



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**REDUCCIÓN DE LA MUTAGENICIDAD DE LOS PRODUCTOS
DEL METABOLISMO VEGETAL DE 4-NITRO-O-
FENILENDIAMINA (NOP) SOBRE *Salmonella typhimurium*
POR EXTRACTOS DE FRUTAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA :

PAOLA MONTSERRAT ZARAGOZA OJEDA



TUTORA

DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A todas aquellas personas que directa o indirectamente participaron en la realización de este trabajo ayudándome dentro del laboratorio, revisando resultados, leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dándome ánimo, brindándome su amor y cariño, pero sobre todo acompañándome en mis momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

A mi directora de tesis la Dra. Sandra Gómez Arroyo por siempre apoyarme con su conocimiento durante el desarrollo de este trabajo, por toda la paciencia, dedicación y cariño que me brindo durante mi formación académica y por el estímulo para seguir creciendo académica y personalmente.

A la Dra. Martha Elena Mora Herrera por todo el tiempo, apoyo, amistad y asesoría académica que me brindo para poder realizar los experimentos de determinación de antioxidantes, sin ella esto no hubiera sido posible.

A la Dra. Josefina Cortés Eslava por el apoyo técnico y académico que me brindo durante el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros y personal del Laboratorio de Citogenética Ambiental del Centro de Ciencias de la Atmósfera por su amistad, los consejos y todo el apoyo dentro y fuera del laboratorio.

Agradezco al PAPITT (Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica) Proyecto No. IN112510 por el otorgamiento de beca para la realización de este trabajo, así como por el apoyo financiero brindado.

Índice

Resumen	1
1. Introducción	2
1.1 Metabolismo vegetal de agentes xenobióticos	3
1.1.1 <i>Vicia faba</i>	6
1.2 Aminas aromáticas	7
1.2.1 4-nitro-o-fenilendiamina (NOP)	8
1.3 Actividad antimutagénica de compuestos vegetales.....	9
1.3.1 Clorofilina	11
1.4 Sistemas biológicos de prueba	12
1.4.1 Ensayo de Ames	13
2. Objetivos	15
3. Hipótesis	15
4. Metodología	16
4.1 Preparación de extractos de fruta	16
4.2 Obtención de fracción enzimática	16
4.2.1 Determinación de la actividad peroxidasa y contenido de proteínas	17
4.3 Ensayo de Ames	18
4.3.1 Preparación de las bacterias	18
4.3.2 Ensayo de mutagenicidad y antimutagenicidad	19
4.4 Cuantificación de antioxidantes	20
4.4.1 Compuesto fenólicos	20
4.4.2 Flavonoides	20
4.4.3 Acido ascórbico	21
4.4.4 Antocianinas	21
4.4.5 Actividad antioxidante	22
4.5 Evaluación de datos	22
5. Resultados	23
6. Discusión	33
7. Conclusiones	39
8. Referencias	40

Resumen

Se ha comprobado que muchos de los productos químicos utilizados en la actualidad son promutágenos que pueden ser activados por el metabolismo vegetal, esto es una amenaza a la salud pública ya que el hecho de que las plantas puedan activar promutágenos a mutágenos podría hacer que las personas que no están en contacto directamente con los mutágenos tengan una exposición a ellos al consumir alimentos contaminados. Las aminas aromáticas son un grupo de compuestos con importancia tanto comercial como ambiental, ya que son utilizadas para la síntesis de tintes, fármacos, plásticos, plaguicidas y productos derivados del petróleo. La 4-nitro-o-fenilendiamina (NOP) es un mutágeno directo, sin embargo, su mutagenicidad se potencia por medio del metabolismo enzimático de las plantas. Los productos del metabolismo vegetal pueden causar daño al unirse covalentemente a proteínas o formando radicales libres. El estrés oxidante que se provoca por los radicales libres se ha asociado con algunas enfermedades como el cáncer, problemas cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas, además de causar daño a proteínas, DNA y lípidos. En la actualidad se está viviendo un cambio en el que ya no solo se buscan propiedades nutritivas en los alimentos, sino que comienza a tomar importancia que contengan agentes benéficos para la salud; existen varios estudios epidemiológicos que han comprobado que un alto consumo de frutas y vegetales está asociado a la reducción de algunas enfermedades. Esto se debe a la gran variedad de compuestos y enzimas que pueden inhibir o reducir los daños oxidantes provocados por factores tanto internos como externos. El objetivo de este proyecto fue determinar si los extractos de fresa, manzana y piña podían reducir el daño mutagénico provocado por la amina aromática 4-nitro-o-fenilendiamina (NOP) aplicada de forma directa o activada como producto del metabolismo vegetal de *Vicia faba*, para lo cual se utilizó como modelo el ensayo de Ames con la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*.

Los resultados mostraron que el extracto de fresa tiene el mayor efecto antimutagénico, mientras que los extractos de piña y manzana solo reducen la mutagenicidad cuando la NOP se encuentra activada. Se hicieron pruebas para cuantificar los contenidos de antioxidantes presentes en los extractos de fruta con el fin de comprobar si éstos eran los responsables del efecto antimutagénico. Los contenidos de antioxidantes de los extractos de fresa y manzana presentaron valores parecidos en las pruebas de compuestos fenólicos, antocianinas y flavonoides, mientras que el extracto de piña mostró valores significativamente más bajos que las otras frutas pero iguales a los de la clorofilina. La actividad antioxidante también fue más alta en los extractos de manzana y fresa. El contenido de ácido ascórbico más alto se encontró en el extracto de piña y no se detectó en el extracto de manzana. Sin embargo en los resultados de antimutagenicidad el extracto de fresa tuvo porcentajes de inhibición muy superiores a los de la manzana.

1. Introducción

El aumento de la población a nivel mundial ha provocado que haya una transformación en la industria y la agricultura. Para obtener mejores producciones en menor tiempo, en la actualidad se utilizan muchos productos químicos que son eficientes para el control de las plagas pero potencialmente tóxicos para los trabajadores que utilizan estos productos y para sus familias. Algunos de estos compuestos son mutágenos, es decir son capaces de producir modificaciones en el DNA. Se han detectado varios tipos de alteraciones estructurales en las células que son producidos por la acción directa de algunos mutágenos, también pueden provocar muerte celular o muchos tipos de mutaciones que posiblemente se relacionan con la fase inicial de varias enfermedades en los seres humanos. El contacto del hombre con los posibles mutágenos no solo ocurre por exposiciones laborales, ciertos compuestos pueden permanecer en el agua, el suelo, el aire y en varios alimentos (Plewa y Gentile, 1982).

Algunos mutágenos actúan de forma directa sobre el DNA, mientras que otros tienen que ser transformados previamente en compuestos activos mediante la acción de diversas enzimas y así provocar daño. A los compuestos que por sí mismos no son mutagénicos y que requieren de la activación metabólica para ejercer dicho efecto se les denomina promutágenos o mutágenos indirectos. Por mucho tiempo se pensó que los promutágenos solo podían activarse por el metabolismo de animales, sin embargo, cuando se comenzaron a utilizar plantas para investigaciones citogenéticas se demostró que éstas también tienen la capacidad de activar promutágenos (Plewa y Gentile, 1982).

Aunque el proceso de transformación es similar en plantas y animales, existen algunos compuestos que son activados únicamente por el metabolismo vegetal; este tipo de compuestos son de gran importancia ya que la mayoría de los productos agroquímicos que se utilizan en la actualidad se consideran inocuos porque solo se probó su efecto genotóxico utilizando el metabolismo animal. Sin embargo, existen reportes de que algunos de éstos se activan con el metabolismo vegetal de varias especies, lo cual aumenta el riesgo de un transporte de los mutágenos activados por las plantas a la alimentación de los seres humanos (Plewa y Gentile, 1982; Sandermann, 1988; Seo *et al.*, 1993; Coleman *et al.*, 1997).

La presencia de mutágenos y promutágenos activos en el ambiente, no solo constituye un problema a nivel ecológico, es también un riesgo para toda la población expuesta directa o indirectamente a ellos, ya que los mutágenos directos así como los productos del metabolismo vegetal de los promutágenos pueden provocar daño al DNA y otras moléculas al conjugarse o unirse covalentemente a ellas; además, durante el metabolismo de xenobióticos se pueden generar radicales libres altamente reactivos que causan lesiones a componentes celulares como ácidos grasos, fosfolípidos, colesterol, DNA y proteínas, además de estar asociados a procesos de degeneración y enfermedades neurodegenerativas. De aquí la importancia de buscar la forma de inhibir o reducir el daño que éstos pueden causar al ser humano.

En los últimos años se han descubierto e identificado gran cantidad de compuestos que tienen acción antimutagénica. Los compuestos antimutagénicos pueden actuar bloqueando el efecto que provocan los productos del metabolismo de xenobióticos o reparando los daños inducidos en las células. Muchos de estos compuestos son de origen natural y se encuentran en los alimentos que se consumen normalmente en las dietas humanas. Se ha reportado una asociación entre el contenido de antioxidantes y el efecto antimutagénico de algunas sustancias. Las frutas contienen una mezcla de sustancias como compuestos fenólicos (tocoferol, flavonoides y antocianinas), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de clorofila y aminoácidos), pigmentos (carotenos, xantofilas y clorofilas) y vitaminas como E y C, que en conjunto le dan a las frutas alta capacidad antioxidante y por tanto las hace candidatas a ser potentes antimutágenos (Velioglu *et al.*, 1998; Wang y Lin, 2000; Zuo *et al.*, 2002).

