



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Antimutagenicidad de los extractos de algunos vegetales  
comestibles en *Salmonella typhimurium*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G O**

**P R E S E N T A :**

**RODRIGO LOPEZ GONZALEZ**



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

DIRECTORA DE TESIS: DRA. SANDRA LUZ GOMEZ ARROYO

2004



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO  
AVENIDA DE  
MEXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Rodrigo López González  
FECHA: 30 - Noviembre 2004  
FIRMA: Lopez R. J. J. G.

**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: Antimutagenicidad de los extractos de algunos vegetales comestibles en Salmonella typhimurium

realizado por Rodrigo López González

con número de cuenta 9520275-2 , quien cubrió los créditos de la carrera de. Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

*Sandra Gómez Arroyo*

Propietario

Dr. Rafael Villalobos Pietrini

*Rafael Villalobos Pietrini*

Propietario

Dra. María Elena Calderón Segura

*María Elena Calderón Segura*

Suplente

Dra. María del Carmen Calderón Ezquerro

*María del Carmen Calderón Ezquerro*

Suplente

M. en C. Ana Rosa Flores Márquez

*Ana Rosa Flores Márquez*

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



## **DEDICATORIAS**

A mis amados padres Ana Maria González Colín y Miguel López Bravo por su apoyo, comprensión, cariño y enseñanzas durante toda mi vida, pero especialmente durante la realización de mis estudios, son los mejores padres que un hijo puede tener.

A mis queridos hermanos: Hugo, Eduardo, Alejandro y Ana Cecilia. Gracias por su apoyo y por ser unos grandes amigos.

Agradezco al amor de mi vida Martha Elena Díaz Hernández por estar conmigo siempre y ser una fuente de inspiración para lograr todas mis metas, te amo con todo mi corazón.

Con amistad sincera a mis compañeros del Laboratorio de Citogenética Ambiental del Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM: Alejandro, Ana, Antonio, Carolina, César, Cony, Emmanuel, Erika, Isabel, Ivonn, Lilia, Roció y Selene.

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

A mis compañeros de la facultad de Ciencias: Abraham, Alejandro, Cesiah, Karen, Mariano, Miguel, Omar, Pilar y Sofía.

A mis amigos de toda la vida: Alejandro, Yoel, César, Christian, José Cruz y José de Jesús.

## **AGRADECIMIENTOS**

Con el más sincero de los agradecimientos y una gran admiración a la Doctora Sandra Luz Gómez Arroyo por la brillante dirección de este trabajo de tesis, por todo el tiempo brindado a mi formación académica y por su apoyo firme en todo momento.

Agradezco a mis sinodales por sus atinados comentarios y las revisiones del escrito:

Dr. Rafael Villalobos Pietrini

Dra. María Elena Calderón segura

Dra. María del Carmen Calderón Ezquerro

M. en C. Ana Rosa Flores Márquez

A la Dra. Josefina Cortés Eslava por su apoyo, así como por la asesoría teórica y técnica para la realización de este trabajo.

A Martha Elena Díaz Hernández por su apoyo incondicional durante la realización de este trabajo

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

## INDICE

Contenido	Página
Resumen.....	2
Introducción.....	3
Antecedentes.....	6
Antimutagénesis.....	6
Clorofila.....	9
Clorofilina.....	11
Carotenos.....	12
Algunos vegetales consumidos en la dieta del mexicano.....	13
Apio.....	13
Perejil.....	14
Pepino.....	15
Germinado de alfalfa.....	16
Aminas aromáticas.....	17
2-amino floureno.....	18
4-nitro-o fenilenediamina.....	19
m-fenilenediamina.....	20
Activación metabólica en plantas.....	21
Ensayo de Ames.....	24
Ensayo de cocultivo célula vegetal microorganismo.....	26
Objetivos.....	28
Hipótesis.....	29
Materiales y métodos.....	30
Ensayo de antimutagenicidad.....	31
Determinación de la actividad peroxidasa.....	32
Determinación del contenido de proteínas.....	33
Determinación del contenido de clorofila y carotenos.....	33
Resultados.....	35
Discusión.....	38
Conclusiones.....	43
Referencias.....	44
Figuras.....	54
Tablas.....	60

## Resumen

Fue analizado el efecto antimutagénico de los extractos crudos del perejil, apio, pepino y germinado de alfalfa frente a las aminas aromáticas pro mutagénicas 2-amino floureno (2-AF), m- fenilendiamina (mPDA) y 4-nitro-o-fenilendiamina (NOP). El análisis se realizó mediante el ensayo de cocultivo célula vegetal/microorganismo utilizando como sistema de activación metabólica a las células de cilantro en suspensión (*Coriandrum sativum*) para activar a la NOP y a las células de tabaco (*Nicotiana tabacum*) para activar el 2-AF y la mPDA.

En este estudio se realizó la determinación de clorofila, carotenos y proteínas de los extractos de los vegetales que se probaron en los experimentos de antimutagenicidad para verificar si estos pigmentos (clorofila y carotenos) están implicados en la inhibición de la mutagenicidad.

En los experimentos de antimutagenicidad donde los extractos se coincubaron con las aminas aromáticas y las células vegetales, se logró establecer, de manera significativa que los extractos de apio y perejil disminuyen la mutagenicidad causada por las aminas aromáticas 2-AF, mPDA y NOP. En el caso del germinado de alfalfa, se obtuvieron resultados parciales ya que no inhibe la mutagenicidad de la NOP y reduce ligeramente la producida por el 2-AF y la mPDA. Con en estos resultados es posible plantear que la inhibición del efecto mutagénico de las aminas aromáticas, está relacionada con el contenido de clorofila en los extractos de apio, perejil y germinado de alfalfa. Esto es consistente con los resultados obtenidos con el extracto de pepino que no logró provocar efecto antimutagénico en ningún caso, ya que contiene una cantidad menor de clorofila con relación a los otros extractos probados.



## INTRODUCCIÓN

El hombre se encuentra expuesto a gran cantidad de sustancias tóxicas en el ambiente. El Instituto Nacional para la Seguridad Ocupacional y la Salud de Estados Unidos de América ha estimado que millones de trabajadores se encuentran expuestos a agentes potencialmente peligrosos. El ambiente ocupacional no es la única fuente de mutágenos, ya que existen otras que incluyen, agua, suelo, atmósfera, comida y hábitos sociales. (US Environmental Protection Agency 1996).

La materia particulada respirable en el ambiente con un diámetro menor a los 10  $\mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{10}$ ) comprende una mezcla compleja que consiste de gran número de sustancias, muchas de las cuales son tóxicas. Estudios epidemiológicos realizados en áreas urbanas han demostrado consistentemente que la exposición a la materia particulada está asociada con la mortalidad y/o morbilidad en enfermedades respiratorias y cardiovasculares. Exposiciones altas están también asociadas con un incremento en el riesgo de cáncer. Algunos estudios realizados en Europa, muestran que las poblaciones en contacto con contaminantes ambientales presentan niveles altos de varios marcadores de genotoxicidad, como son: aductos de ADN, aberraciones cromosómicas, intercambios de cromátidas hermanas y la sobre-expresión del oncogen ras (US Environmental Protection Agency 1996).

En adición a la inducción del daño al ADN por exposiciones exógenas a carcinógenos, se sabe que éste es modificado, por radicales libres. Estos radicales pueden originarse como producto de procesos endógenos, pero alternadamente pueden surgir por estrés oxidante mediado por el metabolismo de xenobióticos. El daño oxidante al ADN endógeno es más abundante que el causado por agentes exógenos (Armer *et al.* 2003).

En los sistemas biológicos, la formación de radicales libres es mediada por varios agentes y mecanismos como la alta tensión de oxígeno, la radiación y el metabolismo de xenobióticos. Los radicales libres que se generan son muy reactivos con el oxígeno molecular, originando radicales peróxido e hidroperóxido

iniciándose de esta manera una reacción en cadena. Los estados pro-oxidantes causan lesiones celulares en los órganos más importantes por medio del daño a componentes celulares, incluyendo ácidos grasos poli-insaturados, fosfolípidos colesterol, ADN y proteínas (Madhavi *et al.* 1996).

El cáncer es uno de los mayores problemas de salud pública. Aparentemente cerca del 80 al 90% de su incidencia está determinada por factores externos potencialmente controlables. Por lo tanto la alimentación, así como el estilo de vida pueden proveer muchas sustancias carcinogénicas. Sin embargo en varios casos, aun no existe evidencia definitiva sobre cuales son las características de la dieta que más favorece el riesgo de cáncer, sustancias como café, alcohol, productos de pirólisis, nitratos, aminos, humo de los autos, pesticidas y muchos tipos de mutágenos han sido relacionados con la etiología del cáncer (Doll y Peto 1981).

Las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de muerte a nivel mundial. El riesgo de adquirirlas puede acrecentarse por factores como la hipercolesterolemia, hipertensión y el hábito de fumar. El envejecimiento en los organismos es resultado de procesos normales metabólicos y de desarrollo. La especie humana tiene uno de los periodos de vida más largos entre los mamíferos. Una de las teorías más aceptadas para explicar los procesos de envejecimiento involucra a los radicales libres. Esta teoría sugiere que el envejecimiento ocurre por daños a los tejidos vía los radicales libres que se producen durante el metabolismo aeróbico y que por otro lado el nivel normal de defensa de los antioxidantes no es completamente eficiente, entonces una fracción de los radicales libres escapan de la eliminación. Estos radicales libres son capaces de producir daño molecular siendo algunos de éstos irreparables y acumulados con la edad (Madhavi *et al.* 1996).

Los estudios epidemiológicos han relacionado a varios tipos de cáncer de varios sitios incluyendo estómago, colon, próstata y mama con una dieta inapropiada. La parte importante en este problema son los productos químicos y/o sus procesos que alteran al ADN, resultando estos en mutaciones, con la activación de oncogenes y la pérdida de la heterocigocidad de los genes supresores de tumores. Los mutágenos más comunes en la

dieta incluyen compuestos N-nitrosos en la carne conservada, quesos y/o cervezas procesadas, varias toxinas fúngicas incluyendo aflatoxinas y fumorisinas. La prevención del cáncer y otras enfermedades relacionadas con las mutaciones pueden conseguirse evitando las exposiciones a mutágenos y carcinógenos conocidos, por medio del fortalecimiento de los mecanismos fisiológicos de defensa o favoreciendo la ingestión de factores de protección (Mikulasová y Kosikova 2003).

## ANTECEDENTES

### Antimutagenesis

En décadas recientes, gran cantidad de laboratorios de investigación han reportado las actividades antimutagénicas y anticarcinogénicas de una amplia variedad de constituyentes de la dieta. Incrementando la ingesta de estos compuestos quimioprotectores, es posible mejorar la protección contra el daño causado por sustancias genotóxicas o carcinogénicas (Ribeiro y Favero 2003).

Los antioxidantes naturales como las vitaminas C y E, los carotenoides y las sustancias polifenólicas, actualmente son considerados como componentes benéficos de las frutas y los vegetales. Las propiedades anti-oxidantes de estos compuestos parecen ser responsables de los efectos protectores contra las enfermedades cardiovasculares y de algunas formas de cáncer (Rietjens *et al.* 2002).

La dieta se encuentra implicada en la prevención o el desarrollo de algunas enfermedades. Estudios recientes sugieren que la baja incidencia de cáncer está asociada con el consumo de fruta fresca y vegetales, ricos en compuestos fenólicos, fibra, clorofila,  $\beta$ caroteno y vitaminas tales como la C y la E, que tienen propiedades antimutagénicas y/o anticarcinogénicas (González de Mejía *et al.* 1999).

La presencia de diferentes fitoquímicos, en adición a vitaminas y provitaminas, en frutos y vegetales ha sido recientemente considerada de una importancia nutricional crucial en la prevención de enfermedades crónicas, como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y diabetes (Doll y Peto 1981, Willet 1994). Muchos de estos agentes fitoquímicos han mostrado una actividad antioxidante más fuerte que las vitaminas E, C y el  $\beta$ -caroteno dentro del mismo alimento (Cao *et al.* 1996, Eberhardt *et al.* 2000). De manera sinérgica o aditivamente, estos antioxidantes que se encuentran en la dieta proveen mecanismos bioactivos para reducir el estrés oxidante inducido por los

radicales libres. El estrés oxidante es resultado ya sea de una disminución de la capacidad antioxidante natural de las células o por un incremento en la cantidad de especies reactivas de oxígeno en los organismos. Cuando el balance entre oxidantes y antioxidantes en el cuerpo es roto por la sobreproducción de radicales libres, este lleva a un estrés oxidante y al daño al ADN (Ames *et al.* 1993, Liu *et al.* 2002).

Una relación inversa se ha reportado entre la ingesta de frutas y verduras y la mortalidad de enfermedades cerebrovasculares. Debido a que la prevención es una mejor estrategia que el tratamiento de enfermedades crónicas, el suministro constante de plantas que contienen sustancias fitoquímicas con efectos deseables a la salud, que va más allá de la nutrición básica, es esencial para equipar el mecanismo de defensa para reducir el riesgo de enfermedades crónicas en los humanos (Liu *et al.* 2002).

Aun cuando se han identificado cerca de 5000 productos químicos en las plantas, una gran proporción de estos permanece sin conocerse. Diferentes plantas tienen distintos contenidos de sustancias fitoquímicas con diversas estructuras, por lo tanto ofrecen mecanismos de protección a varios niveles. Para obtener beneficios óptimos a la salud por parte de las sustancias que se encuentran en la dieta, se sugiere que se consuma una dieta balanceada con una amplia variedad de fuentes de compuestos fotoquímicos provenientes de frutas, vegetales y granos (Chu *et al.* 2002, Liu *et al.* 2002).

