Gordon, L.A., Burkhart, J.G., Francis, M.W., Kapp, R.W., Letz, G., Malling, H.V., Topham, J.C. y Whorton, M.D. (1983). An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests tests in nonhuman mammals, A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 115:1-72.
- WHO. (1993). *Methamidophos Health and Safety Guide No. 79* World Health Organization, Ginebra.
- Ysern, P., Riera, J., Sitjes, J. y Llangostera, M. (1993). Activation of 4-nitro *-o*-phenylenediamine by the S2 fraction of *Zea mays* to mutagenic product (s) *Mutat. Res.* 312:25-31.

Yu, M-H. (2001). *Environmental Toxicology : Impacts of environmental Toxicants on Living Systems*. Lewis Publisher, CRC Press LLC, USA

Zayed, S.M.A.D. y Mahdi, F.W (1987). Methylation of guanine *in vivo* by the organophosphorus insecticide methamidophos. *Z. Naturforsch.* 42c: 17-20.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Tablas

Tabla 1. Mutagenicidad inducida por los insecticidas organofosforados: ometoato, metil paratión, metil azinfos y metamidofos aplicados directamente y metabolizados por cilantro (*Coriandrum sativum*) en *Salmonella typhimurium* cepa TA98.

Testigos	Revertantes por caja ^a	
	Sin Activación X ± E E	Con Activación X ± E E
Amortiguador	30.5 ± 1.8	
Amortiguador + NOP ^b		146* ± 6
Amortiguador + Cels. vegetales	30.8 ± 3.0	
<i>Coriandrum</i> + NOP		633* ± 29

Tratamientos µg/fco de cocultivo	Ometoato		Metil paratión		Metil azinfos		Metamidofos	
	sin activación	con activación	sin activación	con activación	sin activación	con activación	sin activación	con activación
10	57* ± 4	52* ± 5	31 ± 2	38 ± 5	0†	38 ± 6	42 ± 2	42 ± 4
50	53* ± 3	61* ± 7	31 ± 3	37 ± 5	0†	12† ± 4	44 ± 6	49 ± 2
100	54* ± 3	59* ± 7	28† ± 3	31 ± 4	0†	6† ± 2	38 ± 7	47 ± 1
250	46 ± 3	38 ± 5	26† ± 2	30 ± 2	0†	2† ± 1	37 ± 4	42 ± 9
500	35 ± 4	25† ± 2	6† ± 3	19† ± 4	0†	0†	27† ± 3	30 ± 3
750	0†	27† ± 3	0†	20† ± 4	0†	0†	0†	0†
1000	0†	0†	0†	0†	0†	0†	0†	0†

a Promedio de dos experimentos ± Error estándar

b 4,nitro- o - fenilendiamina Se obtuvieron diferencias significativas mediante el análisis de varianza para ometoato F= 9.23 P<0.0001. metil paratión F= 5.739 P<0.0001. metamidofos F= 2.66 p< 0.01. metil azinfos F=18.87 P<0.0001.

† Valores menores a las frecuencias del testigo negativo son provocados por toxicidad

Tabla 2. Mutagenicidad inducida por los insecticidas organofosforados: ometoato, metil paratión, metil azinfos y metamidofos aplicados directamente y metabolizados por cilantro (*Coriandrum sativum*) en *Salmonella typhimurium* cepa TA100.

Testigos	Revertantes por caja ^a	
	Sin Activación X ± E E	Con Activación X ± E E
Amortiguador	143 ± 4.0	
Amortiguador + NOP ^b		214* ± 6.0
Amortiguador + cels. vegetales	146 ± 5.0	
Coriandrum + NOP		311* ± 7.0

Tratamientos µg/fco de cocultivo	Ometoato		Metil paratión		Metil azinfos		Metamidofos	
	sin activación	con activación	Sin activación	con activación	sin activación	con activación	sin activación	con activación
10	135 ± 9	155 ± 15	139 ± 9	154 ± 11	114† ± 9	146 ± 10	150 ± 10	152 ± 10
50	136 ± 4	152 ± 10	151 ± 14	156 ± 9	85† ± 9	127 ± 8	124 ± 10	150 ± 3
100	126† ± 8	141 ± 7	125† ± 8	129 ± 7	4† ± 2	74† ± 11	132 ± 16	137 ± 6
250	99† ± 5	85† ± 8	105† ± 6	121† ± 4	0†	68† ± 10	127† ± 12	124† ± 8
500	0†	0†	0†	40† ± 10	0†	0†	70† ± 19	98† ± 13
750	0†	0†	0†	5† ± 2	0†	0†	0†	0†
1000	0†	0†	0†	0†	0†	0†	0†	0†

a Promedio de dos experimentos ± Error estándar b 4,nitro- o – fenilendiamina

Se obtuvieron diferencias significativas mediante el análisis de varianza para ometoato F= 52.49 P<0.0001. metil paratión F=41.04 P<0.0001 metamidofos F= 5.07 p< 0.0001 metil azinfos F=49.038 P<0.0001. † Valores menores a las frecuencias del testigo negativo son provocados por toxicidad

Tabla 3. Cantidad de proteínas y actividad peroxidasa de células en suspensión de cilantro *Coriandrum sativum* después del cocultivo.