1.1 Metabolismo vegetal de agentes xenobióticos

Las plantas se encuentran expuestas a numerosos xenobióticos a causa de la contaminación por derivados químicos industriales o por el uso de herbicidas y plaguicidas. Ya que muchos de estos productos resultan tóxicos o mutagénicos para las plantas, existen mecanismos cuya función es desactivarlos. Uno de estos mecanismos es la transformación metabólica, la cual involucra una o más reacciones catalizadas por enzimas que resultan en la conversión de la molécula extraña en derivados que son químicamente distintos al xenobiótico de origen; sin embargo, aunque la función principal de este proceso es desactivar a los xenobióticos, en algunos casos sucede exactamente lo contrario, los derivados de estas reacciones resultan

iguales o más tóxicos que el compuesto original (Coleman *et al.*, 1997). Esto se ha comprobado en compuestos como los plaguicidas que contienen sustancias promutagénicas. El proceso por el cual un compuesto químico es transformado a un mutágeno por la acción enzimática de una planta se conoce como activación vegetal; éste es similar al que ocurre con las enzimas del hígado en los mamíferos, sin embargo se ha demostrado que durante la activación vegetal algunos de los productos que se forman son diferentes a los que se originan en el metabolismo animal e incluso la existencia de compuestos químicos que únicamente se activan a través del metabolismo vegetal (Plewa y Gentile, 1982; Plewa *et al.*, 1993; Gómez-Arroyo *et al.*, 2006).

En general las reacciones responsables de la transformación metabólica de los xenobióticos en las plantas constan de 2 fases: en la I se realizan las reacciones de activación y en la II las de conjugación. Durante la fase I las reacciones más importantes son las de oxidación, catalizadas en su mayoría por el sistema de citocromos P-450. Los citocromos P-450 son una clase de enzimas presentes en casi todas las plantas, son proteínas de membrana que usualmente actúan como monooxigenasas. La función primaria de estas enzimas es la biosíntesis de esteroides, hormonas y metabolitos específicos como alcaloides, isoprenoides o derivados de aminoácidos. Su función secundaria es catalizar reacciones en el metabolismo de xenobióticos como herbicidas, insecticidas u otros contaminantes, ya que existen muchas isoformas de estas enzimas que pueden reaccionar con gran variedad de sustratos. Además de las reacciones catalizadas por el citocromo P-450 existen otras enzimas como las peroxidasas, que participan en la aceleración del proceso de oxidación de diversas clases de xenobióticos. Las peroxidasas son muy estables y están presentes en casi todos los tejidos de las plantas, catalizan dos tipos de reacciones de oxidación: la clásica reacción de peroxidación que requiere de H_2O_2 y reacciones que utilizan oxígeno molecular. Las peroxidasas pueden llevar a cabo reacciones de oxidación de grupos metil aromáticos, descarboxilaciones, hidroxilaciones de anillos, condensaciones oxidantes de fenoles y aminas aromáticas. Durante la fase II los productos activos de la fase I se unen covalentemente a alguna molécula hidrofílica endógena para formar un conjugado soluble en agua; estos conjugados se exportan al citosol y se transportan a vacuolas o al apoplasto donde se almacenan, ya que en las plantas no existen sistemas excretores (Plewa y Gentile, 1982; Gentile *et al.*, 1985; Sandermann, 1988; Plewa *et al.*, 1991; Seo *et al.*, 1993; Coleman *et al.*, 1997).

Los productos iniciales, intermediarios y finales del metabolismo vegetal pueden seguir dos rutas, provocar daño directamente en la planta o al ser conjugados se inactivan dentro de la planta, pero al ser consumidos por animales o por el hombre se vuelvan reactivos de nuevo. Algunos de estos productos tienen sitios altamente reactivos que pueden provocar daño al unirse covalente a moléculas como proteínas, lípidos o directamente al DNA. Además, durante el proceso de transformación se pueden generar radicales libres o especies reactivas de oxígeno capaces de afectar proteínas y causar lesiones a componentes celulares, incluyendo a la membrana y el aparato mitótico, lo que produce hemicigosis, expresión recesiva de genes o rompimientos de cromosomas por radicales de oxígeno (Sandermann, 1988).

Existen dos formas para comprobar la activación metabólica vegetal de un compuesto químico. Los experimentos *in vivo* en los cuales se expone a una planta viva intacta al compuesto químico a probar y posteriormente se hace un extracto de esta planta y se agrega a un organismo indicador de daño genético y los experimentos *in vitro* en los cuales el compuesto a probar se incubaba con homogeneizados o con células de un tejido de la planta y se aplican a un organismo indicador como microorganismos o cultivos celulares de mamíferos o de plantas (Plewa y Gentile, 1982; Gentile *et al.*, 1986; Sandermann, 1988).

Plewa y Gentile (1982) mencionan que para asegurar que el compuesto a probar fue activado por el metabolismo vegetal, se debe separar el proceso de activación y el indicador genético usado para probar la mutagenicidad. Por lo que el ensayo de Ames resulta muy eficiente para realizar estos experimentos, cambiando el sistema de activación S9 de hígado de rata por homogeneizados de plantas. Las fracciones vegetales son preparadas con diversas especies y pueden provenir de diferentes tejidos, sean o no fotosintéticos, como callos, meristemas apicales y bulbos, entre otros. Estos extractos han demostrado ser altamente efectivos y eficientes al activar promutágenos (Gentile y Gentile, 1991). Algunas de las plantas que han demostrado capacidad de activación de promutágenos son: tulipán, tabaco, algodón, zanahoria, *Tradescantia*, chícharo, maíz, papa, trigo, *Arabidopsis*, cilantro, haba, entre otras.

1.1.1 *Vicia faba*

El haba, cuyo nombre científico es *Vicia faba*, es una especie dicotiledónea perteneciente a la familia de las fabáceas. Es una planta herbácea, anual, de 0.6 a 1.6 m de altura. Su lugar de origen es el continente asiático, Asia Central y la región mediterránea. Es una de las plantas más utilizadas para estudios de los efectos citogenéticos que provocan los contaminantes ambientales (Gómez-Arroyo *et al.*, 2006; Sánchez-Estrada, 2008).

Las características de *V. faba* como biomonitor están basadas en que es un sistema económico y fácilmente manejable, ya que no requiere equipo sofisticado para la detección del daño cromosómico y es muy sensible al efecto de los plaguicidas. Debido a que tiene un ciclo celular corto, las puntas de las raíces de *V. faba* tienen una proporción alta de células en diferentes estados de mitosis; esto resulta muy útil como sistema de prueba experimental ya que ofrece excelentes resultados para el análisis de aberraciones cromosómicas y de intercambio de cromátidas hermanas (Gómez-Arroyo *et al.*, 1995; Gómez-Arroyo *et al.*, 2006).

Diversos compuestos químicos han sido probados en *V. faba* para conocer el daño citogenético que producen. Cuando los insecticidas organofosforados: paratión metílico, dimetoato, foxim y azinfos metílico fueron aplicados en varias concentraciones directamente a los cultivos de linfocitos humanos, los resultados fueron negativos o débilmente positivos en el ensayo de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) (Gómez-Arroyo *et al.*, 1987). Sin embargo, cuando se trató a *V. faba* con los insecticidas organofosforados y se aplicaron los extractos que contenían los metabolitos a los cultivos de linfocitos, se elevaron significativamente las frecuencias de ICH en todas las concentraciones probadas (Gómez-Arroyo *et al.*, 1988). Este mismo resultado se obtuvo con los insecticidas carbámicos metomilo y molinate (Gómez-Arroyo *et al.*, 1992; Valencia-Quintana *et al.*, 1993).

El hecho de que los resultados con los linfocitos fueran negativos mientras que con los extractos de *V. faba* fueron positivos, se debe a que es metabólicamente activa ya que posee enzimas localizadas en la fracción S10. La fracción enzimática S10 se obtiene de células de raíz y contiene microsomas del retículo endoplásmico con múltiples enzimas citocromos CYP450 y peroxidasas (De Flora *et al.*, 1992; Gómez-Arroyo *et al.*, 1992; Gómez-Arroyo *et al.*, 1995). Este sistema enzimático transforma a los promutágenos en metabolitos genotóxicos o en productos que son muy reactivos con el DNA. A partir de estos resultados se han desarrollado

experimentos en los que se agrega la fracción enzimática S10 de *V. faba* como sistema de activación metabólica a sistemas bacterianos como el ensayo de Ames o a linfocitos humanos en cultivo con el fin de evaluar la genotoxicidad de los productos del metabolismo vegetal de varios compuestos agroquímicos (Gómez-Arroyo *et al.*, 2006).

1.2 Aminas aromáticas

Las aminas aromáticas son una clase de compuestos químicos que presentan en su estructura anillos aromáticos con uno o varios sustituyentes amino. Existen tres tipos de aminas aromáticas: monocíclicas, policíclicas y heterocíclicas. Tienen importancia tanto comercial como ambiental, ya que en las industrias son utilizadas para la síntesis de plásticos, tintes, fármacos, productos derivados del petróleo y plaguicidas. Se encuentran también como contaminantes ambientales en forma de gases derivados de la combustión de diesel, madera y hule, en el humo de cigarro y se pueden generar al cocinar en parrillas o a altas temperaturas carne de todo tipo (DeBruin *et al.*, 1999; DeBruin y Josephy, 2002; Janghel *et al.*, 2005).