Existen dos vías posibles por las cuales actúan los inhibidores de la mutagénesis. Que pueden ser la inhibición de las interacciones del material genético y las sustancias mutagénicas químicamente reactivas o mediante la inhibición de la activación metabólica de los mutágenos, este mecanismo implica 1) la inactivación de las enzimas activadoras y 2) la interacción con los promutágenos impidiendo su disponibilidad para el proceso enzimático (Hayatsu *et al.* 1988).

Los antimutágenos pueden actuar como desmutágenos inactivando a los mutágenos por interacción química antes de que entren en contacto con el ADN y/o bioantimutágenos que suprimen el proceso de fijación de la mutación después que se ha originado el daño al ADN (Kada *et al.* 1982).

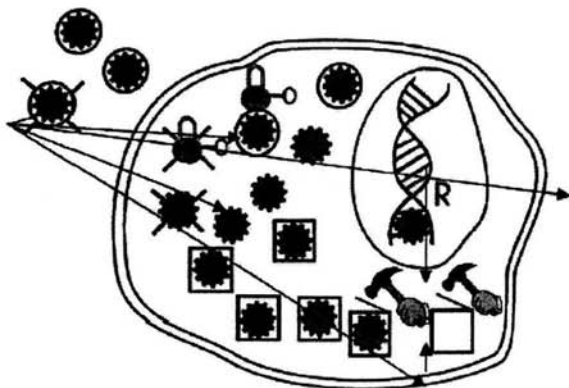


Figura 1 Efectos antimutagénicos de algunas sustancias en sistemas *in vitro*.

En la figura 1 se observan los efectos antimutagénicos de algunas sustancias en sistemas *in vitro*. Los compuestos pueden actuar ya sea fuera de las células directamente inhibiendo a los mutágenos o a las enzimas que los activan (simbolizado por candados). Estos agentes también pueden unirse a los intermediarios reactivos. Otro mecanismo importante de prevención al daño al ADN es la generación de enzimas de desintoxicación (simbolizado por cajas y martillos) (Knasmuller *et al.* 2002).

## Clorofila

Se sabe que ciertas sustancias inhiben la actividad mutagénica de algunos compuestos (Hayatsu *et al.* 1988). Dentro de éstas se encuentran pigmentos como la clorofila y la clorofilina que son porfirinas que tienen la capacidad de atrapar directamente a mutágenos con estructuras policíclicas (Hayatsu *et al.* 1993).

De las tres clases principales de pigmentos (clorofila, carotenos y xantófilas), las clorofilas son las más ampliamente distribuidas y las de mayor importancia. Las clorofilas son los pigmentos responsables de la fotosíntesis, el proceso fundamental que convierte la energía de la luz en energía química. En presencia de luz, los carbohidratos y otros compuestos orgánicos son producidos a partir de bióxido de carbono y agua, liberándose oxígeno molecular (Gross 1991).

Las tres localizaciones primordiales de los pigmentos dentro de las células son: cloroplastos, vacuola y pared celular. La composición de estos pigmentos varía de acuerdo con su localización. La clorofila, cuya estructura molecular se presenta en la figura 2, es una porfirina que constituye el fotorreceptor primario para el proceso de fotosíntesis en las plantas. Todas las plantas verdes contienen clorofila *a* y clorofila *b*, en los vegetales superiores la clorofila *a* es el pigmento más importante y la clorofila *b* accesoria. Ambos tipos de clorofila se encuentran localizadas en organelos subcelulares, llamados cloroplastos. En general, la relación de las clorofilas *a* y *b* usualmente es de 3 a 1 y constituye un parámetro fisiológico. La proporción varía con las condiciones de crecimiento y factores ambientales (Gross 1991).

La clorofila es producida en los cloroplastos y es responsable de la apariencia verde de hojas, tallos y raíces aéreas. La molécula de clorofila está compuesta de cuatro anillos, constituida a partir de aminoácidos alifáticos (designados del I al IV), estos anillos están ligados para formar un anillo tetrapirrólico con un átomo de magnesio ( $Mg^{2+}$ ) en el centro; en el anillo IV, el ácido propiónico sustituyente está esterificado con una molécula de fitol que es la región hidrofóbica de la molécula ( $C_{20}H_{39}$ ). En general, para captar la luz, las plantas usan las dos formas de clorofila, *a* y *b*, la primera





## Clorofilina

La clorofilina (CHL) es una sal de sodio o cobre derivada de la clorofila (Kephart 1955), cuya estructura se muestra en la figura 3. Este compuesto es obtenido en un proceso de saponificación de extractos crudos de plantas. Existe gran número de estudios que muestran que la clorofilina es un potente antimutágeno en microorganismos (Madrigal-Bujaidar *et al.* 1997). La clorofilina es la forma soluble en agua de la clorofila que actúa como un antimutágeno y anticarcinógeno en diversos modelos experimentales (Young-joon y Ferguson 2003). En *Drosophila melanogaster* se ha encontrado que la clorofilina puede reducir los daños producidos por mutágenos directos como los neutrones (Zambrano *et al.* 1999) y los rayos  $\gamma$  (Zimmering *et al.* 1990, Olvera *et al.* 1993). La clorofila y la clorofilina no son tóxicas ni mutagénicas en sistemas microbianos. Los efectos antimutagénicos de la clorofila se han reportado principalmente en experimentos donde se usan extractos crudos de plantas. Mucha de la información relaciona a la clorofila como parte del extracto total, pero no como un componente separado del extracto. La clorofilina, por otra parte, se ha estudiado separadamente como un compuesto sintético individual, con respecto a sus propiedades antimutagénicas (Sarkar *et al.* 1994).

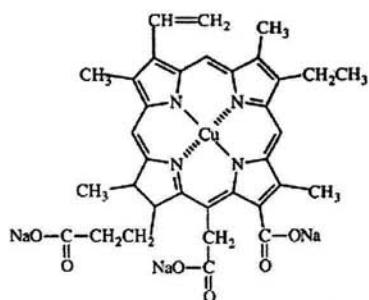


Figura 3. Estructura química de la clorofilina.

## Carotenos

Los carotenos son los pigmentos más importantes de las plantas y son responsables de los colores rojos, naranjas y amarillos encontrados en las frutas como los tomates, pimientos rojos, calabazas, zanahorias y en los pétalos de muchas flores (Gross 1991). Los carotenos además de estar en las plantas se localizan en algas, hongos y bacterias. Los carotenos derivan su nombre del  $\beta$ -caroteno que es el pigmento más representativo de este grupo y el primero en ser aislado de las zanahorias (*Daucus carota*) (Gross 1991).

Los carotenos se forman por la unión de ocho  $C_5$  unidades de isopreno, que están unidas en una forma regular cabeza-cola excepto en el centro de la molécula, donde el orden se invierte de cola-cola por esto la molécula es simétrica (figura 4). Como resultado, los dos grupos metilo cercanos al centro de la cadena de polieno está separada por seis átomos y el otro grupo metilo por cinco. A partir de esta estructura básica casi todos los carotenoides pueden ser transformados en derivados a través de ciclación, oxidación o cualquier combinación de estos procesos. Los carotenos pueden dividirse en dos grupos básicos: 1) carotenos que son hidrocarburos ( $C_{40}H_{56}$ ) y 2) sus derivados oxigenados que son las xantofilas (Gross 1991).

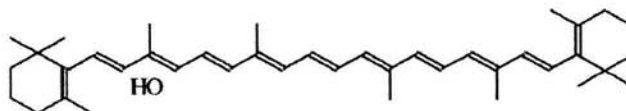


Figura 4. Estructura química del  $\beta$ -caroteno.

## **Algunos vegetales consumidos en la dieta del mexicano**

En diversas culturas existen distintos patrones en la dieta, algunos de ellos promueven la salud y otros incrementan el riesgo de enfermedades crónicas. A pesar de las diferencias en la forma de cocinar en todo el mundo hay algunas características que se comparten en los modelos de dieta, que se consideran “saludables.” Entre los más notables se encuentran las frutas, los vegetales, las legumbres y varios tipos de granos (Kris-Etherton *et al.* 2002).

### **Apio**

El apio (*Apium graveolens L.*; Umbeliferae) ha sido cultivado en Europa desde la antigüedad y ha sido usado como hierba aromática y especia. Su semilla, es empleada para propósitos medicinales, como diurético y adyuvante en condiciones artríticas y reumáticas (Wilcht 1994). Algunos de sus constituyentes reportados son furocoumarinas y flavonoides (Garg *et al.* 1980). El apio es una planta procedente del Mediterráneo, existiendo otros centros secundarios como el Cáucaso y la zona del Himalaya. Se conocía en el antiguo Egipto. Su utilización como hortaliza se desarrolla en la Edad Media y actualmente es consumido tanto en Europa como en América del Norte (Wilcht 1994).

## Perejil

El perejil (*Petroselinum sativum* L.; Umbeliferae). Planta herbácea anual o bianual de 15 a 50 centímetros de altura, con raíz bulbosa (a modo de zanahoria), se ramifica casi desde la base del tallo, terminando en umbelas con flores amarillentas (hasta 20 - 25 radios cada una). Las hojas son tripinadas de color verde muy oscuro. Toda la planta desprende un olor estimulante y aromático. Es una hierba culinaria popular, sus hojas se usan para sazonar, mientras que el aceite de sus semillas se utiliza como colorante. El uso culinario de esta planta data desde los tiempos del Imperio Romano, siendo éste documentado en Columella "*De Re Coquinaria*" sus semillas y raíces tienen aplicación en la medicina tradicional (Appendino *et al.* 1998).

El perejil es rico en metabolitos secundarios. Entre sus principios activos destacan, un aceite esencial oleum petroselini con apiol y miristicina (7 % en semillas y 5 % en raíces), un glucósido (la apiina), flavonas, vitaminas C y A. Estos principios confieren a esta planta efectos diuréticos, estomacales, expectorantes y estimulante del apetito. Algunos autores relatan propiedades afrodisiacas por el consumo de perejil. Las hojas del perejil han mostrado actividad quimioprotectora (Appendino *et al.* 1998).

## **Pepino**

El pepino (*Cucumis sativus* L. Cucurbitaceae). Es originario de las regiones tropicales del sur de Asia, siendo cultivado en la India desde hace más de 3,000 años. De la India se extiende a Grecia y a Roma, posteriormente a China. El cultivo de pepino fue introducido por los romanos en otras partes de Europa; aparecen registros de este cultivo en Francia en el siglo IX, en Inglaterra en el siglo XIV y en Norteamérica a mediados del siglo XVI, ya que Cristóbal Colón llevó semillas a América. El primer híbrido apareció en 1872 (Gross 1991).

El fruto del pepino es áspero o liso, dependiendo de la variedad, que vira desde un color verde claro, pasando por un verde oscuro hasta alcanzar un color amarillento cuando está totalmente maduro, aunque su recolección se realiza antes de su madurez fisiológica. La pulpa es acuosa, de color blanquecino, con semillas en su interior repartidas a lo largo del fruto. Dichas semillas se presentan en cantidad variable y son ovales, algo aplastadas (Lampe 1999).

Entre las propiedades nutritivas del pepino tiene especial importancia su elevado contenido de ácido ascórbico (11 mg/100g) y ácido pantoténico (0.25 mg/100g) y pequeñas cantidades del complejo vitamínico B. En cuanto a minerales es rico en calcio, cloro, potasio y hierro. Las semillas son abundantes en aceites vegetales (Lampe 1999).

## Alfalfa

La alfalfa (*Medicago sativa* L. *Papilionaceae*) tiene su área de origen en Asia Menor y sur del Cáucaso, abarcando países como Turquía, Irak, Irán, Siria, Afganistán y Pakistán. Los persas introdujeron la alfalfa en Grecia y de ahí pasó a Italia en el siglo IV a. C. La gran difusión de su cultivo fue llevada a cabo por los árabes a través del norte de África, llegando a España donde se extendió a toda Europa (González *et al.* 2004).

La alfalfa pertenece a la familia de las leguminosas. Se trata de una planta perenne, vivaz y de porte erecto. La raíz principal es pivotante, robusta y muy desarrollada (hasta 5 m de longitud) con numerosas raíces secundarias. Posee una corona que sale del terreno, de la cual emergen brotes que dan lugar a los tallos, que son delgados y erectos para soportar el peso de las hojas y de las inflorescencias, además son muy consistentes, las hojas son trifoliadas, aunque las primeras hojas verdaderas son unifoliadas. Los márgenes son lisos y con los bordes superiores ligeramente dentados (González *et al.* 2004).

La alfalfa contiene factores no nutritivos. Los principales son las saponinas y los taninos solubles. Las primeras se definen químicamente como triterpenos unidos a uno o más grupos azúcar. Su presencia en las plantas se relaciona con su efecto protector frente a hongos e insectos fitófagos. Las saponinas resultan especialmente tóxicas en animales de sangre fría (peces, caracoles, anfibios) y tienen efectos hemolíticos en animales superiores. Forman micelas indigestibles con los ácidos biliares, por lo que se ha investigado su uso en la alimentación humana para reducir la absorción de colesterol.

La alfalfa contiene en su pared celular, una composición de fibra de 8 % de pectinas, 10% de hemicelulosas, un 25 % de celulosa y un 7 % de lignina. Es una buena fuente de macrominerales (calcio, fósforo, magnesio, potasio, cloro), microminerales (cinc, cobre, hierro) y vitaminas (liposolubles, grupo B). Predomina la luteína, en relación 11:1 con la zeaxantina. Existen en la actualidad productos comerciales basados en concentrar las xantofilas de la alfalfa mediante presión y floculación de los pigmentos, con un contenido proteico del 50-55 % y una riqueza en xantofilas superior a las 1200 ppm (Del pozo 1983).

