



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“Evaluación de la genotoxicidad de la
Naringenina, Resveratrol, Metoxi y Extracto de
Yucca periculosa por presencia de micronúcleos en
raíces de *Vicia faba*”.**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G A

PRESENTA:

MARÍA DE LOS ANGELES SÁNCHEZ ARRIOLA

DIRECTOR DE TESIS DR. SAÚL FLORES MAYA

TLALNEPANTLA, EDO. DE MÉXICO

2009





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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“Evaluación de la genotoxicidad de la Naringenina,
Resveratrol, Metoxi y Extracto de *Yucca periculosa* por
presencia de micronúcleos en raíces de *Vicia faba*”.**



Yucca periculosa

Foto tomada en www.rarepalmseeds.com

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G A

PRESENTA:

MARÍA DE LOS ANGELES SÁNCHEZ ARRIOLA
DIRECTOR DE TESIS DR. SAÚL FLORES MAYA

MÉXICO 2009

DEDICATORIA

**A mis padres Susana y Antonio por darme la vida.
Por que con su amor y ejemplo he logrado llegar al hoy y ahora.**

AGRADECIMIENTOS

A los profesores, que con su ayuda y comentarios enriquecieron este trabajo.

A mis amigos, por motivarme y acompañarme en este proceso.

A mis hermanos, por su ayuda y paciencia.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINAS
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
ANTECEDENTES.....	6
OBJETIVO.....	8
MATERIAL Y MÉTODO.....	9
RESULTADOS.....	12
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.....	15
CONCLUSIONES.....	18
BIBLIOGRAFÍA.....	19

RESUMEN

La naringenina, el resveratrol, y el metoxi (3,3',5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno) son sustancias que se encuentran en el extracto de *Yucca periculosa* y tienen propiedades principalmente anticancerígenas, anti-inflamatorias y antioxidantes. La disminución en el índice mitótico y la presencia de micronúcleos en las células son indicativos de toxicidad. En este trabajo se evaluó la toxicidad de la naringenina, el resveratrol, el metoxi y el extracto de *Yucca periculosa* en células radicales de *Vicia faba* a diferentes tiempos y concentraciones. La naringenina no tuvo ningún efecto tóxico. El resveratrol sólo provocó daño citotóxico significativo en la zona M en sus concentraciones de 0.2 y 0.4 % a 8 hrs. de exposición. El metoxi tuvo efectos citotóxicos y clastogénicos significativos en casi todas las concentraciones y tiempos de exposición. El extracto de *Yucca periculosa* tuvo un efecto clastogénico significativo en la zona F1 en concentración de 0.1 % a 2 hrs. de exposición y a concentraciones de 0.1, 0.2 y 0.4 % a 8 hrs. de exposición tanto en la zona M como en la zona F1. De acuerdo con los resultados, la naringenina y el resveratrol pueden ser utilizados sin ningún riesgo para la salud ya que no provocaron daños tóxicos significativos.

INTRODUCCIÓN

Actualmente los bioensayos con plantas son una buena alternativa para evaluar los efectos tóxicos provocados por muchas sustancias (Steinkellner *et al.*, 1998; Majer *et al.*, 2005). Una de las especies vegetales utilizada como organismo modelo para evaluar estos efectos es *Vicia faba* (fig. 1), debido a su fácil manejo, al corto período de germinación de sus semillas, al tamaño de sus células, a la cantidad y tamaño de sus cromosomas, a su división mitótica asincrónica y a la gran cantidad de células indiferenciadas en los meristemas apicales (Yi y Si, 2007).

Cuando una sustancia afecta el índice mitótico, se dice que es citotóxica. Cuando afecta al material genético se le denomina genotóxica. Existen diferentes tipos de genotoxicidad. La presencia y formación de micronúcleos es una de las formas más comunes en las que se puede evaluar el efecto genotóxico. Los micronúcleos se forman por el rompimiento de las hebras de DNA o la fragmentación de las fibras del huso mitótico lo que provoca que todos los cromosomas, sus fragmentos o un cromosoma formen núcleos más pequeños después de un ciclo de división celular. A este proceso se le da el nombre de clastogénesis (Duan *et al.*, 1999).

Se ha comprobado que sustancias como la naringenina (5,7,4'-trihidroxi-flavanona), el resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno), el metoxi (3,3',5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno) y el extracto de *Yucca periculosa* tienen propiedades anticancerígenas, anti-inflamatorias y antioxidantes. El hecho de tener importantes propiedades terapéuticas no significa que no puedan llegar a tener algún efecto citotóxico o genotóxico importante, por lo que es necesario evaluar el riesgo-beneficio de estas sustancias para su uso como fotoquimioprotectores.

La naringenina corresponde a un grupo de compuestos polifenólicos denominados flavonoides. Se encuentra en forma natural en frutas como la toronja y la naranja (Saija *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 2006). Trabajos como el de Pietta (2000), Skibola y Smith (2000) y Ross y Kasum (2002), mencionan las propiedades antialérgicas, anti-inflamatorias, vasodilatadoras, antioxidantes y anticancerígenas de los flavonoides. Estos son los encargados de dar color azul a muchas de las flores. Protegen a las plantas contra el ataque de insectos, virus y microbios, además de protegerlas de los rayos UV (Harborne y Williams, 2000).

El resveratrol es una fitoalexina presente en una gran cantidad de frutas y vegetales entre las que se encuentran las moras, nueces, cacahuates, uvas, soya y vino tinto (Dong, 2003; Piver *et al.*, 2004). El resveratrol tiene propiedades anticancerígenas, antitumorales, anti-inflamatorias y antioxidantes (Burns *et al.*, 2002). En *Yucca periculosa* el resveratrol juega un papel importante ya que induce mecanismos de defensa contra el ataque de insectos, inhibe la latencia en las semillas y favorece el crecimiento de la planta (Torres *et al.*, 2003).