Algunos de estos compuestos aromáticos pueden intercalarse con el DNA, provocando que en el proceso de replicación o reparación genética ocurran mutaciones de corrimiento de marco de lectura, ya que el mRNA se sintetiza a partir del DNA alterado. La potencia de un mutágeno como éste puede incrementarse de 10 a 100 veces más cuando contiene un radical o sustituyente que pueda reaccionar covalentemente con el DNA (Ames *et al.*, 1972).

Está comprobado que cuando las aminas aromáticas monocíclicas sufren pequeñas modificaciones en su estructura química se incrementa su mutagenicidad. Igualmente se sabe que un grupo de éstas, las fenilendiaminas, son promutágenos que pueden ser activados por el metabolismo de mamíferos y de plantas, su actividad y reactividad son dependientes del tipo de activación metabólica. Por la asociación de estos productos con las plantas, entendiendo que se potencia su mutagenicidad con el metabolismo vegetal, es necesario el estudio del impacto ambiental así como los efectos en la salud que éstos pueden tener (Gentile *et al.*, 1985; Gentile y Plewa, 1988; Seo *et al.*, 1993; Chung *et al.*, 1997).

1.2.1 4-nitro-o-fenilendiamina (NOP)

Es una amina aromática derivada de la anilina (Fig. 1). Es usada en la industria para la producción de plaguicidas, colorantes para piel, tintes para cabello, explosivos, fármacos, entre otros (EPA, 1980). Se reporta como genotóxica en la prueba de letales recesivos ligados al sexo en *Drosophila* y en recombinación mitótica de levaduras (Natarajan y Obe, 1986), induce aberraciones cromosómicas en células de mamífero en cultivo (Perry y Searle, 1977), es un mutágeno directo para *S. typhimurium* por lo que se utiliza rutinariamente en la prueba de Ames como testigo positivo, en especial para la cepa TA98 (Zeiger *et al.*, 1981; Gentile *et al.*, 1985, 1986). No produce aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos ni incrementa la frecuencia de micronúcleos en ratones (Searle *et al.*, 1975; Niedziela *et al.*, 1991).

Por la similitud estructural que tiene con los metabolitos de algunos herbicidas, se utiliza como modelo en diferentes estudios de activación metabólica, tanto con sistemas animales como con vegetales (Lamoreux y Frear, 1979). Diversos estudios demuestran que la NOP no se activa con S9 de hígado de rata, siendo el metabolismo vegetal el único capaz de transformarla en un mutágeno de mayor potencia; este resultado se asocia con un contaminante orgánico que existe en la NOP comercial (NOPX), que es un promutágeno activado únicamente por el metabolismo vegetal (Blair *et al.*, 1985; Gentile *et al.*, 1985).

Para dilucidar el mecanismo de activación de la NOP, el grupo de Gentile (1985) probó diferentes enzimas como las peroxidasas de rábano (HRP), cloroperoxidasa (CP) y lactoperoxidasa (LP), las cuales aumentaron la mutagenicidad de la NOP aun en ausencia de H₂O₂, lo que sugiere un mecanismo de oxidación más que de peroxidación y sobre la glutatión peroxidasa (GP) no tuvo efecto. Las preparaciones con mayor actividad peroxidasa fueron las más eficientes al activar la NOP, sugiriendo que la activación ocurre por un mecanismo de oxidación peroxidásica o nitrorreducción (Gentile *et al.*, 1985, 1986; Gentile y Gentile, 1991).

La activación vegetal de la NOP está comprobada en el ensayo de Ames, empleando S9 de tabaco (*Nicotiana tabaccum*) y S9 de chícharo (*Pisum sativum*) en la cepa TA98 (Gentile *et al.*, 1985, 1986), S2 de maíz (*Zea mays*) en las cepas TA98 y TA100 (Ysern *et al.*, 1994), células de cilantro (*Coriandrum sativum*) en la cepa TA98 (Cortés-Eslava *et al.*, 2001) y S10 de haba (*Vicia faba*) en las cepas TA98 y TA100 (Sánchez-Estrada, 2008).

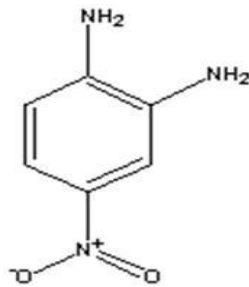


Figura 1. Estructura química de la 4-nitro-o-fenilendiamina.

1.3 Actividad antimutagénica de compuestos vegetales

Existen compuestos capaces de inhibir o reducir la mutagenicidad de algunos agentes químicos así como de los productos de su metabolismo; a estos agentes se les llama antimutágenos. En un principio los antimutágenos se utilizaron para estudiar el mecanismo de activación de algunos promutágenos, pero en la actualidad se busca con ellos poder prevenir mutaciones que puedan resultar en enfermedades. Los antimutágenos pueden actuar de tres formas: previniendo la formación de compuestos genotóxicos, bloqueando o neutralizando radicales libres o activando a los sistemas de reparación del DNA (Gentile y Gentile, 1991; Wagner *et al.*, 2003).

Por su modo de acción, los antimutágenos se clasifican en dos grupos, aquellos que inactivan física o enzimáticamente al mutágeno para impedir que se produzca un daño en el DNA se conocen como desmutágenos, mientras que aquellos que interfieren en la fijación de la mutación o activan los mecanismos de reparación del DNA se llaman bio-antimutágenos (Kada y Shimoi, 1987; Wagner *et al.*, 2003).

Las plantas contienen gran cantidad de compuestos bioactivos capaces de inhibir o retardar el efecto de algunos mutágenos. Estudios epidemiológicos han demostrado que los patrones de la dieta están altamente asociados a la prevención de enfermedades relacionadas con mutaciones y que el consumo de frutas y verduras que contienen compuestos antioxidantes como vitaminas C y E, carotenos, clorofila y polifenoles son un importante factor de protección a la salud, ya que los antioxidantes tienen la capacidad de inhibir o retrasar la oxidación de otras moléculas, neutralizando radicales libres, descomponiendo peróxidos o inhibiendo los sistemas enzimáticos (Velioglu *et al.*, 1998; Fogliano *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2002; Zuo *et al.*, 2002; García *et al.*, 2004).

Existen muchos estudios en los que se comprueba la actividad antimutagénica de extractos de plantas en diferentes sistemas biológicos; por ejemplo, se ha reportado que los monoterpenoides de plantas inhiben o retrasan el desarrollo de carcinoma mamario en ratas inducido directa o indirectamente (Simić *et al.*, 1998), extractos de *Origanum majorana* reducen la cantidad de micronúcleos y aberraciones cromosómicas en ratones, además tienen actividad antimutagénica en células de raíz de *V. faba* frente a la mutagenicidad inducida por azida de sodio (Qari, 2008). Sangwan y cols. (1998) realizaron estudios con una serie de flavonoides fenólicos, sus resultados indican que muchos de ellos son fuertes inhibidores de la activación metabólica de las aflatoxinas B₁ por la S9 de hígado rata. Vegetales como el brócoli, betabel, cebollín, rábano, espinaca y tomates tienen actividad antimutagénica contra 2-amino-3-metil[4,5-f]quinolina (MeIQ) (Edenharder *et al.*, 1994).

El grupo de Ikken (1998) realizó un estudio del efecto antimutagénico de extractos de frutas y verduras frente a la mutagenicidad inducida por 4 N-nitrosaminas activadas por la fracción S9 de hígado de rata en el ensayo de Ames cepa TA100, sus resultados mostraron que cuando la mutagenicidad es inducida por N-nitrosodimetilamina (NDMA) el efecto antimutagénico de los extractos tiene el siguiente orden: cebolla > kiwi = manzana > zanahoria > ajo > piña > brócoli; con N-nitrosopirrolidina (NPYR) los resultados fueron manzana > brócoli > kiwi > cebolla = piña; con N-nitrosodibutilamina (NDBA) zanahoria > ajo > brócoli > cebolla > kiwi y con N-nitrosopiperidina (NPIP) los resultados fueron ajo > kiwi > brócoli > pimienta verde > piña > zanahoria > cebolla = manzana. El efecto antimutagénico de los extractos de fruta frente a las N-nitrosaminas activadas se ha probado también en los ensayos 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-bromuro-difeniltetrazolio (MTT) y 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) (Martínez *et al.*, 1998).

1.3.1 Clorofilina

La sal más empleada en investigaciones biológicas de antimutagénesis es la clorofilina cupri-sódica, sal derivada de la clorofila. Está conformada por un anillo tetrapirrólico que contiene puentes dobles conjugados con un metal al centro, en este caso el cobre (Fig. 2). Existen estudios que demuestran que la clorofilina tiene la capacidad de inhibir la actividad de gran cantidad de mutágenos, como los nitropirenos, compuestos nitrosos, hidrocarburos policíclicos y aminas aromáticas; esto está comprobado mediante ensayos genéticos, desde el de Ames con *S. typhimurium* hasta con líneas celulares de mamíferos (Ong *et al.*, 1986; García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2007).

Se han propuesto varios mecanismos por los cuales la clorofilina protege al DNA, uno de ellos es mediante la inhibición enzimática del sistema de activación metabólica, o bien interactuando directamente con el mutágeno, constituyendo complejos. Puede formar compuestos covalentes con aminas heterocíclicas lo que impide el establecimiento de enlaces covalentes del mutágeno con el DNA. Hadnagy y Seemayer (1988) obtuvieron las primeras evidencias de que inactiva radicales libres y especies reactivas de oxígeno. Estas evidencias sugieren que la clorofilina es más efectiva protegiendo en contra de mutágenos de acción indirecta (Arimoto *et al.*, 1993; García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2007).