## **Aminas aromáticas**

Las aminas aromáticas son generalmente identificadas como aquellos agentes químicos que presentan en su estructura molecular uno o más anillos aromáticos, teniendo uno o más amino sustituyentes. Éstas varían desde la simple anilina hasta moléculas muy complejas con estructuras aromáticas o heterocíclicas conjugadas y con sustituyentes múltiples (Pinheiro *et al.* 2004).

Históricamente, las aminas aromáticas representan una categoría de compuestos clásicos peligrosos ambientales y carcinógenos en humanos (Weisburger 1988). Estas sustancias, así como un subgrupo de ellas, las aminas aromáticas heterocíclicas (que se generan cuando se cocina carne o pescado) se encuentran muy implicadas en la inducción de cáncer de colon y de mama (DeBrain y Josephy 2000). La exposición a las aminas aromáticas heterocíclicas es primariamente a través de la dieta, sin embargo se han identificado en ríos que se utilizan como fuente de agua potable (Wagner *et al.* 2003).

Las aminas aromáticas se encuentran ampliamente distribuidas en la industria y al ser vertidas al ambiente constituyen parte de los contaminantes ambientales. Las fuentes más importantes de aminas en el ambiente comprenden varios sectores de la industria química como la refinación del petróleo, polímeros sintéticos, colorantes, adhesivos, gomas, fármacos, plaguicidas y explosivos (Pollution Inventory 2003). Otras fuentes que no son de origen industrial pero que juegan un papel relevante en el desarrollo del cáncer a través de la aplicación de colorantes del cabello, asimismo se generan mediante el humo de los autos, los compuestos pirrólicos producidos por la combustión de materia vegetal rica en proteínas, como en los incendios forestales y el humo de tabaco (Snyderwine *et al.* 2002).

Las aminas aromáticas monocíclicas contienen un solo anillo aromático y por lo menos un grupo funcional amino en el mismo. Esta es la forma más simple de aminas aromáticas, que muestran que con pequeñas modificaciones de su estructura molecular

se afecta mucho su mutagenicidad (Chung *et al.* 1997). Las fenilendiaminas son aminas aromáticas monocíclicas promutagénicas. Estas aminas son empleadas como intermediarias en la manufactura de productos farmacéuticos, de pesticidas y de plásticos (Weisburger 1988).

## 2- amino fluoreno

Es una de las aminas aromáticas policíclicas (figura 5) que está bien caracterizada como promutagénica y procarcinógena en mamíferos, que es dependiente de la activación metabólica para producir efecto mutagénico (Miller *et al.* 1979). Por otro lado es activada por sistemas enzimáticos vegetales y ésta ha sido ampliamente estudiada (Sanderman 1988). El 2-amino fluoreno es transformado a mutágeno por células vegetales en cultivo, lo que ha sido evaluado mediante la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium* (Plewa y Gentile 1988). Asimismo ha sido activado y evaluado en el ensayo de Ames con la adición de extractos de plantas o células de tabaco (Plewa *et al.* 1983). Con el sistema de activación metabólica de *Persea americana* S 117 se demostró que las oxidasas de función múltiple (OFM) junto con las peroxidasas, están involucradas en la activación de este compuesto (Chiapella *et al.* 1995).

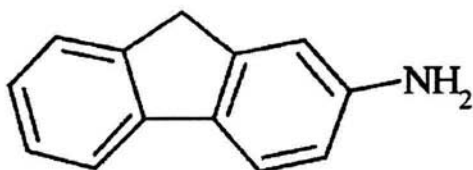


Figura 5. Estructura química de la amina aromática 2-amino fluoreno.



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

Es una amina aromática monocíclica (figura 6) 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). La NOP no produce aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos (Searle *et al.* 1975). Ni tampoco incrementa la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados en ratones (Niedziela *et al.* 1991). Se ha demostrado que la fracción S2 de *Zea mays* es capaz de activar metabólicamente a la NOP cuyo efecto es evaluado en el ensayo de Ames (Ysern *et al.* 1993).

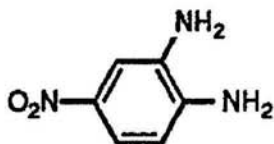


Figura 6. Estructura química de la amina aromática 4-nitro-o-fenilenediamina.

### Meta -fenilenediamina (m-PDA)

Es una amina aromática monocíclica (figura 7). Se ha establecido un modelo para la activación de la mPDA por células de tabaco (TX1) que consiste de los siguientes componentes: la mPDA es transformada en el interior de la célula vegetal TX1 por las peroxidasa intracelulares que oxidan a la molécula (R-NHOH), el metabolito puede ser conjugado a una macromolécula (R-NHOH-conjugado), el conjugado amino es secretado hacia el medio extracelular. Por otro lado, el metabolito activado vegetalmente entra al microorganismo de prueba. Finalmente el o los productos de la mPDA activada vegetalmente, también pueden ser metabolizados por la nitrato reductasa. La función del compuesto conjugado puede ser el de estabilizar y secuestrar al xenobiótico activo. Esto sirve como mecanismo de desintoxicación de la planta. Sin embargo, este producto estable puede tener efecto mutagénico sobre los organismos que la consumen y la metabolizan en forma activa. La m-PDA puede también ser activada por las oxidasas de función múltiple (OFM) de *Persea americana* S 117 (Chiapella *et al.* 1997).

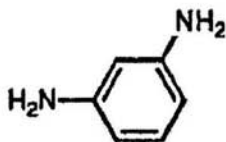


Figura 7. Estructura química de la amina aromática m-fenilenediamina

## Activación metabólica en plantas

Las plantas, al igual que otros organismos en el ambiente, se encuentran expuestas continuamente a agentes químicos potencialmente tóxicos. Muchos de éstos son productos naturales que participan en el intercambio químico de las especies, por ejemplo, las plantas sintetizan y liberan gran número de productos secundarios que varían en estructura desde moléculas alifáticas simples hasta sumamente complejas como los compuestos aromáticos policíclicos. Muchas de estas moléculas defienden a las plantas de la depredación de los animales, de la invasión de microbios patógenos y también suprimen la competencia de otras especies de plantas. Por esta razón, las plantas se encuentran sometidas a muchos xenobióticos, que incluyen productos microbianos y animales, además, la cantidad y variedad de xenobióticos fitotóxicos han aumentado como resultado de un rápido incremento en la cantidad de compuestos sintéticos (Coleman *et al.* 1997). Las plantas tienen una posición clave en la circulación de xenobióticos y sus intermediarios. El término activación vegetal connota el proceso por el cual un promutágeno es transformado por la acción biológica de una planta en un mutágeno. Un promutágeno es un compuesto que no es mutagénico por sí mismo, pero que puede ser biológicamente transformado en mutágeno (Plewa y Gentile 1988).

La capacidad de las plantas de bioconcentrar sustancias del ambiente y activar promutágenos en metabolitos tóxicos es significativo si se considera la gran diversidad de xenobióticos a los cuales están expuestas (Plewa *et al.* 1993).

El metabolismo de xenobióticos en las plantas se efectúa a tres niveles: fase I de transformación principalmente realizada por las monooxigenasas del citocromo P-450; fase II de conjugación principalmente realizada por la glutatión S-transferasa (GST) y la glicosil transferasa (GTS) y la fase III de compartimentalización principalmente en fracciones de la pared celular o en la vacuola (Pflugmacher *et al.* 1999).

En la fase I las reacciones más importantes son las oxidaciones catalizadas por el citocromo P-450, aunque existen reacciones de hidrólisis catalizadas por esterasas y amidasas. El citocromo P-450 está formado por hemo-proteínas localizadas en el

retículo endoplásmico y existen en muchas isoformas. Debido a que las reacciones de la fase I activan, éstas no siempre resultan en productos de menor fitotoxicidad; en algunos casos el metabolito es igual o más tóxico que el compuesto inicial. En el caso de que el compuesto extraño ya tenga un grupo funcional propicio para la fase II del metabolismo, entonces éste puede ser metabolizado sin necesidad de las enzimas de la fase I (Coleman *et al.* 1997). Las peroxidasas de las plantas catalizan la oxidación de diferentes tipos de xenobióticos, siendo ubicuas en ellas (Plewa *et al.* 1993). En las plantas, las enzimas más importantes en la oxidación de xenobióticos son las peroxidasas y las lipooxigenasas. Las oxidasas en plantas tienen funciones en varias rutas biosintéticas, especialmente en aquellas relacionadas con la producción de una gran gama de metabolitos secundarios como terpenoides, alcaloides, fitoesteroles, pigmentos, etc. (Stiborova *et al.* 2000).

Las peroxidasas se ubican entre las enzimas más importantes responsables del metabolismo oxidante en los sistemas metabólicos en plantas (Sanderman 1982). Las peroxidasas son enzimas relativamente estables y abundantes en muchos homogeneizados de plantas y en cultivos celulares en suspensión, catalizan dos categorías de reacciones oxidantes en las células, la clásica reacción peroxidante que requiere  $H_2O_2$  y la reacción oxidante que requiere oxígeno molecular (Lamoureux y Frear 1979).

En la fase II los xenobióticos o el metabolito activado en la fase I es desactivado por medio de una unión covalente a una molécula hidrofílica endógena, como glucosa, malonato o glutatión, para formar un conjugado soluble en agua. La glucosa se conjuga a grupos hidroxilo, sulfidrilo, amino y carboxilo, el malonato a hidroxilo y amino y el glutatión a los sitios electrofílicos de la molécula. Las reacciones de la fase II son catalizadas por glucosil, malonil y glutatión transferasas. A diferencia de la fase I, que puede producir metabolitos fitotóxicos, los productos de la fase II no son tóxicos o lo son menos que el compuesto original. La fase II es, por lo tanto, una etapa protectora muy importante en el proceso de desintoxicación. Los conjugados formados en la fase II son exportados del citosol por proteínas de transporte localizadas en la membrana, que inicia la fase III, la compartimentalización y el procesamiento son parte del sistema de

desintoxicación. Los compartimientos subcelulares relacionados con la fase II son las vacuolas y el apoplasto (Coleman *et al.* 1997).

Los promutágenos pueden ser transformados en conjugados estables de alto peso molecular que se encuentran secuestrados en las vacuolas o en la pared celular, estos compuestos sólo son liberados cuando son consumidos por los animales o los humanos, y representan un riesgo genotóxico al hombre a través de la cadena alimenticia (Gichner *et al.* 2001).

Se ha establecido que las plantas pueden activar promutágenos en mutágenos y demostrándose que para algunos compuestos los metabolitos que se forman son diferentes de aquellos que se producen en los animales (Sandermann 1988, Higashi 1988). Asimismo se han encontrado en algunas especies de plantas varias actividades enzimáticas dependientes del citocromo P450 (cit-p450) (Riviere y Cabanne 1987). Además de las reacciones catalizadas por el citocromo P-450, otras oxidaciones que implican diferentes sistemas enzimáticos también han sido descritas. Por lo tanto, algunos procesos de peroxidación que utilizan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la oxidación que requiere de oxígeno molecular pueden participar en el metabolismo de xenobióticos (Lamoreux y Frear, 1979; Dohn y Krieger, 1981).

Todas estas características enfatizan la importancia de desarrollar y evaluar los sistemas de activación metabólica basada en plantas, sobre todo en la evaluación de la mutagenicidad de pesticidas y otras sustancias que pueden entrar en contacto con las plantas. Se han desarrollado diferentes métodos (Velemínský y Gichner, 1988), uno de estos es la preparación de homogeneizados de plantas para su incorporación en sistemas *in vitro*.

## Ensayo de Ames

La identificación de sustancias capaces de inducir mutaciones se ha convertido en un procedimiento importante como medida de seguridad. Los agentes químicos capaces de inducir mutaciones, pueden potencialmente dañar la línea germinal, repercutiendo en problemas de fertilidad y mutaciones en las futuras generaciones. Los mutágenos químicos son también capaces de inducir cáncer (Mortelmans y Zeiger 2000).

La mutagénesis es una manera de evaluar la toxicidad asociada con la exposición crónica a compuestos. El proceso de mutagénesis esta asociado con los mecanismos de la carcinogénesis (Valkova *et al.* 2004).

Los ensayos que usan al ADN como molécula blanco presentan un interés especial, ya que se sabe que el daño a este nivel es un paso importante en el envejecimiento y en la expresión de varias enfermedades. Adicionalmente, la protección contra agentes oxidantes que causan daño al ADN puede ser cuantificada mediante la medición de los efectos antimutagénicos (Grey y Adlercruetz 2003).

Las mutaciones pueden ser evaluadas en bacterias y otros sistemas celulares. El ensayo de Ames con *Salmonella typhimurium* es bastante aceptado como una prueba de corto plazo para identificar sustancias que pueden producir daño genético que conduce a mutaciones en los genes. Este ensayo utiliza cepas con mutaciones preexistentes que no le permiten a la bacteria sintetizar el aminoácido histidina y por lo tanto es incapaz de crecer y formar colonias en su ausencia. Nuevas mutaciones en el sitio de las preexistentes o cercanas a estos genes, pueden restaurar su función y permitirles a las células sintetizar histidina. Estas células mutadas pueden crecer en ausencia de histidina y formar colonias revertantes (Mortelmans y Zeiger 2000).

Adicionalmente, las cepas de prueba contienen otras mutaciones que le permiten a la bacteria ser más sensible a algunos mutágenos químicos:

- Una delección en los genes *uvr-B-bio*, que elimina el mecanismo de reparación por escisión, que evita que lesiones al ADN sean corregidas por el sistema de reparación propenso al error (“error prone”). La delección a través del gen de biotina hace a la bacteria dependiente de biotina.
- La mutación (*rfa*) que afecta la pared de lipopolisacáridos que cubre la superficie de la bacteria, permite que sea más permeable a sustancias grandes.
- La introducción del plásmido pKM101 que potencia la mutagénesis inducida por la luz UV y por agentes químicos vía un incremento en el sistema de reparación propenso al error. El plásmido además confiere resistencia a ampicilina, el cual es marcador conveniente para detectar la presencia del plásmido (Mortelmans y Zeiger 2000).