El metoxi es un compuesto fenólico del grupo de los estilbenos. Se le atribuyen propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias, además de que se ha utilizado en tratamientos contra la artritis (Olas *et al.*, 2006; Cheeke *et al.*, 2006).

La *Yucca periculosa* pertenece a la familia de las agavaceas. Es conocida con el nombre común de “palmito” o “izote”. Es una especie endémica que crece en las regiones semiáridas del valle de Tehuacan-Cuicatlan, en los estados de Puebla y Oaxaca en México (Torres *et al.*, 2003).



Fig. 1. Células radiculares de *Vicia faba*. Células meristemáticas indiferenciadas, con división asincrónica, de tamaño relativamente grande (Yi y Si, 2007).

ANTECEDENTES

En los últimos años ha aumentado el consumo de flavonoides debido a sus propiedades terapéuticas y medicinales. Sin embargo, son pocos los trabajos interesados en estudiar los mecanismos de acción y las dosis de consumo adecuadas. Se ha comprobado que en dosis adecuadas estos compuestos pueden traer grandes beneficios a la salud y que en dosis elevadas pueden ser tóxicos (Skibola y Smith, 2000).

En el trabajo de Ross y Kasum, (2002) se cita a varios autores como Kuhnau quien estimó que el consumo de flavonoides en la dieta humana debe ser de 1 a 1.1 gr/día. Este mismo autor propone que el consumo de flavonoles y flavones debe ser de 115 mg/día. Hertog y colaboradores mencionan que en Holanda el consumo de flavonoles y flavones es de 23 mg/día. Más recientemente Leth y Justasen proponen que el consumo de flavonoles, flavones y flavanones debe ser de 28 mg/día (Ross y Kasum, 2002).

En el trabajo realizado por Gao *et al.* (2006), se determinó que la naringenina previene cambios mutagénicos en las células cancerosas de la próstata ya que incrementa significativamente la producción de enzimas encargadas de la reparación del DNA. En un estudio realizado por Seon–Min *et al.* (2007), se menciona que la naringenina es metabolizada por las bacterias gastrointestinales en dos ácidos fenólicos: el ácido p-hidroxifenolpropionico (PHPP) y el ácido p-hidroxibenzoico (PHB). En éste trabajo se evaluó el efecto de la naringenina y sus metabolitos sobre los niveles de colesterol y triglicéridos. Se utilizaron ratas a las cuales se les administró una dieta rica en colesterol y suplementada con naringenina mientras que a otras solo se les administró una dieta rica en colesterol. Los niveles de colesterol y triglicéridos totales en plasma disminuyen considerablemente en las ratas tratadas con naringenina y sus metabolitos. La cantidad de colesterol en hígado también disminuye considerablemente con la administración de naringenina mientras que el PHB solo afecta la disminución de los triglicéridos.

En el trabajo de Soto (2007), se determinó la actividad antioxidante de los flavonoides presentes en *Lippia graveolens*. Uno de los flavonoides encontrados fue la naringenina. De los extractos obtenidos, se observó que el extracto de acetato de etilo tiene una mayor actividad antioxidante ya que tiene un mayor número de estructuras con grupos -OH libres en posiciones estratégicas.

La estimulación e inhibición de los flavonoides tienen un profundo efecto en la función celular alterando los estados de fosforilación de “moléculas blanco” y modulando la

expresión genética. Un claro conocimiento de los mecanismos de acción de los flavonoides como antioxidantes o como moduladores de las señales celulares y su influencia en el metabolismo, son la base para evaluar la utilización de estas biomoléculas como agentes anticancerígenos, cardioprotectores e inhibidores de la neurodegeneración (Williams *et al.*, 2004).

El trabajo de Dong, (2003) menciona la importancia del resveratrol como un inhibidor de la ciclooxigenasa 1 y 2. También menciona que el resveratrol tiene una importante función en la inducción de apoptosis. Este compuesto se puede encontrar en uvas frescas en concentraciones de aproximadamente 50-100 $\mu\text{g/g}$. En el jugo comercial se encuentra como trans-resveratrol, que es una forma isomérica del resveratrol en una concentración de 4mg/l. En el vino tinto la concentración de resveratrol es de 1.5-3 mg/l.

Existen otros trabajos como el de Afaq *et al.* (2003), en el que se analiza la acción quimiopreventiva del resveratrol. En éste trabajo se administró resveratrol en forma tópica a hembras de rata carentes de pelo para después ser expuestas a rayos UV. Se observó que en las ratas tratadas con resveratrol se inhibe el incremento en el grosor de la dermis y la epidermis en un 55%. El resveratrol reduce el número de leucocitos infiltrados en estas dos capas de piel después de 24 hr. de exposición a rayos UV. Se observó también que el resveratrol inhibe la actividad de una enzima que participa en el proceso inflamatorio y en el desarrollo del cáncer. El resveratrol reduce los niveles de peróxido de hidrógeno e inhibe la peroxidación de lípidos, indicativos de estrés oxidativo.

Piver *et al.* (2004), realizaron un estudio acerca del metabolismo del trans-resveratrol y a pesar de que la información sobre este asunto es incompleta y contradictoria y que la estructura de sus metabolitos aún esta en debate, sus resultados confirman que el piceatanol y el tetrahidroxil-estilbeno son los metabolitos del trans-resveratrol.

Ahmad *et al.* (2005), determinaron la mutagenicidad del resveratrol en presencia y ausencia de iones de cobre en plásmidos de DNA. Los resultados mostraron que en concentraciones elevadas (200 μM), el resveratrol en presencia de iones de cobre disminuye la eficiencia de transformación del plásmido. El resveratrol provocó mutaciones, principalmente por deleción en las bases de guanina lo cual podría explicar la actividad anticancerígena del resveratrol en varias líneas celulares.