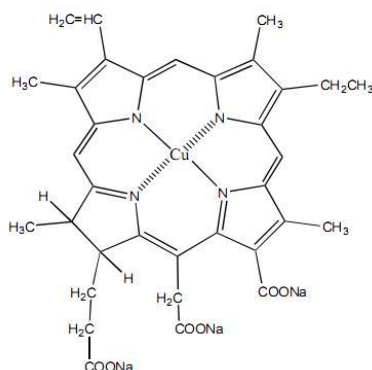


Figura 2. Estructura química de la clorofilina cupri-sódica.

1.4 Sistemas biológicos de prueba

La identificación de sustancias capaces de inducir mutaciones ha sido un tema muy estudiado, por la relación que tiene con la salud del ser humano. En el hombre las alteraciones genéticas se detectan cuando éstas ya han ocurrido, ya que por razones éticas no es posible realizar experimentación en él. Con el fin de detectar el daño provocado por gran variedad de sustancias presentes en el ambiente y evaluar el riesgo que éstas representan para la salud de las personas, se han desarrollado diversos sistemas de prueba para detectar sustancias posiblemente mutagénicas y/o carcinógenas. Los sistemas de prueba utilizan desde modelos *in vitro* como bacterias y células vegetales o animales en cultivo hasta organismos completos para pruebas *in vivo* (Toney y Claxton, 1983; Mortelmans y Zeiger, 2000).

Los sistemas que utilizan bacterias como modelo iniciaron en 1951 cuando el grupo de Demerec utilizó la prueba de mutación reversa de *Escherichia coli* para probar 31 compuestos de los cuales 19 resultaron mutagénicos. En 1971 Bruce Ames publica una metodología para la identificación de sustancias mutagénicas utilizando cepas mutantes de *Salmonella typhimurium*. En 1971 Malling fue el primero en combinar esta técnica con un sistema metabólico exógeno, ya que las cepas de *S. typhimurium* carecen de un sistema metabólico, para demostrar la promutagenicidad de la dimetilnitrosamina, para lo cual empleó el sistema metabólico de mamífero. En 1975 el grupo de Ames publica un protocolo detallado en el que se incorpora el uso del sistema metabólico de mamífero y establecen el “ensayo de Ames” como una prueba rutinaria para la búsqueda de mutágenos y carcinógenos potenciales. A través de los años el protocolo original del ensayo de Ames se ha modificado para aumentar la sensibilidad de la prueba (Toney y Claxton, 1983; Mortelmans y Zeiger, 2000).

1.4.1 Ensayo de Ames

El ensayo de Ames identifica sustancias que producen daños genéticos, lo que se traduce en mutaciones. Se utiliza una variedad de cepas modificadas de *Salmonella typhimurium* que tienen un defecto en uno de los genes involucrados en la biosíntesis de histidina, lo que las hace dependientes de este aminoácido (auxotrofas), por lo cual son incapaces de crecer en un medio que no lo contenga. Cuando las cepas están en contacto con una sustancia mutagénica, ésta puede provocar una nueva mutación que restaura el defecto en el operón de histidina y las revierte al estado silvestre, recuperando la capacidad de sintetizar histidina (prototrofa) y pueden entonces crecer en un medio mínimo. Las bacterias que regresan al estado silvestre se conocen como revertantes y forman colonias que son claramente visibles sobre un fondo de bacterias auxotróficas que no se desarrollan. El número de colonias revertantes que aparecen por placa después del tratamiento es relativo a la mutagenicidad que induce la sustancia que se está probando (Maron y Ames, 1983; O' Hare y Atterwill, 1995; Mortelmans y Zeiger, 2000). Cada cepa revierte espontáneamente a una frecuencia característica, sin embargo existe una ligera variación en el número de revertantes espontáneas de día a día o de laboratorio a laboratorio, por lo tanto se debe obtener el valor histórico de reversión espontánea de cada cepa en los distintos laboratorios (Mortelmans y Zeiger, 2000).

Las cepas de *S. typhimurium* que se utilizan, tienen diferentes mutaciones en varios sitios del operón de histidina, cada una está diseñada para identificar diferentes tipos mutaciones como sustituciones de pares de bases (cepas TA100 y TA1535) o corrimientos de marco de lectura (cepas TA98 y TA1538). Adicionalmente, algunas cepas tienen modificaciones para hacerlas más sensibles, como la mutación *rfa* que provoca pérdida parcial de la membrana de polisacáridos lo que incrementa la permeabilidad a moléculas grandes que no penetrarían normalmente la membrana. La delección del gen *uvr-B-bio*, que elimina el mecanismo de reparación por escisión lo que evita que las lesiones sean corregidas, esta mutación se extiende al gen de biotina y lo que ocasiona que la bacteria tenga dependencia por este aminoácido. También pueden contener el plásmido pKM101 que potencia la mutagénesis inducida por la luz UV y por agentes químicos, además de conferirle resistencia a ampicilina (Mortelmans y Zeiger, 2000).

Gran parte de la literatura sobre antimutágenos es probada con sistemas biológicos bacterianos, siendo el ensayo de Ames el más utilizado ya que es una prueba fácil, flexible y funcional para la evaluación de propiedades antimutagénicas de compuestos químicos puros o mezclas complejas. Si esta prueba se emplea apropiadamente, incluso puede ayudar a entender el mecanismo involucrado en la antimutagénesis (De Flora *et al.*, 1992; Bunkova *et al.*, 2005).

Las ventajas de este ensayo son que se obtienen resultados en poco tiempo, normalmente tres o cuatro días, tiene relativamente bajo costo y puede ser utilizada para probar compuestos puros o mezclas complejas. Como la mayoría de las pruebas de laboratorio tiene limitantes. Ha sido cuestionado por varios autores, ya que las bacterias no poseen un sistema metabólico que efectúe biotransformaciones, aunque esto se ha resuelto agregando fracciones enzimáticas de hígado de mamífero o fracciones enzimáticas de plantas. Adicionar un sistema de activación metabólica permite identificar compuestos promutagénicos y además es posible probar los productos o metabolitos del mismo (Maron y Ames, 1983; Plewa *et al.*, 1984; De Flora *et al.*, 1992).

En este trabajo se utilizó la cepa TA98 de *S. typhimurium* en las pruebas de mutagenicidad y antimutagenicidad. Las características de la cepa son: es histidina-dependiente, contiene el plásmido pKM101 y las mutaciones *rfa* y *uvr-B-bio*. Detecta mutágenos que provocan corrimiento de marco de lectura, lo que implica inserción o pérdida de pares de bases y es especialmente sensible a las aminas aromáticas. El valor histórico de reversión espontánea de esta cepa es de 30 a 50 revertantes por placa (Mortelmans y Zeiger, 2000; Ferrer *et al.*, 2001). Se eligió como modelo a la NOP como mutágeno, ya que brinda la oportunidad de estudiar un compuesto que es tanto mutágeno directo como indirecto. Como ya se había mencionado, *S. typhimurium* no tiene un sistema metabólico propio por lo que para activar la amina se utilizó la fracción S10 de *V. faba*.

2. Objetivos

- Corroborar la capacidad metabólica de *Vicia faba* para activar la 4-nitro-o-fenilendiamina (NOP).
- Evaluar la reducción del efecto mutagénico de la NOP en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium* por los extractos de fresa, piña y manzana.
- Cuantificar el contenido de antocianinas, flavonoides, compuestos fenólicos, ácido ascórbico y la actividad antioxidante de los extractos de fresa, piña y manzana y correlacionarlo con la disminución de la mutagenicidad.

3. Hipótesis

Las plantas tienen la capacidad de activar enzimáticamente gran cantidad de agentes químicos, entre ellos la NOP, lo que provoca metabolitos o productos mutagénicos; esto se ve reflejado en un aumento de revertantes por placa en la prueba de Ames. Se espera que los extractos de frutas disminuyan el número de revertantes por placa indicando un efecto antimutagénico y que éste se encuentre relacionado con la actividad y cantidad de antioxidantes presentes en las frutas como: compuestos fenólicos, flavonoides, ácido ascórbico, entre otros.

4. Metodología

4.1 Preparación de extractos de fruta (piña, fresa y manzana)

Las frutas se compraron en el supermercado. Para cada fruta se eligieron individuos homogéneos en tamaño y estado de maduración y antes de procesarlas se lavaron con agua corriente y en el caso de la piña se quitó la cáscara. Para todas las frutas se eligieron muestras de las partes comestibles. Con un extractor de jugos casero se obtuvo el jugo, el cual se centrifugó a 10 000 rpm durante 60 minutos a 4 °C, el sobrenadante se ajustó a pH 7.4 y se esterilizó con un filtro Millipore de 0.45 µm (Edenharder *et al.*, 2002).

4.2 Obtención y activación de la fracción enzimática S10 de *Vicia faba*

Preparación de extracto

Se eligieron habas en buen estado y sin manchas, se lavaron con agua corriente y se dejaron 30 minutos remojando con unas gotas de hipoclorito de sodio (NaClO) para eliminar cualquier posible patógeno. Se enjuagaron y se dejaron remojando en agua durante 24 horas. Una vez pasado el tiempo se colocaron entre dos capas de algodón húmedo y permanecieron en oscuridad hasta que las raíces alcanzaron una longitud de 4 a 6 cm (aproximadamente 5 días). Se cortaron los 2 cm terminales de las raíces y se maceraron en un mortero con nitrógeno líquido y polivinilpolipirrolidona al 10 % (p/v) (Sigma), se homogeneizaron en un macerador de tejidos vegetales agregando en proporción 1:1 con el peso de las raíces, una solución con amortiguador de fosfatos de sodio pH 7.4, 1 mM de ditiotreitól (Sigma), 1 mM EDTA, 0.6 mM de manitol (Baker), se centrifugó a 11 500 rpm durante 30 minutos a 4 °C, el sobrenadante se esterilizó con un filtro Millipore de 0.45 µm (Calderón y Espinosa, 1998; Gómez-Arroyo *et al.*, 2000).