En este estudio la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium* fue empleada para los ensayos de antimutagenicidad. Esta cepa bacteriana contiene la mutación (*rfa*) que afecta la pared de lipopolisacáridos que cubre la superficie de la bacteria, la delección en los genes *uvr-B-bio* y el plásmido pKM101 potencia la mutagénesis inducida por la luz UV y por compuestos vía un incremento en el sistema de reparación propenso al error. Esta cepa es capaz de detectar mutágenos que causan corrimiento de marco de lectura que implica la inserción o pérdida de pares de bases (Mortelmans y Zeiger 2000).

A través de los años, se han hecho modificaciones al ensayo estándar de incorporación en placa, que han propiciado el aumento en la sensibilidad de la prueba (Mortelmans y Zeiger 2000).

## **El ensayo de cocultivo célula vegetal/microorganismo**

Con la introducción de plaguicidas y de otras sustancias en la agricultura y el incremento en el contenido de contaminantes en aire, suelo y agua, el riesgo de la activación de agentes químicos inocuos en mutágenos y carcinógenos por los sistemas enzimáticos de las plantas, debe ser considerado desde el punto de vista de la conservación del ambiente, así como la estimación del riesgo para la población humana (Velemnínsky y Gichner 1988).

Se ha documentado que los sistemas enzimáticos de las plantas y los animales pueden activar promutágenos a mutágenos (Plewa *et al.* 1993). Sin embargo, el metabolismo de xenobióticos en las plantas es diferente al de los animales (Sandermann 1982).

Un aspecto importante de las células vegetales es que contienen en sus estructuras menor cantidad de proteínas por unidad de masa que las células animales (Virtanen 1962). Este es un factor complicado cuando se usa el peso de tejido fresco como base de comparación entre las actividades enzimáticas entre plantas y animales (Plewa *et al.* 1988).

Se han usado varios ensayos con plantas para la detección de agentes genotóxicos en el ambiente. Su significancia en este campo depende fuertemente de su habilidad para activar promutágenos y procarcinógenos con sus propios sistemas enzimáticos (Velemnínsky y Gichner 1988).

El ensayo de cocultivo célula vegetal/microorganismo se basa en el empleo de células vegetales en cultivos en suspensión como el sistema de activación y el microorganismo como el sistema biológico indicador de daño genético (Plewa *et al.* 1983). Las células vegetales y la bacteria se incuban juntas con el promutágeno. La activación del mismo es detectada colocando a la bacteria en un medio mínimo (Plewa *et al.* 1993).



La separación del proceso de activación metabólica y del ensayo de mutagenicidad, representa la evidencia directa de que el agente químico que se está probando ha sido activado por los sistemas enzimáticos de las plantas (Velemínsky y Gichner 1988).

Este sistema de activación metabólica es análogo al de la fracción S9 de mamífero, pero en este ensayo la fracción S9 es reemplazada por homogeneizados de células vegetales o cultivos de células vegetales en suspensión (Higashi *et al.* 1982).

## **OBJETIVOS**

- Evaluar el efecto antimutagénico de los extractos crudos de vegetales como apio, perejil, pepino y germinado de alfalfa frente a las mutaciones inducidas por las aminas aromáticas 4-nitro-o-fenilediamina, m-fenilenediamina y 2-amino fluoreno activadas metabólicamente, debido a que estas plantas son frecuentemente consumidas en la dieta de los mexicanos y pueden ofrecer un efecto protector contra diferentes sustancias xenobióticas ambientales.
  
- Determinar la cantidad de los pigmentos clorofilas y carotenos, de los extractos crudos de apio, perejil, pepino y germinado de alfalfa, para relacionarlos con una disminución en la mutagenicidad causada por las aminas aromáticas.

## **HIPÓTESIS**

Se sabe que las plantas tienen la capacidad de metabolizar o activar diversos promutágenos presentes en el ambiente. Un grupo muy importante de éstos, son las aminas aromáticas que se encuentran en grandes cantidades en el ambiente ya que son generadas en muchos procesos industriales. Se ha establecido que los vegetales pueden activar con sus sistemas enzimáticos a las aminas aromáticas, produciendo de esta manera metabolitos mutagénicos. Asimismo, las plantas en sus tallos, hojas y frutos contienen diferentes sustancias o compuestos tales como clorofila, carotenos, flavonoides, compuestos fenólicos y vitaminas que han mostrado disminuir la incidencia de varios tipos de cáncer, dado que los mecanismos de mutagénesis y los de iniciación de la carcinogénesis están relacionados. Se espera que estos vegetales sean capaces de disminuir la mutagenicidad inducida por las aminas aromáticas promutagénicas 4-nitro-*o*-fenilendiamina, *m*-fenilendiamina y 2-amino fluoreno activadas por células vegetales en suspensión.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Preparación de las bacterias para el ensayo de antimutagenicidad**

A partir de la caja patrón de la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium* se tomó una porción de la colonia y se colocó en medio líquido nutritivo Oxoid No. 2 en agitación constante (125 rpm) durante 16 horas a 37 °C para promover la proliferación de las bacterias.

Las bacterias se centrifugaron a 6500 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió en amortiguador de fosfato de potasio 10 µM a un pH de 7.4 manteniéndolo en hielo para su posterior uso.

### **Preparación de las células vegetales para el ensayo de antimutagenicidad**

A partir de callos de *Coriandrum sativum* y *Nicotiana tabacum* en medio sólido (MX), se aislaron células vegetales para sembrarse en medio líquido a una concentración de 100 mg/ml, manteniendo los matraces protegidos de la luz y en agitación constante 125 rpm, durante 7 días, estas células vegetales se emplearon en el ensayo de antimutagenicidad como el sistema de activación metabólica de las aminas aromáticas.

### **Preparación de los extractos vegetales para el ensayo de antimutagenicidad**

Se seleccionan hojas y tallos frescos de apio, perejil, el fruto sin cáscara de pepino y el germinado de alfalfa. Los vegetales se lavaron con agua de la llave y agua bidestilada tres veces. Para obtener los extractos vegetales crudos, se realizaron diferentes cortes de los vegetales y se colocaron en un extractor de jugos e inmediatamente se centrifugaron a 11, 500 rpm durante 15 minutos a 4 °C, posteriormente se tomó el sobrenadante y se centrifugó a 14, 000 rpm durante 10 minutos a la misma temperatura (4 °C). El sobrenadante se esterilizó por filtración (miliporo 0.22 µm) y se almacenó en frascos estériles a - 4 °C protegidos de la luz.

### Ensayo de antimutagenicidad

En frascos de cocultivo que contienen 2.25 ml de medio MS con células vegetales en suspensión en una concentración de 100 mg/ml con 7 días de crecimiento, se adicionaron por separado las diferentes concentraciones de los extractos vegetales de apio, pepino, perejil y germinado de alfalfa en las cantidades de 100, 250, 500, 750 y 1000  $\mu$ l, respectivamente y basados en experimentos preliminares se establecieron concentraciones fijas de las aminas aromáticas: 100  $\mu$ g/frasco de cocultivo de 4-nitrofenilendiamina, 500  $\mu$ g/frasco de cocultivo de m-fenilendiamina y 20  $\mu$ g/frasco de cocultivo de 2-amino fluoreno. Se agregó por último, 100  $\mu$ l de la suspensión de bacterias, y se mantuvieron en agitación constante durante 1.5 horas. Al mismo tiempo se colocaron el testigo negativo de amortiguador de fosfatos, y como testigo de antimutagenicidad 5 mg/frasco de cocultivo de clorofilina. Se tomaron 250  $\mu$ l del frasco de cocultivo después de 1.5 horas de incubación y se colocaron en tubos de agar de superficie, los cuales se agitaron brevemente y se sembraron por triplicado en cajas de medio mínimo.

Las cajas de medio mínimo se incubaron por 48 horas a 37 °C, para posteriormente realizar el conteo de las colonias revertantes. El porcentaje de inhibición (PI) en las pruebas de antimutagenicidad se calculó usando la siguiente ecuación (Ong *et al.* 1986).

$$PI = 100 - A/B (100)$$

Donde: A es el número de revertantes /caja en presencia del extracto.

B es el número de revertantes /caja en ausencia del extracto.

### **Determinación de la actividad peroxidasa de los cultivos de células vegetales en suspensión**

La actividad peroxidasa de las células vegetales en suspensión, se calculó mediante la oxidación de guayacol a tetraguayacol monitoreando el cambio en la absorbencia a 470 nm. La actividad peroxidasa se evaluó durante cinco minutos tomando mediciones en intervalos de 1 minuto, usando un espectrofotómetro (Spectronic Genesis). Se realizaron cinco repeticiones independientes de las mediciones en cada experimento.

La reacción de la peroxida se realizó con:

1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.3 %

1 ml de guayacol al 1%

10 µl de la muestra de células vegetales en suspensión

990 µl de amortiguador de fosfato de potasio 10 µM a pH de 7.4

Se mezclaron todos los componentes arriba mencionados, agregando por último el guayacol y se determinó la absorbencia a 470 nm. La tasa de la actividad peroxidica, se estimó de acuerdo con la siguiente ecuación (Gichner *et al.* 1994):

$$\frac{[(A_{470}/E_{470} \times l)v/p]}{t_{\min}}$$

Donde A<sub>470</sub> es la absorbencia a 470 nm

E<sub>470</sub> es el coeficiente de extinción del tetraguayacol (26.6/mM/cm)

$l$  Es la longitud de trayectoria de la cubeta (1cm)

$v$  es el volumen de reacción en litros

$\rho$  es el contenido de proteína en  $\mu\text{g}$

$t_{\text{min}}$  es el tiempo en minutos

### **Determinación del contenido total de proteínas**

La determinación de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford (1976). En celdas para espectrofotómetro se colocaron 20  $\mu\text{l}$  de la muestra del homogeneizado y los extractos que se van a analizar, se le adicionaron 200  $\mu\text{l}$  de reactivo de Bradford y por último con agua destilada se llevó a un volumen de final de 1 ml. Posteriormente, se realizaron las determinaciones de las proteínas totales por triplicado en un espectrofotómetro (Spectronic Genesis) a 595 nm. Las muestras analizadas correspondieron al homogeneizado de células vegetales en suspensión y los extractos de los vegetales perejil, apio, pepino y germinado de alfalfa. Al mismo tiempo, se efectuaron las lecturas de las diferentes concentraciones de albúmina sérica de bovino. Las concentraciones empleadas para elaborar la curva patrón fueron 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, y 80  $\mu\text{g/ml}$ . Como solución blanco se empleó el reactivo de Bradford 200  $\mu\text{l}$  y agua destilada 800  $\mu\text{l}$ .

### **Determinación del contenido total de clorofila y carotenos**

Se seleccionaron hojas y tallos frescos de apio, perejil, el fruto sin cáscara de pepino y el germinado de alfalfa. Los vegetales se lavaron con agua de la llave y agua bidestilada tres veces, con bisturí se cortaron y se pesaron 50 g de cada uno para macerarlas con 100 ml de NaCl 0.35 M más 10 ml de amortiguador tris 0.2 M pH= 8.

Los vegetales macerados se filtraron en varias capas de gasa humedecida con amortiguador tris 0.2 M pH= 8, posteriormente 30 ml del filtrado recuperado se centrifugó a 1700 rpm durante 5 minutos. Se desechó el sedimento y el sobrenadante se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos, para sedimentar los cloroplastos intactos.

El sedimento se resuspendió en 2 ml de NaCl 0.35 M **agitando** suavemente y la solución se llevó a un volumen final de 30 ml con NaCl 0.35 M, **éste** se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y los cloroplastos se resuspendieron en 10 ml de NaCl 0.35 M.

Se tomaron 0.1 ml de suspensión de cloroplastos en un tubo de ensaye y se agregaron 20 ml de acetona al 80 %, la suspensión de cloroplastos en acetona se pasó a través de un filtro (Whatman 1). El filtrado se recuperó para realizar las mediciones de la longitud de onda a 665 nm en un espectrofotómetro (Spectronic Genesis). Las mediciones se hicieron tres veces y el promedio de las absorbencias registradas se utilizó para calcular el contenido de clorofila en mg/ml.

Para la determinación de carotenos se tomaron 0.1 ml del sobrenadante y se le agregaron 20 ml de acetona al 80 % y se pasó a través de un filtro (Whatman 1). El filtrado se recuperó para realizar las mediciones de la longitud de onda a 480 nm en un espectrofotómetro (Spectronic Genesis). Las mediciones se llevaron a cabo tres veces y el promedio de las absorbencias registradas se utilizó para calcular el contenido de clorofila en  $\mu\text{g/ml}$ . En el caso de la clorofila y los carotenos se empleó como solución blanco acetona al 80%.



## RESULTADOS

Los resultados de los experimentos de antimutagenicidad de los extractos vegetales de apio, perejil, pepino y germinado de alfalfa frente a las aminas aromáticas 4-nitro-o-fenilediamina, m-fenilenediamina y 2-amino fluoreno se presentan en las tablas 1, 2 y 3.

Los resultados de la determinación de clorofila, carotenos y proteínas de los vegetales se muestran en la tabla 4. Los datos presentados en las tablas 1, 2, 3 y figuras 8-19 son resultado de tres experimentos, de los cuales se obtuvo la estadística descriptiva (media y error estándar) y se les aplicó un análisis de varianza para determinar la existencia de diferencias significativas entre los testigos y los tratamientos.