	Contenido de proteínas a 10 µg	Porcentaje %	Actividad Peroxidasa a nm de tetraguayacol/min/µg de proteína	Porcentaje de inhibición %
Cels. Vegetales	28.3 ± 0.04	100	0.184 ± 0.005	0
NOP 100 µg	28.0 ± 0.02	98.9	0.182 ± 0.004	1.1
DEDTC^c 0.100 mM	6.2* ± 0.03	24.4	0.045* ± 0.001	76
Tratamiento				
Ometoato				
10	15.9* ± 0.02	64	0.152* ± 0.002	17
500	9.5* ± 0.03	40	0.082* ± 0.004	55
Metil paratión				
10	12.2* ± 0.02	51	0.125* ± 0.001	32
500	8.3* ± 0.01	35	0.046* ± 0.002	75
Gusatión				
10	11* ± 0.02	47	0.079* ± 0.004	57
500	0.23* ± 0.03	1	0.007* ± 0.003	96
Metamidofos				
10	14* ± 0.01	57	0.132* ± 0.002	28
500	10* ± 0.04	43	0.068* ± 0.003	63

a Promedio de dos experimentos ± Error estándar

b 4,nitro- o – fenilendiamina.

c dietilditiocarbamato inhibidor de actividad peroxidasa

Se obtuvieron diferencias significativas entre las células vegetales y los tratamientos mediante un análisis de varianza.

proteínas F= 7736 P<0.0001.

actividad peroxidasa F=101.25 P<0.0001.

Figuras

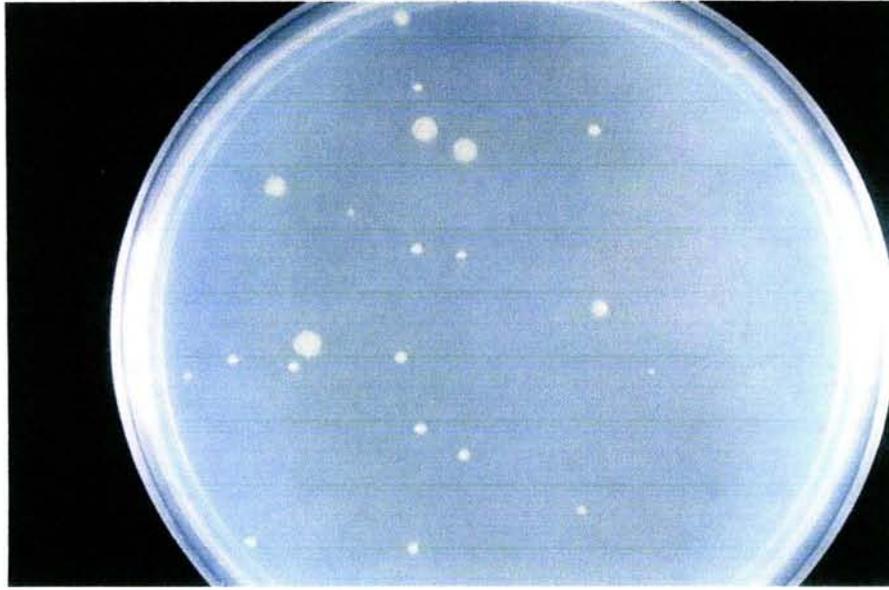


Figura 1. Reversión espontánea en *Salmonella typhimurium* cepa TA98 (testigo negativo)