En una revisión realizada por Athar *et al.* (2007), se mencionan varios trabajos en los cuales se administró resveratrol. El resveratrol se ha utilizado para tratar el cáncer de mama, el cáncer de pulmón, prostático, pancreático, colorectal, esofágico, etc. La administración, dosis y tratamientos son muy variados y en la mayoría de los casos el resultado ha sido una reducción en el crecimiento de tumores, además de prevenir la formación y desarrollo de los mismos.

Torres *et al.* (2003), aislaron de la corteza de *Yucca periculosa* el 4,4'-dihidroxiestilbeno, resveratrol y 3,3',5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno (metoxi). Utilizaron estos compuestos y los correlacionaron con la inhibición del crecimiento y desarrollo de *Spodoptera frugiperda*, insecto considerado como plaga. En el trabajo realizado por Cheeke *et al.* (2006), se considera a *Yucca schidigera* como una planta medicinal con propiedades anti-inflamatorias y cuyo extracto se ha utilizado en tratamientos contra la artritis. La actividad anti-inflamatoria de esta planta podría estar determinada por la presencia de metoxi ya que se ha demostrado que este compuesto inhibe considerablemente la agregación de plaquetas. El selenio y el platino son comúnmente utilizados en tratamientos contra el cáncer pero son tóxicos y provocan cambios en la función biológica de las células sanguíneas. Olas *et al.* (2006), comprobaron que la acción combinada del metoxi con selenio y platino disminuyen significativamente los daños en el DNA de linfocitos. El metoxi inhibe también la carbonilación y reduce la oxidación de los grupos triol de proteínas en las plaquetas tratadas con platino.

OBJETIVO

Evaluar el efecto citotóxico y genotóxico provocado por naringenina, resveratrol, metoxi y extracto de *Yucca periculosa* en raíces de *Vicia faba*.

MATERIAL Y MÉTODO

Se usaron semillas secas de *Vicia faba*, las cuales fueron lavadas y posteriormente colocadas en agua desionizada por 24 hr. para reblandecer la testa. Transcurrido este tiempo, las semillas se colocaron entre dos capas de algodón humedecido con agua corriente a una temperatura de 25 °C para su germinación (aproximadamente 5-7 días). Las raíces de las semillas germinadas fueron tratadas con naringenina, resveratrol, metoxi y extracto de *Yucca periculosa* a diferentes tiempos y concentraciones (Fig.2).

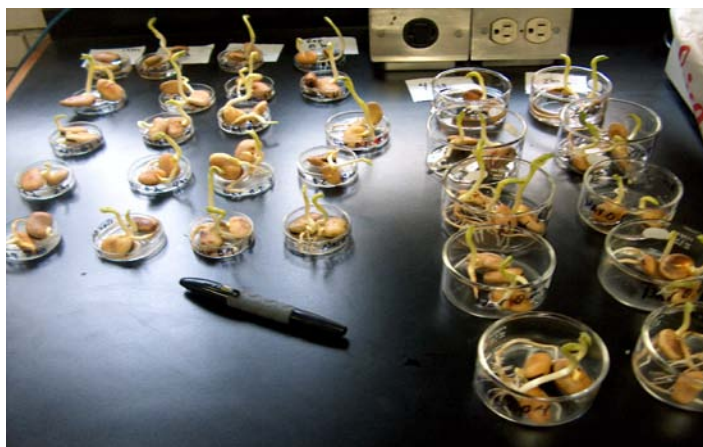


Fig. 2. Diseño experimental. Raíces de *Vicia faba* expuestas a los diferentes tratamientos.

Cada sustancia utilizada correspondió a un tratamiento y todos los tratamientos se hicieron por duplicado. Los tiempos de exposición a cada una de estas sustancias fueron de 2, 4 y 8 hrs. Las concentraciones utilizadas fueron de 0.1, 0.2 y 0.4 %. Para calcular el porcentaje del índice mitótico (%IM) y el porcentaje de micronúcleos (%MNC), se prepararon tres laminillas por cada uno de los tiempos de exposición y concentraciones utilizadas en cada uno de los tratamientos. Se utilizó glicerina al 0.2% y agua como controles negativos (Tabla 1).

La naringenina, el resveratrol y el metoxi se aislaron del extracto de *Yucca periculosa* por cromatografía de columna abierta sobre gel de sílice y cromatografía de capa fina con cromatofolios de aluminio cubiertos con gel de sílice. Las separaciones cromatográficas automatizadas se realizaron en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución. El extracto se obtuvo por maceración de la corteza de *Yucca periculosa* con metanol. Posteriormente los sólidos se concentraron a presión reducida y se lavaron con

hexanos para obtener el extracto metanólico libre de grasas. El extracto metanólico se sometió a pruebas de absorción en la región UV-B con un espectrofotometro Perkin Elmer UV/Vis Lambda 25.

Después de que las raíces fueron expuestas a los diferentes tratamientos, se les colocó en agua corriente por 72 hrs. para su recuperación. Transcurrido este tiempo, las puntas de las raíces se fijaron en solución Carnoy (ácido acético glacial y etanol en proporción 1:3) a 4°C por una noche. Se hidrolizaron en ácido clorhídrico (HCl) 1N a 60°C durante 5 a 7 min. (Askin y Sultan Aslantürk, 2007). Después se lavaron las raíces con agua destilada y se colocaron en una solución de etanol al 70%.

Para determinar el %IM se cortó un milímetro de la raíz por arriba de la cofia (zona meristemática o zona M) y se maceró sobre un porta objetos (Ma *et al.*, 1995). Se agregó aceto-orceina al 1% para teñir la muestra y se observó al microscopio a un aumento de 40X. Se contaron mil células por laminilla y se obtuvo el número de células en interfase, profase, metafase, anafase y telofase. El %IM se calculó sumando el número de células en profase, metafase, anafase y telofase, el resultado se dividió entre mil y se multiplicó por cien.