En la tabla 1. Se observan los experimentos de antimutagenicidad con los extractos vegetales de apio, perejil, pepino, y germinado de alfalfa frente a la amina aromática 2-amino fluoreno. Los extractos de los vegetales se emplearon en las concentraciones de 100, 250, 500, 750 y 1000  $\mu\text{l}$ /frasco de cocultivo y en el caso del 2-amino fluoreno se empleó una concentración fija de 20  $\mu\text{g}$ /frasco de cocultivo. El testigo negativo (amortiguador de fosfatos + *Salmonella typhimurium* TA98), tuvo un valor de  $22 \pm 1.46$  colonias revertantes que se encuentra dentro de los valores normales de la reversión espontánea (Mortelmans y Zeiger 2000), el testigo de antimutagenicidad (clorofilina 5  $\mu\text{g}$ /frasco de cocultivo) mostró una inhibición de 87.54 %. En ningún caso los extractos vegetales mostraron ser mutagénicos ni tóxicos por sí mismos, en todas las concentraciones probadas por lo que los valores de la reversión espontánea fueron similares en todos los extractos (tabla 5). Cuando los extractos fueron tratados con el 2-amino fluoreno en presencia de las células vegetales se observó disminución en la mutagenicidad para los extractos de perejil, apio y germinado de alfalfa, siendo estadísticamente significativas las concentraciones de 250, 500, 750 y 1000  $\mu\text{l}$ /frasco de cocultivo de extracto de perejil, exhibiendo un porcentaje de inhibición de la mutagenicidad de 19.02 %, 45.49 %, 54.34 % y 63.67 % respectivamente. En el caso del apio se evidencian diferencias significativas en todas las concentraciones con

porcentajes de inhibición de 14.09 %, 43.77 %, 53.48 %, 58.65 %, 63.27 %. El germinado de alfalfa reveló los porcentajes de inhibición de 14.72 %, 22.63 %, 30.22 %, 32.02 % y 38.84 %. Por otro lado, el extracto de pepino no tuvo efecto antimutagénico en ninguna de las concentraciones ni aumentó el número de revertantes.

En la tabla 2 se muestra el experimento de antimutagenicidad de los extractos vegetales de apio, perejil, pepino, y germinado de alfalfa frente a la amina aromática *m*-fenilenediamina. Los extractos vegetales se emplearon en concentraciones de 100, 250, 500, 750 y 1000  $\mu$ l/ frasco de cocultivo y en el caso de la *m*-fenilenediamina se usó una concentración fija de 500  $\mu$ g/frasco de cocultivo. El testigo negativo tuvo un promedio de  $22 \pm 1.5$  colonias revertantes que estuvieron dentro de los valores normales de la reversión espontánea (Mortelmans y Zeiger 2000), el testigo de antimutagenicidad (clorofilina 5  $\mu$ g/frasco de cocultivo), mostró una inhibición de 88.85 %. Ninguno de los vegetales mostraron ser mutagénicos ni tóxicos por sí mismos, en todas las concentraciones probadas (tabla 5). Cuando los extractos fueron tratados con la *m*-fenilenediamina en presencia de las células vegetales se observó un descenso en la mutagenicidad con los extractos de perejil, apio y germinado de alfalfa, siendo estadísticamente significativas las concentraciones de 250, 500, 750 y 1000  $\mu$ l/frasco de cocultivo de extracto de perejil, manifestando un porcentaje de inhibición de la mutagenicidad de 11.83 %, 42.41 %, 50.68 % y 62.41 %. En el caso del apio se observaron diferencias significativas en todas las concentraciones con porcentajes de inhibición de 23.30 %, 26.20 %, 34.59 %, 46.20 % y 45.86 %. El germinado de alfalfa solo tuvo efecto antimutagénico en las concentraciones de 750 y 1000  $\mu$ l /frasco de cocultivo con un porcentaje de inhibición de 16.20 %. El extracto de pepino muestra porcentajes de inhibición menores con respecto a los demás extractos con 4.48 %, 6.55 %, 4.82 %, 7.70 % y 4.71 % de inhibición. Siendo, únicamente significativos los que corresponden a la concentración de 250 y 750  $\mu$ l/frasco de cocultivo.

En la tabla 3, se muestra el experimento de antimutagenicidad de los extractos vegetales de apio, perejil, pepino, y germinado de alfalfa frente a la amina aromática 4-nitro-*o*-fenilenediamina. Los extractos vegetales se emplearon en las concentraciones de 100, 250, 500, 750 y 1000  $\mu$ l/ frasco de cocultivo y en el caso de la 4-nitro-*o*-

fenilenediamina se empleó una concentración fija de 100  $\mu\text{g}$ /frasco de cocultivo. El testigo negativo tuvo un valor de  $33 \pm 1.7$  colonias revertantes que se encuentra dentro de los valores normales de la reversión espontánea (Mortelmans y Zeiger 2000), el testigo de antimutagenicidad (clorofilina 5  $\mu\text{g}$ /frasco de cocultivo), mostró una inhibición de 89.67%. Ninguno de los extractos vegetales fueron mutagénicos ni tóxicos por si mismos, en todas las concentraciones probadas (tabla 5). Cuando los extractos fueron tratados con la 4-nitro-o-fenilenediamina en presencia de las células vegetales se observó una disminución en la mutagenicidad para los extractos de perejil, apio y germinado de alfalfa, siendo estadísticamente significativas todas las concentraciones del extracto de perejil, exhibiendo un porcentaje de inhibición de la mutagenicidad de 19.72 %, 23.57 %, 30.50 % 32.20 % y 44.37 %. En el caso del apio se observaron diferencias significativas en todas las concentraciones con porcentajes de inhibición de 8.78 %, 15.40 %, 20.18 %, 25.26 % y 30.66 %. Por otro lado, el extracto de pepino y el de germinado de alfalfa no mostraron efecto antimutagénico en ninguna de las concentraciones.

Los resultados del contenido de clorofila, carotenos y proteínas (tabla 4), ponen de manifiesto que el extracto de perejil, fue el que presentó el contenido más alto tanto de clorofila como de carotenos y proteínas. Seguido por el extracto de apio y el de germinado de alfalfa, mientras que el extracto de pepino es el que tuvo menor cantidad de pigmentos vegetales y proteínas.

## DISCUSIÓN

Los agentes alquilantes están presentes de manera generalizada en el ambiente y también son producidos de manera endógena, está bien establecido que los compuestos N-nitrosos en los alimentos y en el humo de tabaco, causan cáncer. La evidencia disponible implica que las lesiones al ADN que causan mutaciones son el mecanismo por el cual se desarrolla el cáncer (Drabløs *et al.* 2004).

Las aminas aromáticas son sustancias a las que se encuentra expuesto ampliamente el hombre. Se emplean como intermediarias en la coloración de textiles, en el procesamiento de la madera y en la manufactura de productos farmacéuticos, de plaguicidas y de plásticos (Wagner *et al.* 2003). Estos compuestos son capaces de ser activados a través del metabolismo vegetal en productos mutagénicos que pueden ser evaluados en el ensayo de cocultivo célula vegetal/ microorganismo (Plewa *et al.* 1993).

Las plantas al igual que otros organismos se encuentran expuestas continuamente a sustancias potencialmente tóxicas, su capacidad para bioconcentrar sustancias del ambiente y activar promutágenos en metabolitos tóxicos es significativa si se considera la gran diversidad de xenobióticos a los cuales las plantas están en contacto (Plewa *et al.* 1993 Coleman *et al.* 1997).

El método empleado en este estudio es el de cocultivo célula vegetal/ microorganismo, esta técnica permite el sondeo de compuestos promutagénicos que son activados por los sistemas enzimáticos de las plantas, en este método además es posible evaluar el efecto antimutagénico de diferentes compuestos. Los sistemas de activación metabólica utilizados en el presente trabajo son células en suspensión de *Nicotiana tabacum* para la activación de las aminas aromáticas m- fenilendiamina y 2-amino fluoreno y las células de *Coriandrum sativum* para la activación de la 4-nitro-o-fenilendiamina. Los extractos crudos del perejil, apio, pepino y germinado de alfalfa fueron empleados para evaluar su efecto antimutagénico.

Inicialmente en este trabajo se evaluó la capacidad de las células de cilantro *Coriandrum sativum* para activar metabólicamente las 3 aminas aromáticas m-

fenilenediamina, 4-nitro-o-fenilenediamina y 2-amino fluoreno, pero únicamente se observó la activación metabólica con la 4-nitro-o-fenilenediamina (tabla 3). El hecho de que los resultados obtenidos de la activación por células de cilantro frente al 2-amino fluoreno y la mPDA fueran negativos, está relacionado con su actividad peroxidasa ya que en este trabajo la tasa de reacción peroxidasa fue de  $0.1694 \pm 0.002$  nm de tetraguayacol/min/ $\mu$ g de proteína, por esta razón se emplearon las células de tabaco para activar las otras dos aminas (que presentan una actividad peroxidasa de  $0.247 \pm 0.007$  nm de tetraguayacol/min/ $\mu$ g), mPDA y 2-AF, pues se ha establecido de manera concluyente que las células de tabaco *Nicotiana tabacum* pueden activar a estos compuestos promutagénicos. La amina aromática 2-AF ha sido activada y evaluada en el ensayo de Ames con la adición de células de tabaco (Plewa y Gentile 1983). En el sistema de activación metabólica de *Persea americana* S 117 se demostró que las oxidasas de función múltiple junto con las peroxidases, están involucradas en la activación del 2-amino fluoreno (Chiapella *et al.* 1995), adicionalmente, se ha reportado que la m-fenilenediamina fue activada por las enzimas oxidasas de función múltiple de *Persea americana* S 117 (Chiapella *et al.* 1997). Se ha propuesto que las células de *Nicotiana tabacum* activan al 2-AF y a la m-PDA a través de diferentes rutas metabólicas (Smith *et al.* 1989). Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que efectivamente el 2-AF y la mPDA son activados por las células de tabaco (tablas 1 y 2).

Una vez obtenida la respuesta mutagénica de las aminas a través del metabolismo vegetal, se procedió a realizar el ensayo de antimutagenicidad donde se probaron varias concentraciones de los extractos de algunos vegetales que son comúnmente consumidos en la dieta de los mexicanos frente a las aminas aromáticas para determinar si existe efecto antimutagénico de los extractos vegetales (tabla 1, 2, 3 y figuras 8-19). Adicionalmente, se realizaron las cuantificaciones de los pigmentos vegetales clorofilas, carotenos y de las proteínas de estos vegetales (tabla 4), para establecer la existencia de una relación de estos compuestos con la disminución en la mutagenicidad, ya que se ha reportado que algunos extractos vegetales pueden reducir el efecto mutagénico de aminas aromáticas de manera relevante, Cortés-Eslava *et al.* (2004) reportaron que el

extracto de cilantro es capaz de disminuir la mutagenicidad causada por estas mismas aminas aromáticas.

Los compuestos inhibidores de la mutagénesis y carcinogénesis de la dieta tales como compuestos fenólicos, fibra, clorofila,  $\beta$ caroteno y vitaminas como la C y la E, son importantes por que es posible mejorar la protección contra el daño causado por sustancias genotóxicas o carcinogénicas previniendo de esta manera, la formación de ciertos tipos de cáncer (Hayatsu *et al.* 1988, González de Mejía *et al.* 1999, Ribeiro y Favero 2003). Entre estos compuestos uno de los más importantes es la clorofila debido a que las plantas contienen grandes cantidades y se ha demostrado su efecto antimutagénico en varios estudios (Ong *et al.* 1986, Neghisi *et al.* 1989 y Cortés-Eslava *et al.* 2004).

La disminución de la mutagenicidad de los extractos vegetales no ocurre en todos los casos. El extracto de pepino no muestra efecto antimutagénico frente a ninguna de las aminas aromáticas probadas en este estudio (Tablas 1, 2, 3 y figuras 10, 14 y 18). Ésto, puede estar relacionado con su bajo contenido de clorofilas y carotenos (Tabla 4). El extracto de germinado de alfalfa refleja un comportamiento similar frente a la amina aromática 4-nitro-o-fenilenediamina, sin embargo se observa una ligera disminución de la mutagenicidad en algunas de las concentraciones probadas frente al 2-amino fluoreno y la m-fenilenediamina (Tablas 1, 2, 3 y figuras 11, 15 y 19).

Los resultados de los experimentos de mutagenicidad muestran que, el extracto de perejil y apio disminuyen de manera significativa la mutagenicidad producida por las aminas aromáticas (Tablas 1, 2, 3 y figuras 8, 9, 12, 13, 16 y 17), estos datos pueden indicar que el contenido de clorofila y carotenos están relacionados con la inhibición de la mutagenicidad, ya que estos vegetales tienen un contenido más alto de clorofila, con respecto al pepino y al germinado de alfalfa (Tabla 4), no obstante el contenido de clorofila de perejil y apio es menor al reportado por Cortés-Eslava *et al.* (2004) para el extracto de cilantro 0.325 mg/ml, esto se encuentra relacionado con los porcentajes de inhibición de la mutagenicidad. Por ejemplo, estos mismos autores reportan que el

extracto de cilantro inhibe en 87.1 % la mutagenicidad causada por la amina aromática 4-nitro-o-fenilenediamina, mientras que, en este trabajo el extracto de perejil presenta el porcentaje de inhibición de 44.7 %, frente a este mismo compuesto.