Activación de la mezcla S10

Se utilizó una solución de amortiguador de fosfatos de sodio pH 7.4 con MgCl₂ 8 X 10⁻³ M (Baker), KCl 3.3 X 10⁻² M (Baker), glucosa 6-fosfato 5 X 10⁻³ M (Sigma) y NADP 4 X 10⁻³ M (Sigma) en proporción 9:1 con el extracto de *Vicia faba* (Calderón y Espinosa, 1998).

4.2.1 Determinación de la actividad peroxidasa (POX) y contenido de proteínas

El contenido de proteínas totales y la actividad POX de la fracción S10 de *V. faba* se midió después de una incubación durante 2 horas de la fracción con NOP al 2 % y como testigo negativo se hizo el mismo tratamiento utilizando agua destilada.

Contenido de proteínas

Se determinó por el método de Bradford (1976). A 10 µl de la fracción enzimática S10, se le agregaron 200 µl de reactivo de Bradford (Biorad) y se llevó a un volumen final de 2 ml con amortiguador de fosfatos pH 7.4, después de 30 minutos se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro de luz visible. La cuantificación de proteína se hizo tomando como referencia concentraciones de albúmina sérica de bovino.

Actividad peroxidasa (POX)

La actividad enzimática de la POX se determinó de acuerdo con el método descrito por Gichner *et al.* (1994). Se mezcló 1 mL de H₂O₂ al 3%, 10 µl de la fracción enzimática S10 y 990 µl de amortiguador de fosfatos pH 7.4, la reacción se inició con la adición de 1 mL de guaiacol al 1%. Como blanco se utilizó la mezcla anterior sin muestra de fracción enzimática S10. Se midió la oxidación del sustrato (guaiacol) monitoreando el incremento en la absorbancia a 470 nm durante 5 minutos en intervalos de 30 segundos en un espectrofotómetro de luz visible.

Para determinar la actividad de la POX se utilizó la ecuación

$$\text{Reacción peroxidasa} = \left[\left(\frac{m}{\varepsilon} \right) \left(\frac{vf}{vm} \right) \right] p$$

Donde:

m: pendiente por minuto

ε: coeficiente de extinción del guaiacol (2.6/mmol/mm)

vf : volumen final

vm: volumen muestra

p: contenido de proteína en mg

4.3 Ensayo de Ames

4.3.1 Preparación de las bacterias

Adaptado de los métodos propuestos por Maron y Ames (1983). Se tomó una muestra a partir de una reserva en criovial de la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*, la cual se sembró por estría en un medio completo NB y se incubó durante 48 horas a 37 °C, posteriormente se eligieron 5 colonias, que se sembraron en medio líquido LB y se incubaron durante 24 horas a 37 °C con agitación constante para promover la proliferación de las bacterias.

En las 5 diferentes muestras de la cepa TA98 se verificó la presencia de los distintos marcadores genéticos, con el fin de elegir la mejor para los ensayos posteriores, esto se hizo mediante las siguientes pruebas. Para verificar la dependencia a histidina se sembraron en medios *His⁻* para comprobar que no hubiera crecimiento; para la mutación *rfa* se utilizó la prueba de cristal violeta en la cual hay una ausencia de crecimiento en la zona que tiene cristal violeta lo que indica la presencia de la mutación; para el factor R de resistencia a ampicilina se utilizaron medios selectivos con ampicilina para verificar que haya crecimiento a pesar del antibiótico; por último se hizo una prueba de reversión espontánea para verificar el número de revertantes espontáneas por placa. Una vez que se eligió la mejor cepa se realizaron placas patrón con ella para su almacenamiento y posterior uso.

Para llevar a cabo los ensayos se seleccionó una colonia a partir de las placas patrón y se sembró en medio líquido LB, se incubó durante 16 horas a 37 °C con agitación constante para promover la proliferación de las bacterias.

4.3.2 Ensayo de mutagenicidad y antimutagenicidad

Los ensayos se realizaron con la metodología de Maron y Ames (1983) en dos etapas, para ambas se utilizaron las variantes de activación o no activación metabólica dada por la fracción S10 de *V. faba*. Durante la primera etapa en un tubo con agar de superficie se adicionaron diferentes volúmenes (10, 250 ó 500 µl) de los extractos de fruta, la fracción S10 (0 ó 500 µl) y la cepa TA98 (100 µl), se agitó y se vertió en placas de medio mínimo de glucosa, se incubó a 37 °C durante 48 horas en oscuridad, posteriormente se registró el número de colonias revertantes por placa. Esto se hizo para descartar que los extractos de fruta tuvieran efecto mutagénico o citotóxico. En la segunda etapa se probó la capacidad antimutagénica de los extractos de fruta utilizando un pre-tratamiento descrito por De Flora (1992), el cual consistió en incubar los extractos de fruta en los diferentes volúmenes (10, 250 ó 500 µl) con la cepa TA98 (100 µl) a 37 °C durante 1 hora en agitación constante. Después de la incubación en un tubo con agar de superficie, se adicionó la fracción S10 (0 ó 500 µl), la mezcla pre-tratamiento y 100 µl de NOP (20 µg/placa), se agitó y se vertió en placas de medio mínimo de glucosa, se incubó a 37 °C durante 48 horas en oscuridad, posteriormente se registró el número de colonias revertantes por placa.

Como testigo negativo se utilizó la cepa TA98, para el testigo positivo de mutagenicidad se utilizó 4-nitro-*o*-fenilendiamina (NOP) (Sigma) y como testigo de antimutagenicidad se empleó clorofilina (20 µg/placa). El índice de actividad antimutagénica se calculó con la fórmula (De Flora *et al.*, 1992):

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

Donde A es el número de revertantes en el testigo positivo de mutagenicidad y B el número de revertantes expuestas al antimutágeno, el número final de revertantes se calculó restando el número de revertantes espontáneas obtenidas en el testigo negativo.

4.4 Cuantificación de antioxidantes no enzimáticos

4.4.1 Cuantificación de compuestos fenólicos

La cuantificación de fenoles se realizó siguiendo el método de Folin-Ciocalteu descrito por Waterman y Mole (1994) adaptado por Mora-Herrera (no publicado). Las muestras de fruta se prepararon macerándolas con metanol 80 % en relación 20:1 (peso/volumen), se pusieron en baño de agua hirviendo por 5 minutos y se centrifugaron a 13 000 rpm por 5 minutos. Se tomaron 200 μ l de cada muestra de fruta, se le adicionaron 150 μ l de reactivo Folin-Ciocalteu, 500 μ l de carbonato de sodio (Na_2CO_3) 20 % y se aforó a 4.5 ml con metanol 80 %, se dejó reposar en oscuridad por 30 minutos y se leyó en un espectrofotómetro de luz visible a una longitud de onda de 760 nm. Se hizo una curva estándar con ácido gálico y los resultados se reportaron en mg de ácido gálico por g de peso fresco.

4.4.2 Cuantificación de flavonoides

El contenido de flavonoides se estimó siguiendo el método colorimétrico de AlCl_3 descrito por Huang *et al.* (2006), adaptado por Mora-Herrera (no publicado). Las muestras de fruta se prepararon con la misma técnica que se utilizó para la cuantificación de compuestos fenólicos. Se tomaron 500 μ l de muestra y se les agregó 1 ml de AlCl_3 2 %, se dejó reposar 15 minutos en oscuridad y se leyeron las muestras en un espectrofotómetro de luz visible a una longitud de onda de 430 nm. Se hizo una curva estándar con catequina y los resultados se reportaron en mg de catequina por g de peso fresco.

4.4.3 Cuantificación de ácido ascórbico

La metodología utilizada fue de Mora-Herrera (no publicado). Las muestras de fruta se prepararon macerándolas con ácido metafósforico 1 % en relación 50:1 (p/v) y se centrifugaron a 16 000 rpm por 15 minutos. A 250 µl de muestra se le agregaron 2.25 ml de 2,6 dicloroindofenol 0.005 % y se leyeron inmediatamente en un espectrofotómetro de luz visible a una longitud de onda de 515 nm. Se hizo una curva estándar con ácido ascórbico y los resultados se reportaron en µg de ácido ascórbico por g de peso fresco.

4.4.4 Cuantificación de antocianinas

Se determinó con el método de pH diferenciales de Lee *et al.* (2005). Las muestras de fruta se prepararon macerándolas con metanol 80 % en relación 20:1 (p/v), se pusieron en baño de agua hirviendo por 5 minutos y se centrifugaron a 13 000 rpm por 5 minutos. Se tomaron dos muestras de 200 µl de cada fruta, a una muestra se le agregó 1.8 ml de amortiguador de cloruro de potasio 0.025 M pH = 1 y a la otra muestra se le adicionó 1.8 ml de amortiguador de acetato de sodio 0.4 M pH = 4.5, se dejaron reposar por 15 minutos y se leyeron en un espectrofotómetro de luz visible a dos longitudes de onda, 525 y 700 nm. Para expresar el resultado se utilizó la siguiente fórmula:

$$C \text{ (mg/ml)} = \frac{(A)(MW)(1000)}{\epsilon(DF)}$$

Donde:

$$A = (Abs_{\lambda 510} - Abs_{\lambda 700})_{pH 1} - (Abs_{\lambda 510} - Abs_{\lambda 700})_{pH 4.5}$$

MW= Peso molecular

ϵ = Coeficiente de extinción molar

DF = Factor de dilución (volumen final de muestra /volumen inicial)

Los valores de MW y ϵ que se utilizaron en esta fórmula corresponden a la cianidina- 3-glucósido MW = 449.2 y ϵ = 26 900.