Para obtener el %MNC se cortó un milímetro de la raíz por encima de la zona meristemática. A esta región de la raíz se le conoce como zona F1 y es usada como referencia eficiente para registrar la presencia y formación de micronúcleos (fig. 3), con un índice mitótico de aproximadamente 4% (Ma *et al.*, 1995). Se maceró sobre un porta objetos y se agregó aceto-orceina al 1%. La laminilla se observó al microscopio a un aumento de 40X. Se contó el número de micronúcleos observados en mil células, se dividió entre mil y se multiplicó por 100.

Para evaluar el efecto citotóxico y genotóxico de los diferentes tratamientos, a los diferentes tiempos y concentraciones, se realizó una prueba ANOVA factorial. Para determinar que pares de medias fueron estadísticamente diferentes se realizó la prueba de Dunnett (Duan *et al.*, 1999; Durán *et al.*, 2005).

Tabla 1. Número de semillas, raíces, laminillas y células utilizados para determinar el %IM y el %MNC en el tratamiento con naringenina.

TRATAMIENTOS	NÚMERO DE SEMILLAS	NÚMERO DE RAÍCES	NÚMERO DE LAMINILLAS	NÚMERO DE CEL. X LAM PARA %IM	NÚMERO DE CEL. X LAM PARA %MCN
AGUA (CONTROL -)	3	3	3	1000	1000
GLICERINA 0.2%	3	3	3	1000	1000
					1000
NARINGENINA 0.1% 2 HS	3	3	3	1000	1000
NARINGENINA 0.2% 2 HS	3	3	3	1000	1000
NARINGENINA 0.4% 2 HS	3	3	3	1000	1000
NARINGENINA 0.1% 4HS	3	3	3	1000	1000
NARINGENINA 0.2% 4 HS	3	3	3	1000	1000
NARINGENINA 0.4% 4 HS	3	3	3	1000	1000
NARINGENINA 0.1% 8 HS	3	3	3	1000	1000
NARINGENINA 0.2% 8 HS	3	3	3	1000	1000
NARINGENINA 0.4% 8 HS	3	3	3	1000	1000
TOTAL	27	27	27	27000	27000

*Se utilizaron las mismas concentraciones y tiempos de exposición para los tratamientos con resveratrol, metoxi y extracto de *Yucca periculosa*. El número de semillas, raíces, laminillas y células fue el mismo para todos los tratamientos.

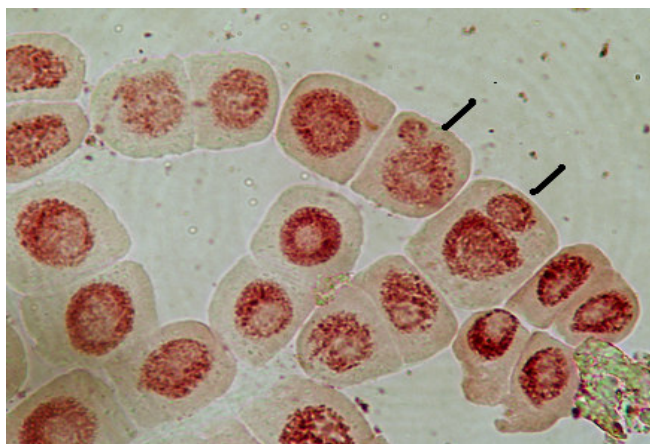


Fig. 3. Presencia de micronúcleos en células radiculares de *Vicia faba* (zonaF1).

RESULTADOS

Para evaluar el daño citológico provocado en raíces de *Vicia faba* por la naringenina, el resveratrol, el metoxi y el extracto de *Yucca periculosa*, se obtuvo el porcentaje del índice mitótico (fig. 4) y el porcentaje de micronúcleos (fig. 5).

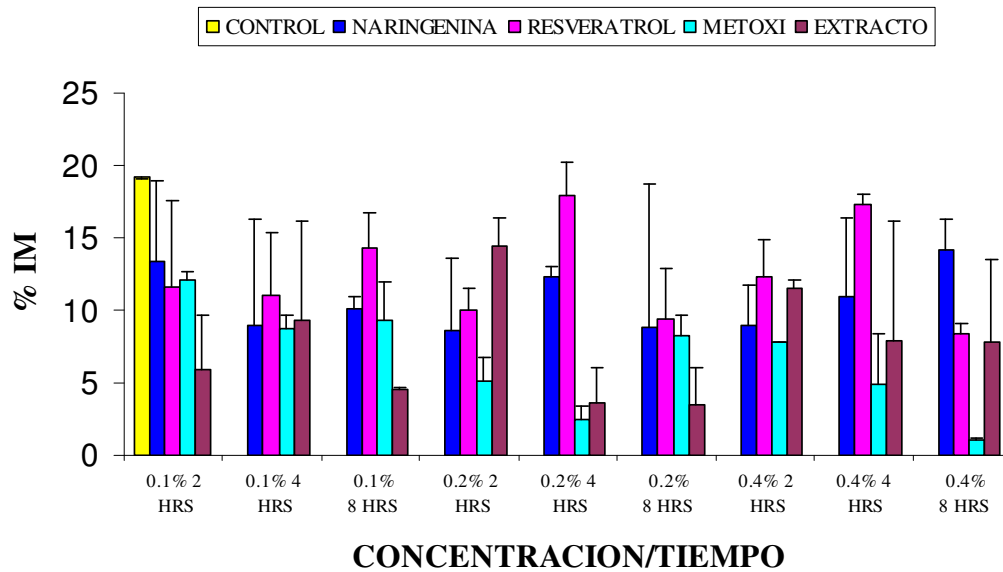


Fig. 4. Porcentaje del índice mitótico en la zona meristemática.

Los análisis estadísticos (ANOVA factorial y prueba de Dunnett, con un valor de significancia $p < 0.05$), demostraron que la naringenina no provocó daños citotóxicos ni clastogénicos significativos en ninguna de sus tres concentraciones y en ninguno de los tiempos de exposición, excepto en la concentración de 0.1% y 8 hrs. de exposición con un valor para $F_0 = 3.05$ y para $F_t = 2.12$, donde si se observó un daño estadísticamente significativo en la zona F1 (Tabla 2).