En un principio se planteó que los carotenos tienen la capacidad de inhibir la mutagenicidad causada por las aminas aromáticas, pero aparentemente las concentraciones presentes en los extractos vegetales empleados en este trabajo (Tabla 4), no son capaces de inhibir el efecto mutagénico de las aminas aromáticas debido a que en experimentos preliminares se probaron las concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{frasco}$  de cocultivo de  $\beta$ -caroteno y no hubo un decremento significativo de la mutagenicidad. Sin embargo, existe la posibilidad de que los carotenos actúen de manera sinérgica con la clorofila debido a que tienen actividades biológicas importantes tales como la capacidad de atrapar radicales libres (Edenharder *et al.* 1999), además de que pueden modular la patogénesis del cáncer y enfermedades coronarias. González de Mejía *et al.* (1998) reportan que algunas variedades de chiles (chilaca, poblano, serrano y jalapeño) tienen una mezcla de agentes antimutagénicos entre los que se encuentran el  $\beta$ -caroteno y las xantofilas, siendo estos compuestos los responsables de la inhibición de la mutagenicidad causada por agentes como el 1-nitropireno (1-NP) y el 1,6-dinitropireno (1,6-DNP).

Resulta de gran importancia el entendimiento de los beneficios a la salud y/o la toxicidad potencial de las plantas (Yen *et al.* 2001). Debido a esto, es necesario determinar con claridad cuales son los componentes de los extractos que participan en la antimutagenicidad y de ser posible sus mecanismos de acción. Un método para lograr esto es la separación o fraccionamiento de los extractos pudiéndose determinar en estas fracciones los componentes puramente antimutagénicos y los de naturaleza mutagénica que puedan existir en las plantas.

En este estudio se pone énfasis en la evaluación del comportamiento antimutagénico de los extractos vegetales completos por que en esta condición es como se consumen o se introducen en la dieta. Dentro de los productos vegetales más consumidos por el hombre se encuentran la clorofila, este compuesto en algunos casos llega a comprender

el 1 % del peso seco de las plantas (Chipchase 1961). Asimismo es importante mencionar que la clorofila al igual que la clorofilina son de los compuestos más implicados en el proceso de antimutagénesis y debido a sus estructuras químicas puede unirse a los mutágenos a través de su anillo tetrapirrólico, constituyendo de esta manera complejos, inhibiendo las interacciones de los mutágenos y el ADN (Negishi *et al.* 1989). Además se ha descrito que la clorofila y la clorofilina tienen la capacidad de atrapar directamente a mutágenos con estructuras policíclicas (Hayatsu *et al.* 1993).

Es de vital importancia que los experimentos para demostrar antimutagénesis y anticarcinogénesis sean rigurosos, incluyendo todos los testigos relevantes, así como determinar al mismo tiempo si la toxicidad o mutagénesis están presentes. De igual manera es importante el uso de extractos completos ya que esto permite una aproximación más real a los eventos que ocurren cuando estos vegetales son consumidos por el ser humano.



## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo aunado a la revisión de la literatura y el análisis de estos permiten concluir lo siguiente:

Mediante el método de cocultivo célula vegetal/microorganismo es posible evaluar la activación de promutágenos a mutágenos a partir de sistemas metabólicos en plantas.

Las células de cilantro (*Coriandrum sativum*) en suspensión pueden activar a la amina aromática 4-nitro-o-fenilenediamina, pero no al 2-amino fluoreno y la m-fenilenediamina. Por otro lado las células de tabaco (*Nicotiana tabacum*) fueron capaces de activar al 2-AF y la mPDA, evaluados en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*.

Los extractos de los vegetales de apio, perejil, pepino y germinado de alfalfa no son tóxicos ni mutagénicos. Los extractos de apio y perejil mostraron poseer efecto antimutagénico frente a las aminas aromáticas 2-AF, mPDA y 4-nitro-o-fenilenediamina, mientras que los de pepino y germinado de alfalfa no produjeron la reducción de la mutagénesis.

La inhibición de la mutagénesis está relacionada con el contenido de clorofila y carotenos ya que los vegetales con mayor contenido de ésta tuvieron mayor efecto antimutagénico, la clorofilina disminuyó de manera muy efectiva la mutagenicidad producida por las tres aminas aromáticas.

Es importante efectuar ensayos de antimutagénesis para de esta manera identificar los componentes de la dieta que pueden contrarrestar los efectos de sustancias mutagénicas y/o genotóxicas en el ambiente.

## REFERENCIAS

- Ames B.N., Shigenaga M.K. y Hagen T.M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7915-7922.
- Armstrong B.K., Mann J.L., Adelstein A.M. y Eskin F. (1975). Commodity consumption and ischemic heart-disease mortality, with especial reference to dietary practices. *J. Chronic. Dis.* 28: 455-469.
- Armer P.B., Rajinder S., Balvender K., Sram R.J., Binkova B., Kalina I., Popov T., Garte S., Taiolo E., Gabelova A. y Wasilewska-Cebulska A. (2003). Molecular epidemiology studies of carcinogenic environmental pollutants. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental pollution on exogenous and oxidative DNA damage. *Mutat. Res.* 544:397-402.
- Appendino G., Jakepovic J. y Bossio E. (1998). Structural revision of the parsley sesquiterpenes crispanone and crispane. *Phytochemistry* 9:1719-1722.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Cao G.H., Sofic E. y Prior R.L. (1996). Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agric, Food Chem.* 44:3426-3431.
- Chiapella C., Ysern P., Riera J. y Llagostera M. (1995). A plant metabolic activation system from *Persea Americana* with cytochrome P450-dependent peroxidase activities. *Mutat. Res.* 329:11-18.
- Chiapella C., Moreno J.A., Riera J., Radovan R.D., Gaubert N. y Llagostera M. (1997). Activation of arylamines to mutagenic products by two *in vitro* plant systems. *Mutat. Res.* 394:45-51.

Chipchase M-I. H. (1961). Chemical components in plant tissues. En *Biochemist's Handbook*. Long C. (Ed.), Spon, Londres, pp.1032-1033.

Chu Y. F., Sun Y., Wu X. y Liu R.H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *J. Agric. Food. Chem.* 50:6910-6916.

Chung F., Xu Y., Ho C., Desai D. y Han C. (1992). Protection against tobacco-specific, nitrosamine-induced tumorigenesis by green tea and its components en: *Phenolic Compounds in Food and their Effect on Health: II Analisis, Ocurrance and Chemistry*. Ho C., Lee C. Y. y Huang M. (Eds.). American Chemical Society, Washington, DC, pp. 284-291.

Coleman, J.O.D. Mechteld, M. A. Blake-Kalff. y Davies T.G.E. (1997). Detoxification by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant sci.* 24: 144-155.

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 aromatic amines activated by coriander whole cells. *Toxicol. Lett.* 153: 283-292.

DeBrain L.S. y Josephy P.D. (2000). Perspectives on the chemical etiology of breast cancer. *Environ. Health Perspect.* 110: 119-128.

Del Pozo M. (1983). *La alfalfa, su Cultivo y Aprovechamiento*. Mundi-Prensa. Madrid, España.

Dohn D. R. y Krieger E. R. (1981). Oxidative metabolism of foreign compounds by higher plants. *Drug. Metab. Rev.* 12: 119-158.

Doll R. y Peto R. (1981). The causes of cancer quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.* 66: 1197-1261.

Drabløs F., Feyzi E., Aas P. A., Vaagbø C. B., Kavli B., Bratlie M. S. Peña-Díaz J., Otterlei M., Slupphaug G. y Krokan H. E. (2004). Alkylation damage in DNA and RNA repair mechanisms and medical significance. *DNA repair*. 3:1389-1407.

Eberhardt M.V., Lee C.Y. y Liu R.H. (2000). Nutrition antioxidant activity of fresh apples. *Nature* 405:903-904.

Edenharder R., Worf-Wandelburg A., Decker M. y Platt K. L. (1999). Antimutagenic mechanisms of action of vitamins and related compounds against genotoxic heterocyclic amines from cooked food. *Mutat. Res.* 444:235-248.

Garg S.K., Gupta S.R. y Sharma N.D. (1980). Glucoside of *Apium graveolens*. *Planta Med.* 38:363-365.

Gentile J.M., Gentile G.J., Townsend S. y Plewa M.J. (1985). In vitro enhancement of the mutagenicity of 4-nitro-o-phenylenediamine by plant S-9, *Environ. Mutagen.* 7:73-85.

Gichner T., Cabrera L. G., Wagner E. D. y Plewa M. J. (1994). Induction of somatic mutations in *Tradescantia* clone 4430 by three phenylenediamine isomers and the antimutagenesis mechanism of diethyldithiocarbamate and ammonium meta vanadate. *Mutat. Res.* 316 : 164-172.

Gichner T., Stavreva D. A. y Breusegen F. V. (2001). O-phenylenediamina-induced DNA damage and mutagenicity in tobacco seedlings is light-dependent. *Mutat. Res.* 495:117-125.

González A.S., Díaz S.H., López T.R., Aizpuru G.E., Garza C.H. y Sánchez R.F. (2004). Consumo, calidad nutritiva y composición botánica de una pradera de alfalfa y gramíneas perennes con diferentes niveles de asignación de forraje. *Téc. Pecu. Méx.* 42: 29-37.

- González de Mejía E., Quintanar-Hernández J. A. y Loarca-Piña G. (1998). Antimutagenic activity of carotenoids in green peppers against some nitroarenes. *Mutat. Res.* 416:11-16.
- González de Mejía E., Castaño-Tostado E. y Loarca-Piña G. (1999). Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans. *Mutat. Res.* 441:1-9.
- Grey C.E. y Adlercruetz P. (2003). Ability of antioxidants to prevent oxidative mutations in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res.* 527:27-36.
- Gross J. (1991). *Pigments in vegetables Chlorophylls and Carotenoids*. Van Nostrand Reinhold. Nueva York. pp 3-4, 75-76.
- Hayatsu H., Arimoto S. y Negishi T. (1988). Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 202:429-446.
- Hayatsu H., Arimoto S., Negishi T. y Hayatsu T. (1993). Porphyrins as potencial inhibitors against exposure to carcinogens and mutagens. *Mutat. Res.* 290:79-85.
- Higashi K., Ikeuchi K. y Karasaki Y. (1982). Use of metabolic activation systems of tulip bulbs in the Ames test for environmental mutagens. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 29:505-510.
- Higashi K. (1988). Metabolic activation of environmental chemicals by microsomal enzymes of higher plants. *Mutat. Res.* 197:273-288.
- Kada T., Inoue T. y Namiki M. (1982). Environmental desmutagens and antimutagens. En *Environmental Mutagenesis, Carcinogenesis and Plant Biology*. Klekowski R. (Ed.) Preager, Nueva York, pp. 133-52.
- Kephart J.C. (1955). Chlorophyll derivates, their chemistry, commercial preparation and use. *Econ. Bot.* 9: 3-38.

Kris-Etherton P. M., Hecker K. D., Bonanome A., Coval S. M., Binkoski A. E., Hilpert K. F., Griel A. M. y Etherton T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.* 113(9B): 71S-88S.

Knasmuller S., Steinkellner H., Majer B.J., Nobis E.C., Scharf G. y Kassie F. (2002). Search for dietary antimutagens and anticarcinogens: methodological aspects and extrapolation problems. *Food. Chem. Toxicol.* 42: 1051-1062

Lai C.N., Butler M.A. y Matney T.S. (1980). Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content. *Mutat. Res.* 77:245-250.

Lamoreux G.L. y Frear D.S. (1979). Pesticide metabolism in higher plants: *in Vitro* enzyme studies. *Xenobiotic Metabolism: in Vitro Methods*. En Paulson D.G., Frear D.S. y Marks E.P. (Eds.) ACS Symposium series No. 97. Washington: American Chem. Soc., pp. 77-128.

Lampe J.W. (1999). Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am. J Clin. Nutr.* 90 : 475S-490S.

Liu R.H. (2002). Supplement quick fix fails to deliver. *Food Technol. Int.* 1:71-72.

Madhavi D.L., Desphande S.S., y Salunkhe D.K. (Eds). (1996). *Food Antioxidants. Technological, Toxicological and Health Perspectives*. Marcel Dekker, Inc. Nueva York.

Madrigal-Bujaidar E., Velázquez-Guadarrama N. y Díaz-Barriga S. (1997). Inhibitory effect of chlorophyllin on the frequency of sister chromatid exchanges produced by benzo[a] pyrene *in vivo*. *Mutat. Res.* 388:79-83.

Mortelmans K. y Zeiger E. (2000). The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* 455:29-60.

- Mikulasová M. y Kosikova B. (2003). Modulation of mutagenicity of various mutagens by lignin derivates. *Mutat. Res.* 535:171-180.
- Miller E.C., Miller J.A., Hirono I., Sugimura T. y Takayama S. (Eds.) (1979). *Naturally Occurring Carcinogens-Mutagens and Modulators of Carcinogens*. Japan Scientific Societies Press y University Park Press, Tokio y Baltimore.
- 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.
- Negishi T., Arimoto S., Nishizaki C. y Hayatsu H. (1989). Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido [4,3-b] indole (trp-p-2). *Carcinogenesis* 10:145-149.
- Negishi T., Rai H. y Hayatsu H. (1997). Antigenotoxic activity of natural chlorophylls. *Mutat. Res.* 376:97-100.
- Niedziela L. S., Shi X., Nath J. y Ong T. (1991). Studies on three structurally related phenylenediamines with the mouse micronucleous assay system. *Mutat. Res.* 259:43-48.
- Olvera O., Zimmering S., Arceo C. y Cruces M. (1993). The protective effects of chlorophyllin in treatments with chromium (VI) oxide in somatic cells of *Drosophila*. *Mutat. Res.* 301:201-204.
- Ong T., Whong W., Stewart J. y Brockman H.E. (1986). Chlorophyllin: a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures. *Mutat. Res.* 173: 111-115.
- Perry P. y Searle C. (1977). Induction of sister chromatid exchange in Chinese hamster cells by the hair dye constituents 2-nitro-o-phenylenediamine and 4-nitro-o-phenylenediamine. *Mutat. Res.* 56:207-210.
- Pflugmacher S., Wiencke C. y Sandermann H. (1999). Activity of phase I and phase II detoxification enzymes in Antarctic and Arctic macroalgae. *Mar. Environ. Res.* 48 : 23-36.