4.4.5 Actividad antioxidante

Se realizó con el ensayo de DPPH adaptado por Mora-Herrera (no publicado). En esta prueba se mide la capacidad de una muestra para reducir al radical 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH). Las muestras de fruta se prepararon macerándolas con metanol 80 % en relación 20:1 (p/v), se pusieron en baño de agua por 5 minutos y se centrifugaron a 13 000 rpm por 5 minutos. Se tomaron 250 μ l de muestra y se agregaron 2.75 ml de solución de DPPH 50 μ M, se dejó reposar en obscuridad durante una hora y se leyeron las muestras en un espectrofotómetro de luz visible a una longitud de onda de 517 nm. Se hizo una curva estándar con (\pm)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox[®]) y los resultados se reportaron en μ g Trolox por g de peso fresco.

4.5 Evaluación de datos

Los valores obtenidos de cada experimento fueron analizados con la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA), para detectar diferencias entre los grupos. Para los experimentos donde se encontró diferencia significativa se prosiguió con una prueba *post hoc* Tukey para observar las diferencias entre los tratamientos.

5. Resultados

Al preparar los extractos de frutas el pH inicial de la fresa fue de 3.36, el de la piña 3.61 y el de la manzana 3.9. Todos se ajustaron a pH 7.4 con NaCl 10 N, se filtraron y almacenaron en alícuotas a una temperatura de -80 °C para usarlos posteriormente. Igualmente se prepararon alícuotas del extracto de *V. faba* y se almacenaron a la misma temperatura. La activación de la fracción S10 fue realizada independientemente para cada experimento.

El contenido de proteínas totales de la fracción S10 de *V. faba* incubada durante 2 horas con NOP 2 % ($3.91 \pm 0.33 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) no varía significativamente con respecto al valor del testigo ($4.18 \pm 0.01 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$). Lo mismo sucedió en la actividad POX, no se encontró diferencia significativa entre el valor del testigo ($20.03 \pm 0.75 \text{ guaiacol nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1} \text{ proteína}$) y el valor cuando se incubó con NOP ($24.63 \pm 0.87 \text{ guaiacol nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1} \text{ proteína}$).

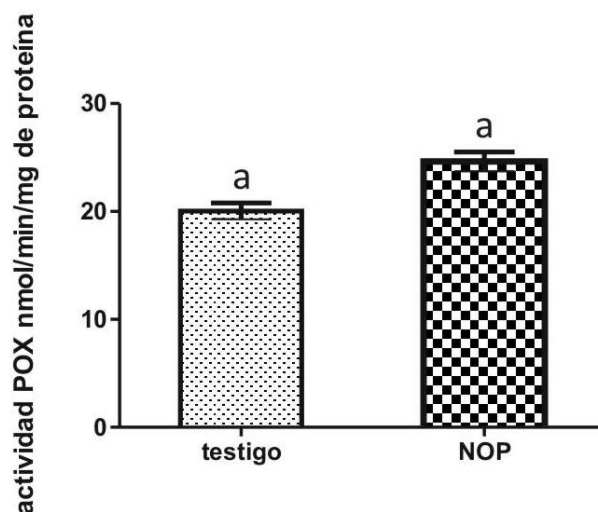


Figura 3. Actividad peroxidasa (POX) de la fracción S10 de *V. faba* incubada durante 2 horas con NOP o con agua destilada (testigo). Cada barra representa la media \pm e.e. (n=3-6). ^{a)} valores iguales, ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$).

La cepa TA98 de *S. typhimurium* tuvo crecimiento eficiente en todos los experimentos y siempre presentó los marcadores característicos de la cepa; los valores de los testigos negativos fueron de 21.25 ± 1.75 revertantes/placa en ausencia de la fracción S10 y 38.80 ± 2.71 revertantes/placa con la fracción S10, ambos resultados se encuentran dentro de los valores normales de reversión espontánea de la cepa (Fig. 4).

La NOP, que se utilizó como testigo positivo de mutagenicidad ($20 \mu\text{g/placa}$), incrementó el número de revertantes a 694.00 ± 20.18 de forma directa y al ser metabolizado por la fracción S10 el número de revertantes se elevó a 2024.00 ± 1.82 (Fig. 4). Como testigo positivo de antimutagenicidad se empleó clorofilina ($20 \mu\text{g/placa}$), la cual mostró un porcentaje de inhibición de 42.16 % frente a la mutagenicidad directa de la NOP y de 33.80 % con la NOP activada por la S10 (Tabla 1).

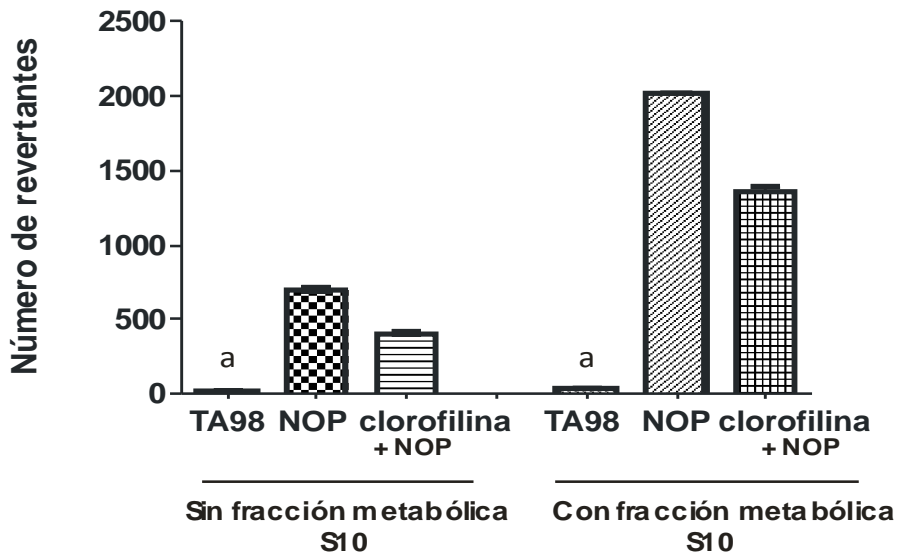


Figura 4. Testigo negativo (TA98), testigo positivo de mutagenicidad (NOP), testigo de antimutagenicidad (clorofilina +NOP). Cada barra representa la media \pm e.e. (n=6-9).

^{a)} valores iguales, ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.001$).

Ningún extracto de fruta mostró efecto citotóxico o mutagénico por sí mismo, por lo que se decidió utilizarlos todos en las pruebas de antimutagenicidad. Cuando las bacterias fueron tratadas con extracto de fresa empleando como tratamientos volúmenes de 10, 250 y 500 μl de extracto, todos mostraron un efecto antimutagénico frente a la NOP directa, así como frente a los productos de la activación de la NOP por la fracción S10 (Fig. 5). Los porcentajes de inhibición de la actividad mutagénica directa de la NOP fueron de 38.19 %, 63.83 % y 71.78 %, respectivamente. Al comparar estos resultados con la clorofilina, el tratamiento de 10 μl tiene el mismo efecto protector, mientras que los tratamientos de 250 y 500 μl mostraron mayor protección que la clorofilina, ya que sus porcentajes de inhibición son más altos. Cuando la NOP se encuentra en su forma activa, el extracto de fresa logra porcentajes de inhibición de 77.34 %, 87.43 % y 88.97 %, respectivamente, todos estos valores son significativamente mayores al de la clorofilina. Ya sea en la forma directa o activa de la NOP, sólo cuando se aplicaron 10 μl de extracto de fresa hubo diferencia con los tratamientos de 250 y 500 μl de extracto, sin embargo entre estos últimos no hay diferencia (Tabla 1).

Cuando las bacterias se trataron con extracto de piña (Fig. 6) y se expusieron directamente a la NOP, solo el tratamiento en el que se aplicaron 10 μl de extracto tuvo efecto antimutagénico, mostrando un porcentaje de inhibición de 38.56 %; este porcentaje es similar al de la clorofilina, por lo que ofrecen la misma protección. Los tratamientos en los que se aplicaron 250 y 500 μl de extracto, mostraron porcentajes de inhibición bajos, de 19.58 y 5.95 %, respectivamente, los cuales no son significativos en comparación con el testigo positivo de mutagenicidad, por lo que no se puede decir que éstos muestren efecto antimutágeno. Sin embargo, cuando las bacterias tratadas se expusieron a la NOP en su forma activa, todos los tratamientos evidenciaron efecto antimutagénico, los porcentajes de inhibición fueron de 37.38 %, 36.10 % y 34.39 %, respectivamente; todos estos valores son similares al de la clorofilina y no existe diferencia significativa entre ellos, es decir todos los tratamientos funcionan igual sin importar el volumen de extracto que se aplique (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto antimutagénico de los extractos de fruta en la mutagenicidad inducida por la amina aromática 4-nitro-*o*-fenilenediamina (NOP) en *Salmonella typhimurium* cepa TA98 con y sin activación metabólica por *Vicia faba* S10.