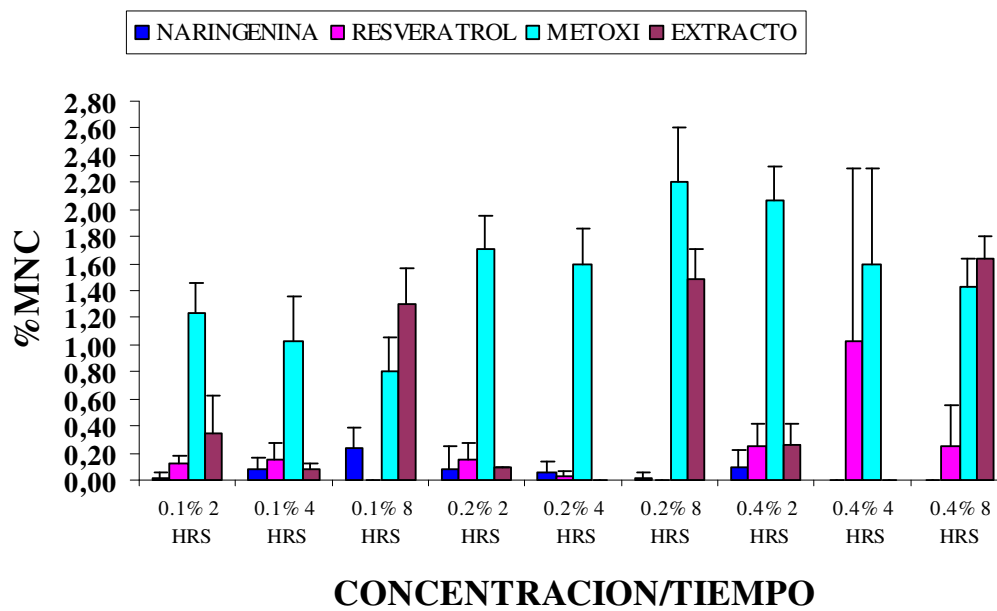


Fig. 5. Porcentaje de micronúcleos en la zona F1.

El resveratrol en concentraciones de 0.1, 0.2 y 0.4 % a 2 y 4 hrs. de exposición no disminuyó el %IM ni en la zona M ni en la zona F1. En concentración de 0.1% y 8 hrs de exposición, el resveratrol no tuvo efecto citotóxico significativo en la zona M. En la zona F1, el resveratrol en concentraciones de 0.1, 0.2 y 0.4 % y 8 hrs. de exposición tampoco tuvo efecto citotóxico significativo. En concentraciones de 0.2 y 0.4 % y un tiempo de exposición de 8 hrs., el resveratrol en la zona M, tuvo un efecto citotóxico con un valor de $F_o = 3.33$ y de $F_t = 3.02$. El grado de clastogenicidad provocado por el resveratrol en concentraciones de 0.1, 0.2 y 0.4 % en tiempos de exposición de 2, 4 y 8 hrs. no fue significativo ni para la zona M ni para la zona F1 (Tabla 2).

El metoxi provocó un daño citotóxico significativo en la zona M en sus concentraciones de 0.1, 0.2 y 0.4 % y tiempos de exposición de 2, 4 y 8 hrs. con un valor de $F_o = 19.92$ y un valor para $F_t = 3.02$. En la zona F1 no se observó daño citotóxico significativo ni en las concentraciones ni en los tiempos de exposición. El daño clastogénico provocado por el metoxi en la zona M fue significativo para las concentraciones de 0.1, 0.2 y 0.4 % a 2 hrs. de exposición; 0.2 y 0.4 % a 4 hrs. de exposición y a concentraciones de 0.2 y 0.4 % a 8 hrs. de exposición con una $F_o = 11.22$ y una $F_t = 2.10$. La concentración de 0.1 % a 4 y 8 hrs. de exposición no provocó daños clastogénicos significativos en la zona M. En la zona F1 el metoxi provocó daños clastogénicos significativos en sus tres

concentraciones y tiempos de exposición con un valor para $F_0= 20.5$ y para $F_t= 2.08$ (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto sobre el índice mitótico y la frecuencia de micronúcleos de la naringenina, el resveratrol, el metoxi y el extracto de *Yucca periculosa*.