Pinheiro H. M., Touraud E. y Thomas O. (2004). Aromatic amines from azo dye reduction: status review with direct emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. *Dyes and Pigments* 61:121-139.

Plewa M.J. y Gentile J.M. (1982). The activation of chemicals into mutagens by green plants: En: *Chemical mutagens: Principles and Methods for their Detection*. Hoallander A. (Ed.). Plenum Press, Nueva York, pp. 57- 66.

Plewa M.J., Wagner D. L. y Gentile J.M. (1983). The activation of 2-aminofluorene by cultured plant cells. *Science* 219:1427-1429.

Plewa M.J. y Gentile J.M. (1988). The plant cell/microbe coinubation assay for the analysis of plant-activated promutagens. *Mutat. Res.* 187:207-219.

Plewa M.J., Gichner T., Xin H., Seo K. Y., Smith S. R. y Wagner D. L. (1993). Biochemical y mutagenic characterization of plant-activated aromatic amines. *Environ. Toxicol. Chem.* 12:1353-1363.

Pollution inventory. (2003). The Environment Agency. Inglaterra y Gales.

Ribeiro L.G. y Favero D.M. (2003). Dietary components may prevent mutation-related diseases. *Mutat. Res.* 544: 195-201.

Rietjens I.M.C.M., Boersma M.G., Haan L., Spenkelink B., Awad H.M., Cnubben N., Van Zanden J.J., Van der Woude H., Alink G.M. y Koeman J. H. (2002). The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 11:321-333.

Riviere J.L. y Cabanne F. (1987). Animal and plant cytochrome P-450 systems. *Biochimie* 69:743-752.

Sandermann H. (1982). Metabolism of environmental chemicals a comparison of plant and liver enzyme systems. *Env. Mut. Carcinog En: Klekowski E. J. Jr. (Ed.). and plant biology* pp.3870-3878.



- Sandermann H. Jr. (1988) Mutagenic activation of xenobiotics by plant enzymes. *Mutat. Res.* 187:183-194.
- Sarkar D., Sharma A. y Talukder G. (1994). Chlorophyll and chlorophyllin as modifiers of genotoxic effects. *Mutat. Res.* 318:239-247.
- Searle C. D., Harnden D., Venitt S. y Gyde O. (1975). Carcinogenicity and mutagenicity tests of some hair colourants and constituents. *Nature* 255:506-507.
- Smith S. R., Verdier M. M., Wagner E. D. y Plewa M. J. (1989). Protein content of tobacco cells in relation to the plant activation of m-phenylenediamine and 2-aminofluorene. *Environ. Mutagen. Soc.* 547. Abstracts.
- Snyderwine E.G., Sinha R., Felton J.S. y Ferguson L.R. (2002). Highlights of the eight international conference of carcinogenic/mutagenic N-substituted aryl compounds. *Mutat. Res.* 506:1-8.
- Stiborova M., Schneiser H. H. y Frei E. (2000). Oxidation of xenobiotics by plant microsomes, a reconstituted cytochrome P450 system and peroxidase: a comparative study. *Phytochemistry* 54:353-362.
- US Environmental Protection Agency. (1996). Air Quality Criteria for Particulate Matter, EPA/600/p-95/001 1aF-001cF, Office of Research and Development, Washington, D C, 1996.
- Valkova I., Vracko M. y Basak S.C. (2004). Modeling of structure-mutagenicity relationships: counter propagation neural network approach using calculated structural descriptors. *Anal. Chim. Acta* 509:179-186.
- Velemínski J. y Gichner T. (1988). Mutagenic activity of promutagens: indirect evidence of their activation. *Mutat. Res.* 197:221-242..

- Virtanen A. K. (1962). On enzymatic and chemical reaction in chruised plants. Arch. Biochem. Biophys. 1:200-208.
- Wagner E.D., Marengo M.S. y Plewa M.J. (2003). Modulation of the mutagenicity of heterocyclic amines by organophosphate insecticides and their metabolites. Mutat. Res. 536:103-115.
- Weisburger J.H. (1988). Past, present and future role of carcinogenesis and mutagenic N-substitutedaryl compounds in human cancer causation, En: *Carcinogenic and Mutagenic Responses to Aromatic Amines and Nitroarene*. Romano C.M. y Scuetzle L.J. (Eds.) Elsevier, Nueva York, pp. 3-19.
- Wilcht M. (Ed.). (1994). *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*, CRC Press, Stuttgart, pp. 81-82.
- Willet W.C. (1994). Diet and health. What should be eat. Science 254:532-537.
- Yeng G. C., Cheng H. Y. y Peng H. H. (2001) Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. Food Chem. Toxicol. 39:1045-1053.
- Young-Joon S. y Ferguson L.R. (2003). Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential-highlights of a symposium. Mutat. Res. 523:1-8
- Ysern P., Riera J., Sitjes J. y Llagostera M. (1993). Activation of 4-nitro-o-phenylenediamine by the S2 fraction of *Zea mays* to mutagenic product(s). Mutat. Res. 312:25-31.
- Zambrano F., Guzmán J., García Barajas A., Paredes L. y Delfín A. (1999). Reducción de los daños inducidos por neutrones de reactor debido a la acción antimutagénica del ácido ascórbico y la clorofilina en *Drosophila melanogaster*. Inf. Tec. GANS-99-05. ININ. México.

Zimmering S., Olvera O., Hernández M.E., Cruces M.P., Arceo C. y Pimentel E. (1990). Evidence for a radioprotective effect of chlorophyllin in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 245: 47-49.

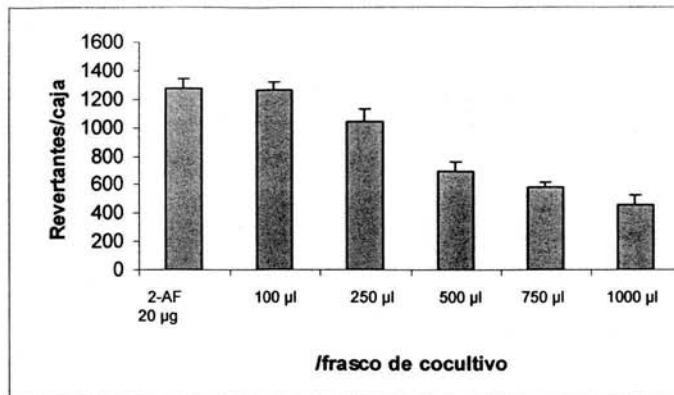


Figura 8. Evaluación del efecto antimutagénico del extracto de perejil frente a la amina aromática 2-amino fluoreno en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*.

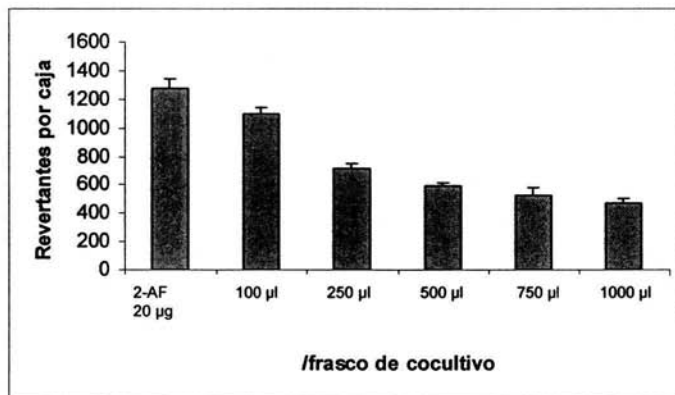


Figura 9. Evaluación del efecto antimutagénico del extracto de apio frente a la amina aromática 2-amino fluoreno en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*.

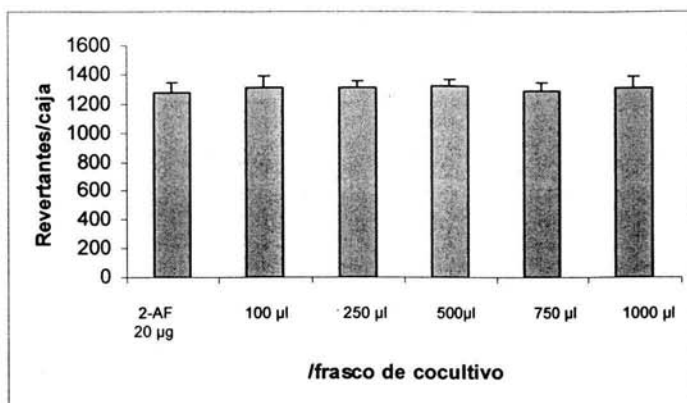


Figura 10. Evaluación del efecto antimutagénico del extracto de pepino frente a la amina aromática 2-amino fluoreno en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*.

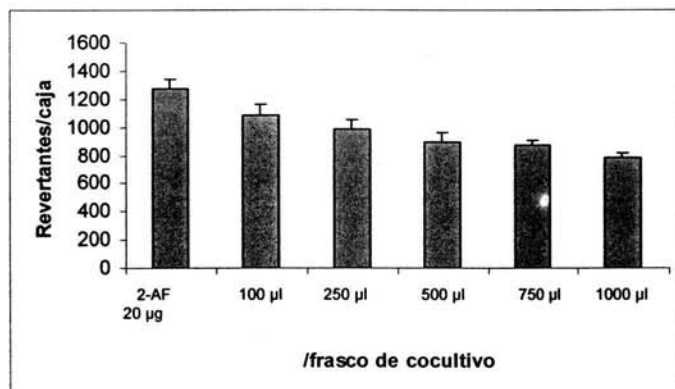


Figura 11. Evaluación del efecto antimutagénico del extracto de germinado de alfalfa frente a la amina aromática 2-amino fluoreno en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*.

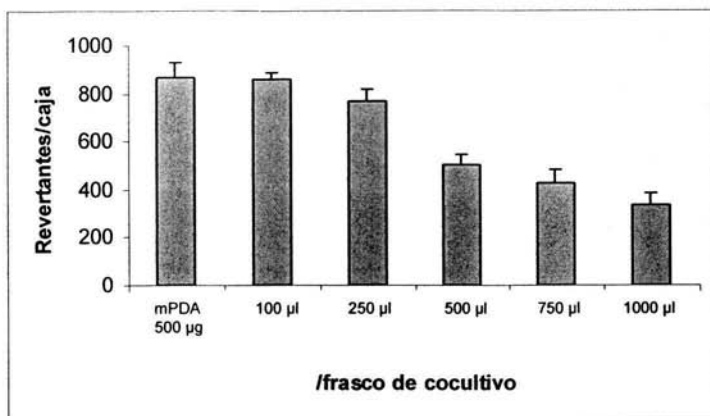


Figura 12. Evaluación del efecto antimutagénico del extracto de perejil frente a la amina aromática m-fenilendiamina en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*.

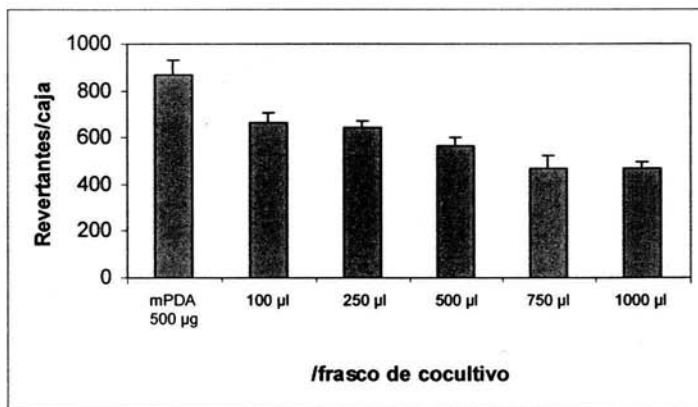


Figura 13. Evaluación del efecto antimutagénico del extracto de apio frente a la amina aromática m-fenilendiamina en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*.