	Revertantes por Placa ^a			
	Sin metabolismo ^d	^e Porcentaje de antimutagenicidad	Con metabolismo ^d	^e Porcentaje de antimutagenicidad
Testigo Negativo				
TA98	21.25 ± 1.75		38.80 ± 2.71	
Testigos Positivos				
Mutagenicidad NOP ^c	694.00 ± 20.18		2024.00 ± 1.82	
0.2 µg/µl				
Antimutagenicidad clorofilina 2 µg/µl	406.20 ± 4.10*	42.16 %	1353.00 ± 42.24*	33.80 %
Tratamientos ^b				
µl extracto por placa				
Fresa + NOP				
10	429.00 ± 18.01*	38.19 %	477.67 ± 24.78*~	77.34 %
250	270.33 ± 30.34*~	63.83 %	289.00 ± 10.60*~	87.43 %
500	209.67 ± 10.73*~	71.78 %	239.33 ± 20.57*~	88.97 %
Piña + NOP				
10	434.67 ± 4.10*	38.56 %	1282.00 ± 18.52*	37.38 %
250	562.33 ± 5.04	19.58 %	1307.33 ± 10.23*	36.10 %
500	654.00 ± 16.86	5.95 %	1341.33 ± 13.91*	34.39 %
Manzana + NOP				
10	830.00 ± 12.53*~	0 %	1449.33 ± 21.40*	30.12 %
250	921.00 ± 21.08*~	0 %	1344.33 ± 3.84*	34.24 %
500	1011.33 ± 3.48*~	0 %	1324.33 ± 8.37*	35.24 %

^a Media ± error estándar (n=6-9).

^b Tratamientos: volúmenes de 10, 250 ó 500 µl de los diferentes extractos de fruta.

^c NOP: 4-nitro-*o*-fenilenediamina 20 µg por placa.

^d Metabolismo: dado con la fracción enzimática S10 de *Vicia faba* (0 ó 500 µl).

^e Calculado con la formula % Inhibición = ((A-B)/A) x 100 donde A es el número final de revertantes del testigo positivo y B el número final de revertantes por placa.

*Diferencia significativa entre el testigo positivo (NOP) y los tratamientos ANOVA una vía, *post hoc* Tukey (p<0.001).

~Diferencia significativa entre testigo antimutagenicidad (clorofilina 20 µg/placa) y los tratamientos ANOVA una vía, *post hoc* Tukey (p<0.001).

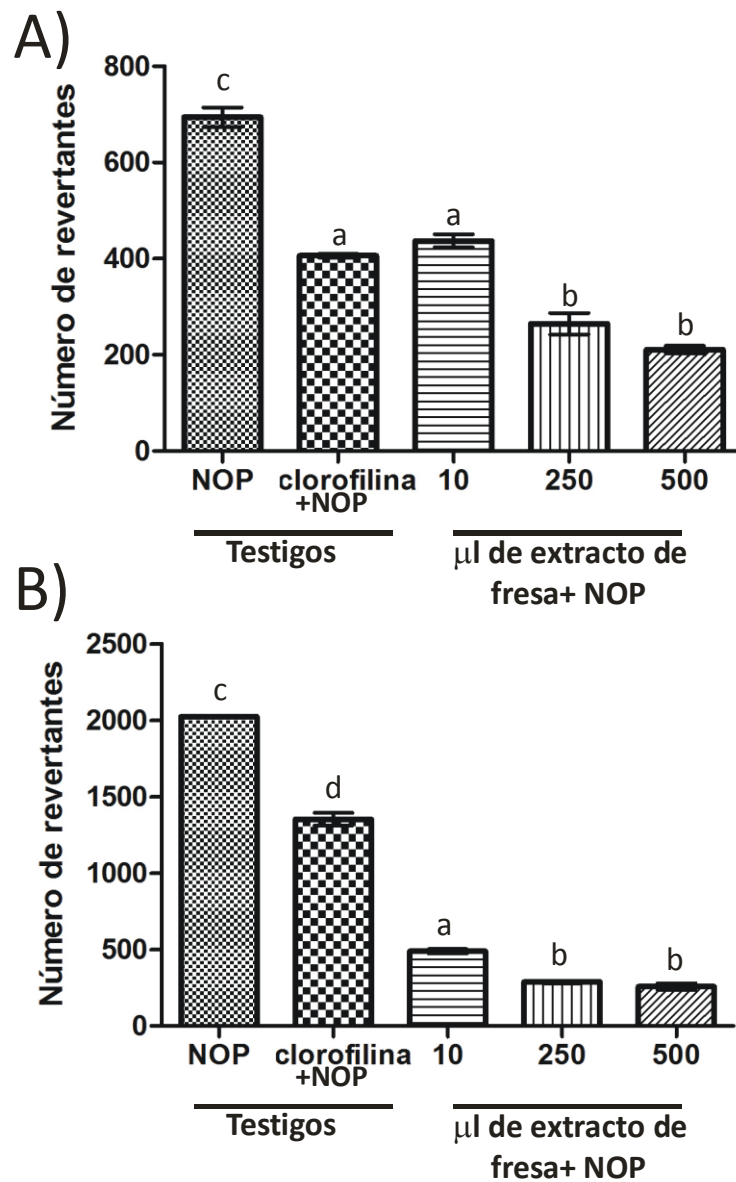


Figura 5. Efecto antimutagénico del extracto de fresa en A) la mutagenicidad directa de NOP y B) NOP activada metabólicamente por S10 de *V. faba* en la cepa TA98 de *S. typhimurium*. Cada barra representa la media \pm e.e. (n=6-9). Letras iguales corresponden a valores iguales, ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.001$).

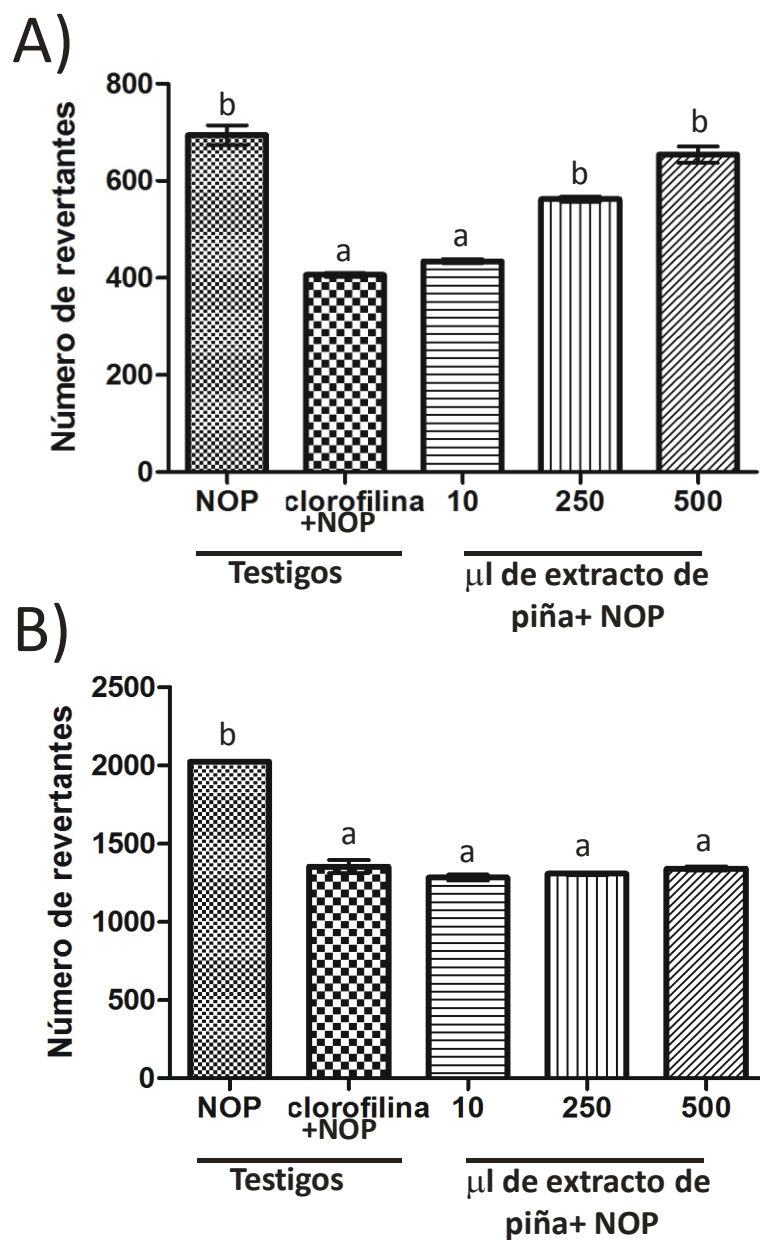


Figura 6. Efecto antimutagénico del extracto de piña en A) la mutagenicidad directa de NOP y B) NOP activada metabólicamente por S10 de *V. faba* en la cepa TA98 de *S. typhimurium*. Cada barra representa la media \pm e.e. (n=6-9). Letras iguales corresponden a valores iguales, ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.001$).

Como se muestra en la Fig. 7, cuando se les aplicó extracto de manzana con la NOP de forma directa a las bacterias, el número de revertantes se incrementó incluso por arriba del valor del testigo positivo, con los tratamientos en los que se aplicaron 250 y 500 μl de extracto los valores de revertantes fueron de 921.00 ± 21.08 y 1011.33 ± 3.48 , respectivamente. Pero cuando la NOP se encontraba activada por la fracción S10, todos los tratamientos mostraron protección similar a la de la clorofilina con valores de inhibición de 30.12 %, 34.24 % y 35.24 %, respectivamente. Y como en el caso del extracto de piña, todos los tratamientos funcionan igual frente a la NOP activada sin importar el volumen de extracto que se aplicó (Tabla 1).