COMPUESTO	% INDICE MITÓTICO $\pm DS$		% MICRONUCLEOS $\pm DS$	
	ZONA M	ZONA FI	ZONA M	ZONA FI
AGUA (CONTROL -)	18.95 \pm 3.9	4.55 \pm 3.74	0 \pm 0	0 \pm 0
GLICERINA 0. 2%	19.15 \pm 0.07	8.34 \pm 6.92	0.1 \pm 0.14	0 \pm 0
NARINGENINA 0.1% 2 HS	13.37 \pm 5.62	7.97 \pm 1.94	0.0 \pm 0.0	0.02 \pm 0.04
NARINGENINA 0.2% 2 HS	8.55 \pm 5.02	6.93 \pm 1.30	0.04 \pm 0.05	0.08 \pm 0.17
NARINGENINA 0.4% 2 HS	8.95 \pm 2.8	4.05 \pm 1.83	0.0 \pm 0.0	0.10 \pm 0.12
NARINGENINA 0.1% 4HS	9 \pm 7.3	6.73 \pm 1.45	0.08 \pm 0.11	0.08 \pm 0.08
NARINGENINA 0.2% 4 HS	12.37 \pm 0.67	7.25 \pm 3.04	0.0 \pm 0.0	0.06 \pm 0.08
NARINGENINA 0.4% 4 HS	10.95 \pm 5.4	5.05 \pm 1.90	0.02 \pm 0.04	0.0 \pm 0.0
NARINGENINA 0.1% 8 HS	10.1 \pm 0.84	2.60 \pm 0.0	0.16 \pm 0.15	*0.24 \pm 0.15
NARINGENINA 0.2% 8 HS	8.82 \pm 9.86	5.83 \pm 4.98	0.0 \pm 0.0	0.02 \pm 0.04
NARINGENINA 0.4% 8 HS	14.22 \pm 2.08	7.03 \pm 0.38	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
RESVERATROL 0.1% 2HS	11.62 \pm 5.9	6.05 \pm 4.10	0.075 \pm 0.09	0.13 \pm 0.05
RESVERATROL 0.2% 2HS	10 \pm 1.55	3.28 \pm 1.24	0.175 \pm 0.15	0.15 \pm 0.13
RESVERATROL 0.4% 2HS	12.27 \pm 2.58	4.15 \pm 0.35	0.70 \pm 0.96	0.25 \pm 0.17
RESVERATROL 0.1% 4HS	11.10 \pm 4.24	6.35 \pm 5.97	0.05 \pm 0.05	0.15 \pm 0.13
RESVERATROL 0.2% 4HS	17.9 \pm 2.33	4.70 \pm 1.70	0.025 \pm 0.05	0.025 \pm 0.05
RESVERATROL 0.4% 4HS	17.3 \pm 0.70	4.73 \pm 1.30	0.60 \pm 0.71	1.03 \pm 1.27
RESVERATROL 0.1% 8HS	14.3 \pm 2.4	6.30 \pm 2.33	0.075 \pm 0.15	0.0 \pm 0.0
RESVERATROL 0.2% 8HS	*9.37 \pm 3.57	3.10 \pm 0.14	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
RESVERATROL 0.4% 8HS	*8.35 \pm 0.70	2.33 \pm 1.30	0.0 \pm 0.0	0.25 \pm 0.31
METOXI 0.1% 2HS	*12.13 \pm 0.56	1.65 \pm 0.63	*1.38 \pm 0.49	*1.23 \pm 0.23
METOXI 0.2% 2HS	*5.09 \pm 1.60	4.10 \pm 1.83	*1.78 \pm 0.61	*1.70 \pm 0.40
METOXI 0.4% 2HS	*7.75 \pm 0.07	3.35 \pm 0.77	*2.10 \pm 0.77	*2.06 \pm 0.21
METOXI 0.1% 4 HS	*8.74 \pm 0.92	2.15 \pm 0.49	0.95 \pm 0.17	*1.03 \pm 0.33
METOXI 0.2% 4HS	*2.41 \pm 0.96	2.20 \pm 1.27	*1.38 \pm 0.44	*1.60 \pm 0.25
METOXI 0.4% 4HS	*4.83 \pm 3.6	1.70 \pm 1.83	*1.70 \pm 0.67	*1.60 \pm 0.41
METOXI 0.1% 8HS	*9.36 \pm 2.63	2.20 \pm 0.85	0.63 \pm 0.16	*0.80 \pm 0.26
METOXI 0.2% 8HS	*8.21 \pm 1.43	2.25 \pm 0.49	*2.40 \pm 0.69	*2.21 \pm 0.70
METOXI 0.4% 8HS	*1.06 \pm 0.09	1.15 \pm 0.63	*1.38 \pm 0.43	*1.43 \pm 0.40
EXTRACTO 0.1% 2 HS	5.92 \pm 3.7	5.10 \pm 2.97	0.15 \pm 0.05	*0.35 \pm 0.28
EXTRACTO 0.2% 2 HS	14.42 \pm 2.0	4.45 \pm 5.30	0.10 \pm 0.0	0.10 \pm 0.0
EXTRACTO 0.4% 2 HS	11.47 \pm 0.67	5.43 \pm 1.16	0.17 \pm 0.09	0.27 \pm 0.15
EXTRACTO 0.1% 4HS	9.32 \pm 6.8	4.00 \pm 2.68	0.05 \pm 0.05	0.08 \pm 0.05
EXTRACTO 0.2% 4 HS	3.57 \pm 2.5	2.72 \pm 2.36	0.02 \pm 0.05	0.0 \pm 0.0
EXTRACTO 0.4% 4 HS	7.87 \pm 8.3	3.05 \pm 0.99	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
EXTRACTO 0.1% 8 HS	4.55 \pm 0.14	4.40 \pm 3.39	*1.37 \pm 0.27	*1.30 \pm 0.26
EXTRACTO 0.2% 8 HS	3.5 \pm 2.6	1.45 \pm 0.35	*1.60 \pm 0.21	*1.48 \pm 0.22
EXTRACTO 0.4% 8 HS	7.82 \pm 5.7	2.40 \pm 0.21	*1.90 \pm 0.16	*1.63 \pm 0.17

* Diferencias significativas entre los tratamientos y el control negativo según la prueba de Dunnett, con un valor de significancia $p < 0.05$.

El extracto de *Yucca periculosa* no provocó daños citotóxicos en ninguna de las concentraciones y tiempos de exposición utilizados en este trabajo ni en la zona M ni en la zona F1 (Tabla 2). El extracto de *Yucca periculosa* provocó daño clastogénico significativo en la concentración 0.1 % y 2 hrs. de exposición en la zona F1. En la zona M no se observó daño clastogénico significativo en las concentraciones de 0.1, 0.2 y 0.4 % a 2 y 4 hrs. de exposición. En la zona F1, el extracto de *Yucca periculosa* no provocó daños significativos en sus concentraciones de 0.2 y 0.4 % a 2 hrs. de exposición y en las concentraciones de 0.1, 0.2 y 0.4 % a 4 hrs. de exposición. El extracto de *Yucca periculosa* en sus tres concentraciones y 8hrs de exposición sí tuvo actividad clastogénica estadísticamente significativa tanto en la zona M como en la zona F1 con un valor de $F_o = 70.46$ y de $F_t = 2.21$ (Tabla 2).