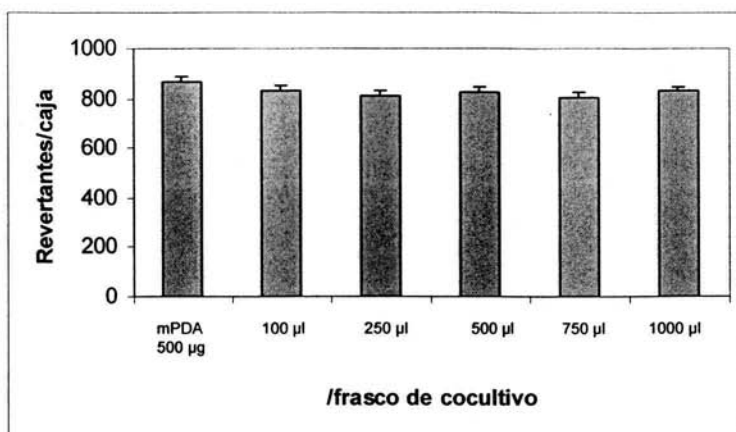


Figura 14. Evaluación del efecto antimutagénico del extracto de pepino frente a la amina aromática m-fenilendiamina en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*

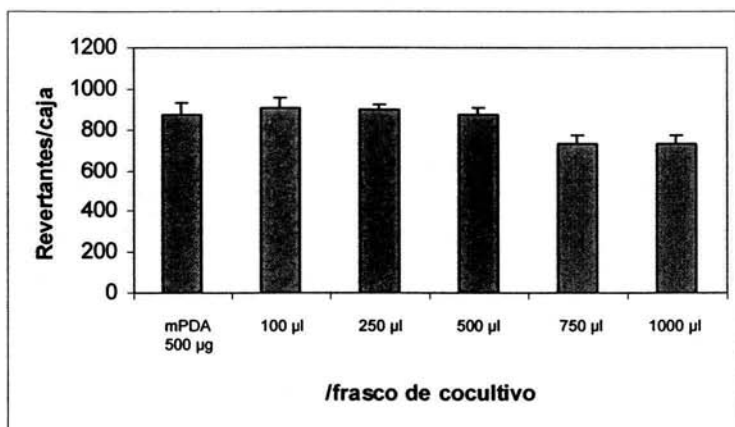


Figura 15. Evaluación del efecto antimutagénico del extracto de germinado de alfalfa frente a la amina aromática m-fenilendiamina en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*

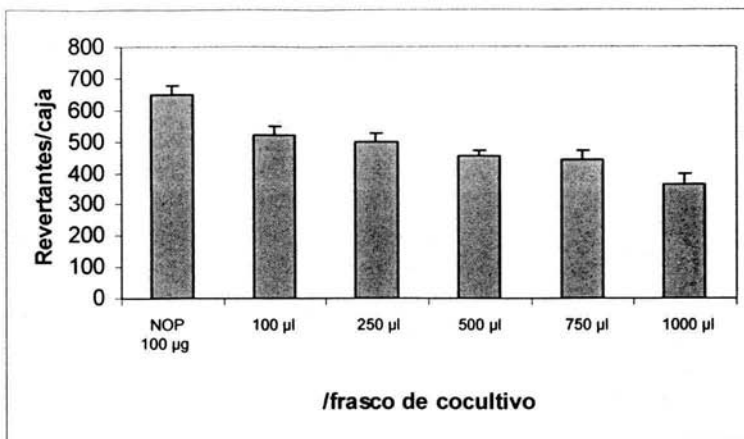


Figura 16. Evaluación del efecto antimutagénico del extracto de perejil frente a la amina aromática 4-nitro-o-fenilendiamina en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*.

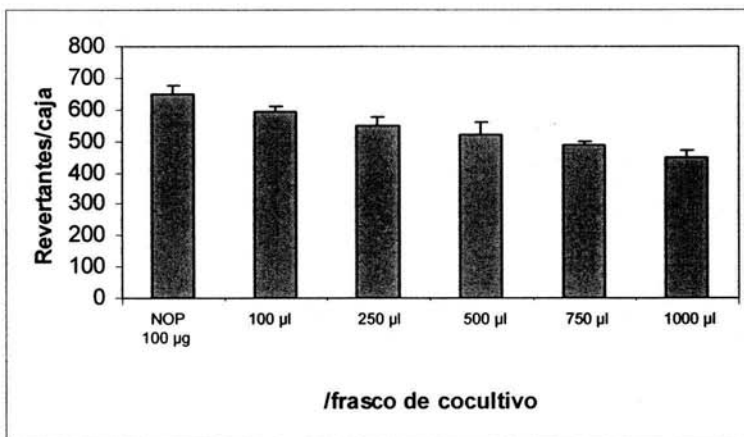


Figura 17. Evaluación del efecto antimutagénico del extracto de apio frente a la amina aromática 4-nitro-o-fenilendiamina en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*.



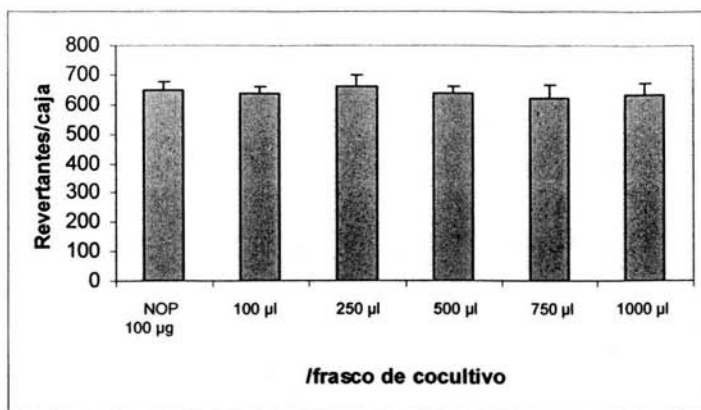


Figura 18. Evaluación del efecto antimutagénico del extracto de pepino frente a la amina aromática 4-nitro-o-fenilendiamina en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*.

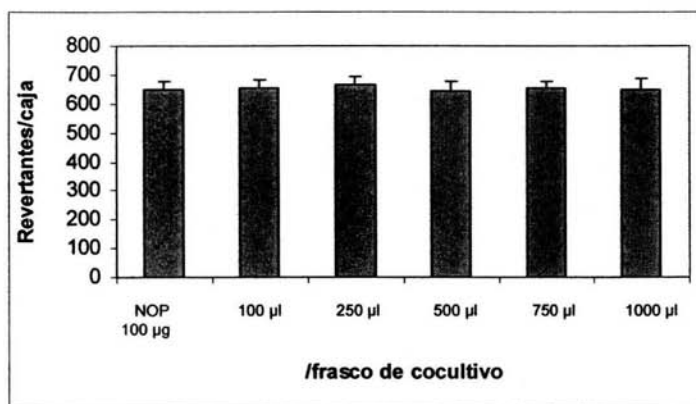


Figura 19. Evaluación del efecto antimutagénico del extracto de germinado de alfalfa frente a la amina aromática 4-nitro-o-fenilendiamina en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*.

Tabla 1. Evaluación de la antimutagenicidad de los extractos vegetales de perejil, apio, pepino y germinado de alfalfa frente a la amina aromática 2-amino fluoreno (2-AF), activada por células de tabaco *Nicotiana tabacum* en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*.

Testigos	Revertantes por caja <sup>a</sup>	
	$\bar{X} \pm E E$	
amortiguador	22 $\pm$ 1.5	
2- AF 20 $\mu$ g + amortiguador	30 $\pm$ 2	
2- AF 20 $\mu$ g + células de tabaco	1277 $\pm$ 26	
2- AF 20 $\mu$ g + células de tabaco + clorofilina 5 $\mu$ g/frasco de cocultivo	159 $\pm$ 4	
Extractos $\mu$ l/frasco de cocultivo	TA98 + 2 AF+ células vegetales	% de inhibición
<b>perejil</b>	$\bar{X} \pm E E$	
100	1264 $\pm$ 25	1.01
250	1043 $\pm$ 34*	19.02
500	696 $\pm$ 28*	45.49
750	583 $\pm$ 14*	54.34
1000	462 $\pm$ 24*	63.67
<b>apio</b>		
100	1097 $\pm$ 18*	14.09
250	718 $\pm$ 15*	43.77
500	594 $\pm$ 9*	53.48
750	528 $\pm$ 21*	58.65
1000	469 $\pm$ 12*	63.27
<b>pepino</b>		
100	1314 $\pm$ 29	0
250	1306 $\pm$ 19	0
500	1315 $\pm$ 20	0
750	1286 $\pm$ 21	0
1000	1305 $\pm$ 33	0
<b>Alfalfa</b>		
100	1089 $\pm$ 29*	14.72
250	988 $\pm$ 25*	22.63
500	891 $\pm$ 27*	30.22
750	868 $\pm$ 16*	32.02
1000	781 $\pm$ 13*	38.84

\* Se obtuvieron diferencias significativas entre los testigos y los tratamientos en el análisis de varianza con  $F = 264.18$  y  $P = 0.0001$  y por lo tanto se realizó la prueba de Neuman-Keuls para determinar las diferencias entre los tratamientos.

<sup>a</sup> = promedio de tres experimentos

Tabla 2. Evaluación de la antimutagenicidad de los extractos vegetales de perejil, apio, pepino y germinado de alfalfa frente a la amina aromática meta-fenilendiamina (m-PDA), activada por células de tabaco *Nicotiana tabacum* en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*.

Testigos	Revertantes por caja *	
	$\bar{X} + E E$	
amortiguador	22 ± 1.5	
mPDA 500 µg + amortiguador	47 ± 4	
mPDA 500 µg + células de tabaco	870 ± 25	
mPDA 500µg + células de tabaco + clorofilina 5 µg/frasco de cocultivo	97 ± 4.7	
Extractos µl/frasco de cocultivo	TA98 + mPDA + células vegetales	% de inhibición
<b>Perejil</b>	$\bar{X} + E E$	
100	862 ± 11	0.91
250	767 ± 22*	11.83
500	501 ± 17*	42.41
750	429 ± 22*	50.68
1000	337 ± 20*	62.41
<b>apio</b>		
100	667 ± 16*	23.30
250	642 ± 13*	26.20
500	569 ± 13*	34.59
750	468 ± 23*	46.20
1000	471 ± 11*	45.86
<b>pepino</b>		
100	831 ± 16	4.48
250	813 ± 17	6.55
500	828 ± 16	4.82
750	803 ± 14	7.70
1000	829 ± 18	4.71
<b>Germinado de alfalfa</b>		
100	908 ± 21	0
250	900 ± 10	0
500	869 ± 16	0.11
750	730 ± 16*	16.20
1000	729 ± 17*	16.20

\* Se obtuvieron diferencias significativas entre los testigos y los tratamientos en el análisis de varianza con  $F = 44.82$  y  $P = 0.0001$  y por lo tanto se realizó la prueba de Neuman-Keuls para determinar las diferencias entre los tratamientos.

\* = promedio de tres experimentos

Tabla 3. Evaluación de la antimutagenicidad de los extractos vegetales de perejil, apio, pepino y germinado de alfalfa frente a la amina aromática 4-nitro-o-fenilendiamina (NOP), activada por células de cilantro *Coriandrum sativum* en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*.

Testigos	Revertantes por caja *	
	$\bar{X} \pm E E$	
amortiguador	33 $\pm$ 1.7	
NOP 100 $\mu$ g + amortiguador	233 $\pm$ 32.3	
NOP 100 $\mu$ g + células de cilantro	649 $\pm$ 12	
NOP 100 $\mu$ g + células de cilantro + clorofilina 5 $\mu$ g/ frasco de cocultivo	67 $\pm$ 1.4	
Extractos $\mu$ l/frasco de cocultivo perejil	TA98 + NOP + células vegetales $\bar{X} \pm E E$	% de inhibición
100	521 $\pm$ 12*	19.72
250	496 $\pm$ 12*	23.57
500	451 $\pm$ 8*	30.50
750	440 $\pm$ 13*	32.20
1000	361 $\pm$ 14*	44.37
apio		
100	592 $\pm$ 8*	8.78
250	549 $\pm$ 10*	15.40
500	518 $\pm$ 17*	20.18
750	485 $\pm$ 6*	25.26
1000	450 $\pm$ 9*	30.66
pepino		
100	640 $\pm$ 9	1.38
250	660 $\pm$ 16	0
500	638 $\pm$ 10	1.69
750	623 $\pm$ 17	4
1000	633 $\pm$ 15	2.46
Germinado de alfalfa		
100	652 $\pm$ 13	0
250	666 $\pm$ 11	0
500	645 $\pm$ 12	0.61
750	656 $\pm$ 8	0
1000	649 $\pm$ 17	0

\* Se obtuvieron diferencias significativas entre los testigos y los tratamientos en el análisis de varianza con F = 231.59 y P = 0.0001 y por lo tanto se realizó la prueba de Neuman-keuls para determinar las diferencias entre los tratamientos.

\* = promedio de tres experimentos

Tabla 4. Resultados de la determinación de proteínas, clorofila y carotenos de los vegetales perejil, apio, pepino y germinado de alfalfa.

Vegetal	Contenido de clorofila <sup>a</sup> en mg/ml $\bar{X} \pm EE$	Contenido de carotenos <sup>a</sup> en $\mu\text{g/ml}$ $\bar{X} \pm EE$	Contenido de proteínas en $\mu\text{g/ml}$
Perejil	$2.71 \pm 0.03$	$2.012 \pm 0.002$	1.598
Apio	$1.35 \pm 0.001$	$1.23 \pm 0.004$	0.4764
Pepino	$0.145 \pm 0.002$	$0.058 \pm 0.008$	0.3615
Germinado de alfalfa	$0.56 \pm 0.001$	$0.188 \pm 0.001$	0.8325

<sup>a</sup> = Promedio de tres lecturas en el espectrofotómetro

Tabla 5. Contenido de clorofila y carotenos en los extractos vegetales de perejil, apio, pepino y germinado de alfalfa y la evaluación de su capacidad mutagénica en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*.

Extractos µl/frasco de cocultivo	TA98 revertantes por caja <sup>a</sup> $\bar{X} \pm E E$	Contenido de carotenos µg/ml	Contenido de clorofila mg/ml
<b>perejil</b>			
100	38 ± 2	0.20	0.27
250	33 ± 2	0.50	0.67
500	29 ± 2	1.00	1.35
750	31 ± 1	1.50	2.03
1000	30 ± 1	2.01	2.71
<b>apio</b>			
100	27 ± 2	0.12	0.13
250	30 ± 3	0.30	0.33
500	27 ± 1	0.61	0.67
750	28 ± 2	0.92	1.01
1000	31 ± 3	1.23	1.35
<b>pepino</b>			
100	29 ± 2	0.005	0.01
250	28 ± 2	0.012	0.03
500	29 ± 1	0.029	0.07
750	25 ± 3	0.043	0.10
1000	27 ± 2	0.058	0.14
<b>Germinado de alfalfa</b>			
100	27 ± 1	0.018	0.05
250	26 ± 2	0.047	0.14
500	30 ± 2	0.094	0.28
750	31 ± 1	0.141	0.42
1000	29 ± 2	0.188	0.56

<sup>a</sup> = promedio de tres experimentos