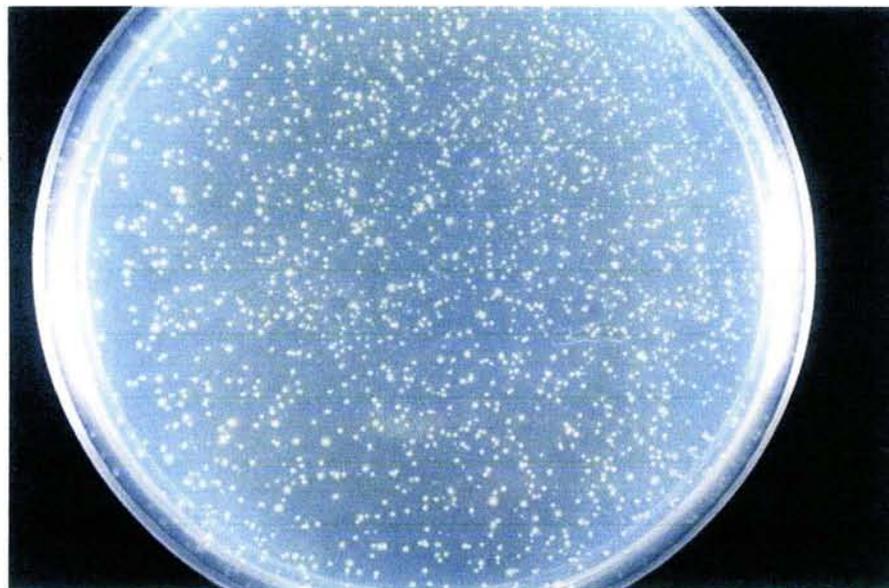


Figura 2. Reversión inducida por la 4-NOP



Figura 3. Colonias revertantes de *Salmonella typhimurium* en la cepa TA98 con abundante crecimiento de fondo característico de toxicidad.



Figura 4. Colonias revertantes de *Salmonella typhimurium* en la cepa TA100 con abundante crecimiento de fondo característico de toxicidad.

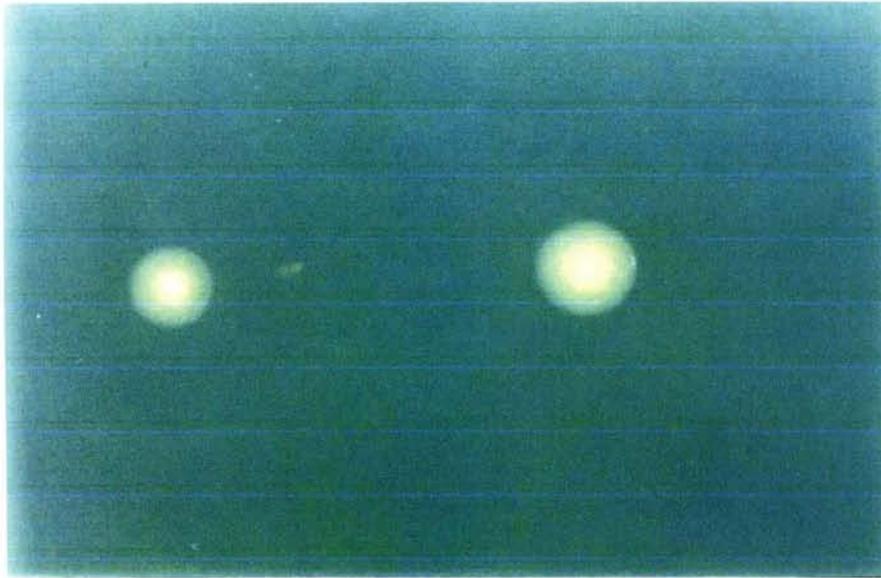


Figura 5. Dos colonias revertantes de *Salmonella typhimurium*

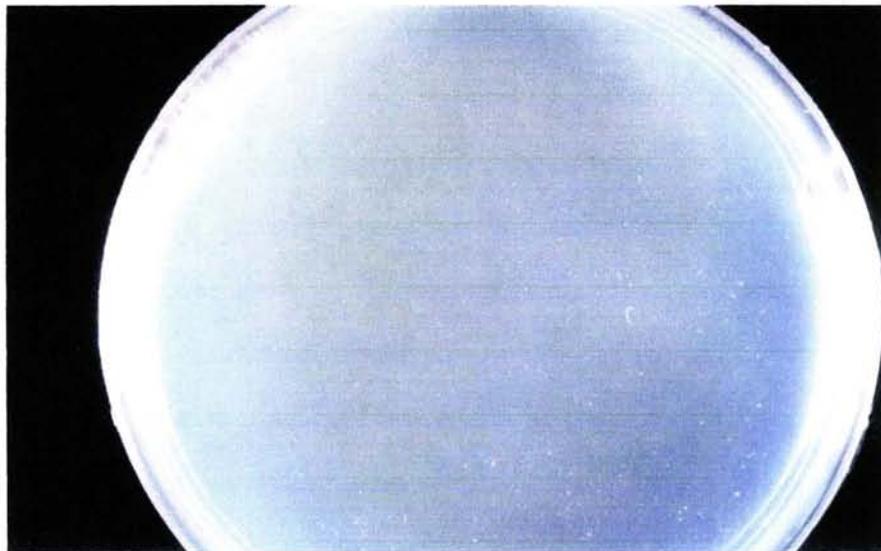


Figura 6. Ausencia de crecimiento de colonias de *Salmonella typhimurium* debido a la muerte provocada por el insecticida metil azinfos.