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

La naringenina y el resveratrol no provocaron daños citotóxicos ni clastogénicos significativos en ninguna de las concentraciones y tiempos utilizados en este experimento, excepto los ya mencionados. No hubo una relación entre la concentración y el tiempo de exposición a naringenina y resveratrol. Si no existen efectos tóxicos significativos en las raíces de *Vicia faba* se puede pensar que la actividad biológica de estos dos compuestos no se vio afectada por las concentraciones y tiempos utilizados. Por lo tanto su uso principalmente como protectores de la piel contra rayos UV, es el más recomendable. Estos resultados concuerdan con el trabajo realizado por Saija *et al.* (1998), quienes proponen que la naringenina puede ser utilizada con éxito como fotoprotector y que este efecto puede ser mayor si se administra con D-limonina o lecitina ya que estos dos compuestos incrementan la permeación de la naringenina en la piel. Gao *et al.* (2006), comprobaron que la naringenina estimula la producción de enzimas reparadoras del DNA en células cáncerosas de la próstata. Soto (2007), menciona que la actividad antioxidante de los flavonoides depende de su estructura química, de la posición y número de sustituciones en el núcleo del flavonoide y en el anillo B. La presencia de la doble ligadura en el C-2 y C-3 así como un -OH en C-3' y C-4', son indispensables para incrementar la actividad antioxidante de los flavonoides. Seon-Min *et al.* (2007), mencionan que la disminución de los niveles de colesterol y

triglicéridos totales en plasma, en ratas tratadas con naringenina, se debe a que está y sus metabolitos inhiben la actividad de la HMGR y de la ACAT, una reductasa y una acetiltransferasa respectivamente.

Por otra parte se ha comprobado que la aplicación de resveratrol en la piel antes de ser expuesta a los rayos UV reduce considerablemente la formación de edemas ya que se reduce la infiltración de leucocitos entre la dermis y la epidermis. En Estados Unidos una de cada siete personas sufre de algún tipo de cáncer de piel. Una de las principales causas de esta enfermedad es la exposición a la radiación solar. El resveratrol podría usarse como quimiopreventivo en la iniciación, progresión y promoción del proceso de carcinogénesis (Afaq *et al.*, 2003).

Ahmad *et al.* (2005), observaron que a altas concentraciones de resveratrol (200 μM) disminuye la eficiencia de transformación del plasmido bluescript SK (+) y que en presencia de iones de cobre aumenta el porcentaje de mutaciones por delección. En una revisión hecha por Masten (2002), se mencionan varios estudios sobre la toxicidad del resveratrol. En algunos sistemas biológicos, concentraciones de 50 μM de resveratrol pueden provocar citotoxicidad mientras que en otros sistemas estas mismas concentraciones no producen ningún efecto.

Falta analizar si la sobreexposición y la aplicación de la naringenina y el resveratrol en otros sistemas biológicos no causan algún daño significativo antes de ser administrados en humanos (Askin y Sultan Aslantürk, 2007).

El efecto citotóxico provocado por el metoxi en la zona M aumentó al incrementar la concentración y el tiempo de exposición con un valor para $F_o = 5.28$ y $F_t = 3.63$. En la zona F1 no se observó daño citotóxico significativo y el efecto del metoxi no dependió ni de la concentración ni de el tiempo de exposición. Esto quizá se debió a que en la zona F1 el índice mitótico normal es de aproximadamente 4% (Ma, *et al.*, 1995). Al aumentar la concentración del metoxi aumentó el %MNC en la zona M con un valor para $F_o = 13.66$ y para $F_t = 3.23$. En la zona F1 también aumentó el %MNC al incrementar la concentración del metoxi con un valor para $F_o = 25.71$ y $F_t = 3.23$. El daño clastogénico provocado por el metoxi no dependió de el tiempo de exposición (Tabla 2). Los efectos citotóxicos y clastogénicos provocados por el metoxi lo hacen un compuesto con alto grado de toxicidad comparado con el control y los demás compuestos utilizados. El metoxi es un compuesto cuya actividad biológica no esta muy estudiada. Aunque los trabajos de Cheeke *et al.* (2006) y Olas *et al.* (2006), han

comprobado la actividad anti-inflamatoria del metoxi, quizás sean otros los mecanismos de acción en células meristemáticas de *Vicia faba* por lo que en este trabajo resultó ser tóxico. El metoxi actúa inhibiendo considerablemente la agregación de plaquetas reduciendo la oxidación de los grupos triol en las proteínas. Inhibe la carbonización y reduce los daños en el DNA de linfocitos.

El daño clastogénico provocado por el extracto de *Yucca periculosa* en la zona M, aumentó al incrementarse la concentración y el tiempo de exposición con un valor para $F_o = 5.32$ y $F_t = 2.73$. En la zona F1 el daño clastogénico solo se eleva si aumenta el tiempo de exposición. En este caso el valor de $F_o = 257.63$ y el de $F_t = 3.35$. Las concentraciones del extracto de *Yucca periculosa* y los tiempos de exposición no afectaron el %IM ni en la zona M ni en la zona F1 (Tabla 2).

La presencia del metoxi en el extracto de *Yucca periculosa* pudo ser el responsable del daño clastogénico provocado en las raíces de *Vicia faba* pues es el único compuesto que mostró una genotoxicidad importante en sus tres concentraciones y tiempos de exposición. Para afirmar esto sería interesante determinar si la concentración del metoxi en el extracto es menor o mayor a las utilizadas en el tratamiento con metoxi.

CONCLUSIONES

La naringenina y el resveratrol no tuvieron efecto tóxico en las raíces de *Vicia faba* ya que no disminuyen el %IM y no aumentan la frecuencia de micronúcleos en ninguna de las concentraciones y tiempos utilizados.

El metoxi en sus tres concentraciones y tiempos de exposición tuvo un grado de toxicidad importante sobre las raíces de *Vicia faba* pues afecta el proceso de división celular disminuyendo el %IM y aumentando en forma significativa la frecuencia de micronúcleos.

El extracto de *Yucca periculosa* en las concentraciones y tiempos utilizados en este trabajo, no afectaron el proceso de división celular, sin embargo en un período de exposición de 8 hrs. en cualquiera de las tres concentraciones sí incrementó la frecuencia de micronúcleos tanto en la zona M como en la F1 y por lo tanto puede considerarse como ligeramente tóxico.

Son tantas las propiedades y beneficios (principalmente en salud) atribuidos a la naringenina, el resveratrol y el metoxi que pueden tener un sin fin de aplicaciones. Esto no significa que no puedan ser tóxicos, por eso es necesario realizar más estudios sobre las dosis, según su aplicación y uso.

BIBLIOGRAFÍA

Afaq, F., Vaqar, M. A. y Nihal, A. 2003. Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 186: 28-37.

Ahmad, A., Farhan, A. S., Saurabh, S. y Hadi, S. M. 2005. Prooxidant activity of resveratrol in the presence of cooper ions: Mutagenicity in plasmid DNA. *Toxicology Letters*. 159: 1-12.

Askin, C. T. y Sultan Aslantürk, O. 2007. Cytotoxic and genotoxic effects of *Lavandula stoechas* aqueous extracts. *Biologia Bratislava. Section Cellular and Molecular Biology*. 62 (3): 292-296.

Athar, M., Jung Ho, B., Xiuwei, T., Kwang Ho, K., Levy, K., Bickers, D. R. y Kim, A. L. 2007. Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 224: 274-283.

Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M. E. J. y Crozeir, A. 2002. Plant Foods and Herbal Sources of Resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 3337-3340.

Cheeke, P. R., Piacente, S. y Oleszek, W. 2006. Anti-inflammatory and anti-arthritic effects of *Yucca schidigera*: A review. *Journal Inflammation*. 3: 1-7.

Dong, Z. 2003. Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. *Mutation Research*. 523 (524): 145-150.

Duan, C., Hu, B., Jiang, X., Wen, C., Wang, Z. y Wang, Y. 1999. Genotoxicity of water samples from Dianchi lake detected by the *Vicia faba* micronucleus test. *Mutation Research*. 426: 121-125.

Durán, D. A., Cisneros, A. E. y Vargas, A. 2005. Bioestadística. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Pp. 27-49.

Gao, K., Henning, S. M., Niu, Y., Youssefian, A. A., Seeram, N. P., Xu, A. y Heber, D. 2006. The citrus flavonoid naringenin stimulates DNA repair in prostate cancer cell. *Journal of Nutricional Biochemistry*. 17: 89-95.

Harborne, J. B. y Williams, C. A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 55: 481-504.

Ma, T. H., Xu, Z., Xu, C., McConnell, H., Valtierra, R. E., Arreola, G. A. y Zhang, H. 1995. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research*. 334: 185-195.

Masten, S. 2002. Trans-Resveratrol. Review of Toxicological Literature. National Institute of Environmental Health Sciences. North Carolina. U.S.A. 54 pp.

Majer, B. J., Grummt, T., Uhi, M. y Knasmüller, S. 2005. Use Plant Biossays for the detection of genotoxins in the Aquatic Environmental. *Acta Hydrochimica et hydrobiologica*. 33: 45-55.

Olas, B., Wachowicz, B., Majsterek, I., Blasiak, J., Stochmal, A. y Oleszek, W. 2006. Antioxidant properties of trans-3,3',5,5'-tetrahydroxy-4'-methoxystilbene against modification of variety of biomolecules in human blood cells treated with platinum compounds. *Journal Nutrition*. 22: 1202-1209.

Pietta, P. G. 2000. Reviews. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*. 63: 1035-1042.

Piver, B., Maude, F., Vitrac, X., Merillon, J. M., Dreano, I., Berthou, F. y Lucas, D. 2004. Involvement of cytochrome P450 1 A2 in the biotransformation of trans-resveratrol in human liver microsomas. *Biochemical Pharmacology*. 68 (4): 773-782.

Ross, J. A. y Kasum, C. M. 2002. Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annual Review Nutrition*. 22: 19-34.

Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., Giacchi, M., De Pasquale, A. y Bonina, F. 1998. Influence of different penetration enhancers on in vitro skin permeation and in vivo photoprotective effect of flavonoids. *International Journal of Pharmaceutics*. 175: 85-94.

Seon-Min, J., Hae-Kyung, K., Hye-Jin, K., Gyeong-Min, D., Tae-Sook, J., Yong, B. P. y Myung-Sook, C. 2007. Hypocholesterolemic and antioxidative effects of naringenin and its two metabolites in high-cholesterol fed rats. *Translational Research*. 149: 15-21.

Skibola, C. F. y Smith, M. T. 2000. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology and Medicine*. 29 (3- 4): 375-383

Soto, H. M. 2007. Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK var. *Berlandieri* Schauer). *Revista Fitotecnia Mexicana. Sociedad Mexicana de Fitogenética*, A. C. 30: 43-49.

Steinkellner, H., Mun-Sik, K., Helma, C., Ecker, S., Ma, T. H., Horak, O., Kundi, M. y Knasmüller, S. 1998. Genotoxic effects of heavy metals: Comparative investigation with plant bioassays. *Environmental Molecular Mutagenesis*. 31: 183-191.

Torres, P., Ávila, J. G., Romo de Vivar, A., García, A. M., Marín, J. C., Aranda, E. y Céspedes, C. L. 2003. Antioxidant and insect growth regulatory activities of stilbenes and extracts from *Yucca periculosa*. *Phytochemistry*. 64: 463-473.

Williams, R. J., Spencer, P. E. J., y Rice-Evans, C. 2004. Serial Review: Flavonoids and Isoflavones (Phytoestrogens): Absorption, Metabolism, and Bioactivity. *Free Radical Biology and Medicine*. 36: 838-849.

Yi, H. y Si, L. 2007. *Vicia* root-micronucleus and sister chromatid. Exchange assays on the genotoxicity of selenium compounds. *Mutation Research*. 630: 92-96.