Buscando una relación entre los extractos de fruta y el efecto antimutagénico de cada uno se realizaron pruebas para cuantificar algunos de los compuestos antioxidantes no enzimáticos más importantes en las frutas. Se evaluó el contenido total de fenoles, flavonoides, antocianinas y ácido ascórbico, en la tabla 2 se pueden observar los valores hallados para la clorofilina y los extractos de fresa, piña y manzana.

En el extracto de fresa y manzana se encontró alto contenido de compuestos fenólicos y antocianinas, en el caso de ambos antioxidantes los resultados son muy superiores a los de la clorofilina y el extracto de piña que muestran valores similares entre sí. Sin embargo, existe diferencia significativa entre los extractos de fresa y manzana, siendo la fresa la que contiene las concentraciones más altas para ambos antioxidantes. Mientras que en la cuantificación de flavonoides, que son un tipo de compuesto fenólico, los valores más altos se obtuvieron en la clorofilina seguido del extracto de manzana, estos datos nuevamente son muy superiores a los del extracto de piña. Sin embargo el extracto de piña fue el más alto en el contenido de ácido ascórbico seguido por el de fresa, mientras que en el extracto de manzana el contenido no fue detectable.

Se evaluó también la actividad antioxidante de las frutas probando su capacidad para reducir al radical DPPH. En la tabla 3 se indican los valores obtenidos para la clorofilina y los extractos de fresa, piña y manzana. Los resultados mostraron el siguiente orden: manzana > fresa > clorofilina \geq piña, entre los dos últimos no se encontró diferencia significativa.

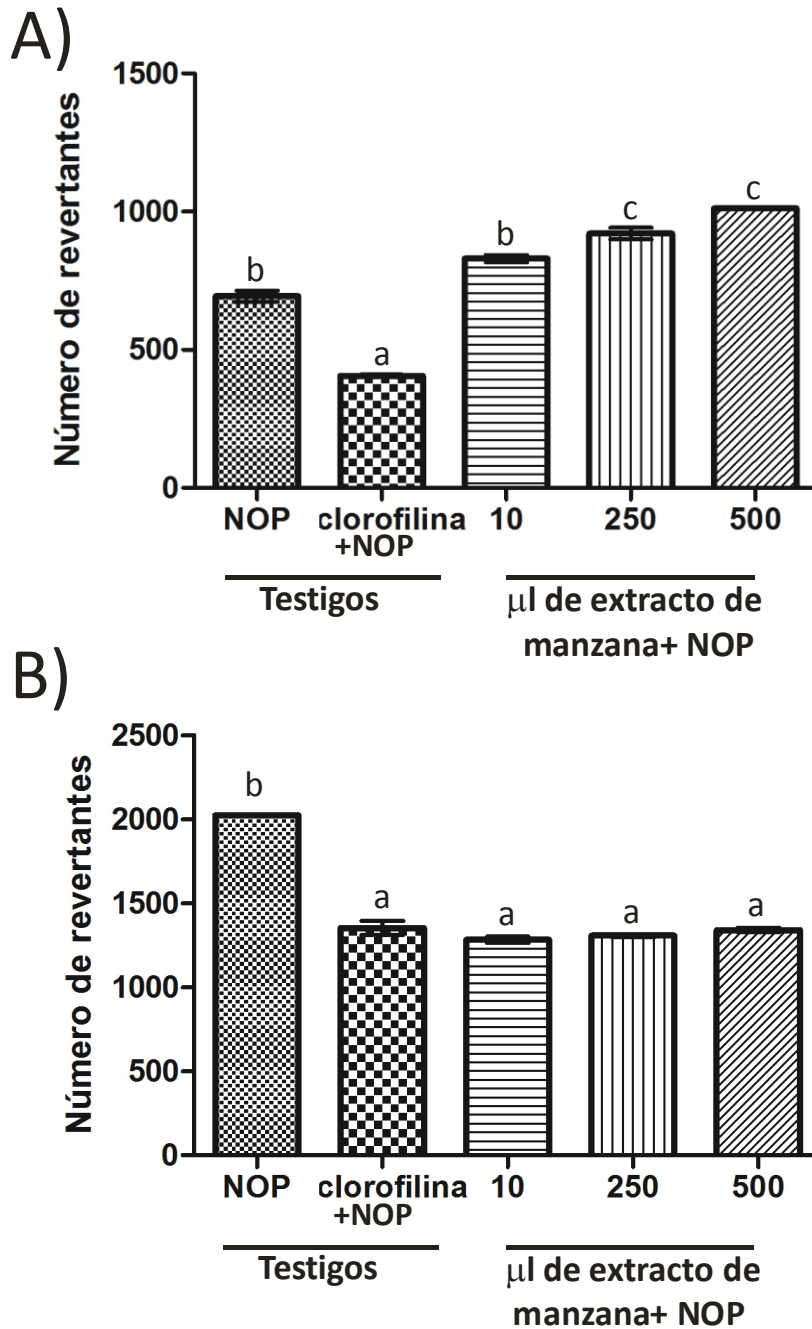


Figura 7. Efecto antimutagénico del extracto de manzana en A) la mutagenicidad directa de NOP y B) NOP activada metabólicamente por S10 de *V. faba* en la cepa TA98 de *S. typhimurium*. Cada barra representa la media \pm e.e. (n=6-9). Letras iguales corresponden a valores iguales, ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.001$).

Tabla 2. Contenido de antioxidantes en la clorofilina y en los extractos de fresa (*Fragaria x ananassa*), piña (*Ananas comusus*) y manzana (*Malus domestica* var. *Red Delicious*).

	Testigo ^a clorofilina	Fresa ^a	Piña ^a	Manzana ^a
Compuestos fenólicos^b mg /g	366.6 ± 9.36*	1 025 ± 38.40	398.8 ± 5.94*	894.4 ± 34.10
Flavonoides^c mg /g	628.0 ± 14.58	141.8 ± 11.12	31.75 ± 2.54	261.8 ± 8.16
Antocianinas^d mg /L	0.004 ± 0.004*	0.461 ± 0.243	0.018 ± 0.003*	0.317 ± 0.027
Ácido ascórbico^e µg /g	42.42 ± 5.87*	369.7 ± 27.10	443.8 ± 25.47	ND*

^a Media ± error estándar (n=9).

^b Concentración en mg de ácido gálico por g de peso fresco.

^c Concentración en mg de catequina por g de peso fresco.

^d Concentración de antocianinas monoméricas en equivalentes a cianidina- 3- glucósido.

^e Concentración en µg de ác. ascórbico por gramo de peso fresco.

*Valores iguales ANOVA una vía, *post hoc* Tukey p<0.05

ND: valor no detectable en la prueba.

Tabla 3. Actividad antioxidante de la clorofilina y los extractos de fresa, piña y manzana evaluada con el radical DPPH.

	Actividad antioxidante^{a,b} μg/g
Clorofilina	725.1 ± 63.14*
Fresa	5 739.0 ± 94.62
Piña	587.4 ± 79.26*
Manzana	6 791.0 ± 86.20

^a Media ± error estándar (n=9).

^b μg de equivalentes Trolox por g de peso fresco.

*Valores iguales ANOVA una vía, *post hoc* Tukey p<0.05

6. Discusión

Las aminas aromáticas son compuestos ampliamente utilizados en la industria para la manufactura de muchos productos, entre ellos plaguicidas y compuestos derivados del petróleo, también se originan durante la combustión de diesel, madera o humo de cigarro. Existen muchos estudios en los que se comprueba que las aminas aromáticas tienen efecto mutagénico en varios sistemas biológicos de prueba. Algunas de ellas son promutagénicas activadas tanto por el metabolismo animal como por el vegetal. Mientras que en los mamíferos la activación se hace por enzimas presentes en el hígado, como el citocromo P-450-dependiente de monooxigenasas (CYP-P450). En las plantas la activación se da por medio del sistema de citocromos P-450 y otras enzimas como las peroxidasas. Aunque el proceso de activación es similar, algunos de los productos de la activación vegetal son diferentes a los que se producen por el metabolismo animal. Durante el proceso de activación vegetal se pueden formar intermediarios reactivos y radicales libres, lo cual está relacionado con el daño a moléculas como lípidos y proteínas, además pueden atacar directamente al DNA provocando rompimientos simples o dobles de cadenas o provocando aductos, lo que eventualmente puede ocasionar envejecimiento celular, cambios mutagénicos y enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Plewa y Gentile, 1982; Ferrer *et al.*, 2001; Gómez-Arroyo *et al.*, 2006).

En este estudio los resultados demuestran que NOP actúa como mutágeno directo en la cepa TA98 de *S. typhimurium* y que el efecto mutagénico se potencia al ser activada por la fracción S10 de *V. faba*; estos resultados coinciden con los reportados por Sánchez-Estrada (2008). La actividad peroxidasa y el contenido total de proteínas de la fracción S10 de *V. faba* no se afecta cuando ésta se incubaba con NOP, lo que sugiere que las peroxidasas presentes en la fracción S10 son las responsables de la activación, concordando con lo reportado por Gentile y cols. (1985, 1986), Gentile y Gentile (1991) y Toering y cols. (1996). Los intermediarios reactivos o el producto final de las reacciones de activación de la NOP no están bien establecidos. Existe un modelo general de activación de aminas aromáticas (Fig. 8), éste sugiere que tras una oxidación catalizada por las peroxidasas vegetales, se forman productos capaces de conjugarse con macromoléculas, los cuales al desconjugarse dan lugar a iones reactivos que son los responsables del daño al DNA y que pueden causar estrés oxidante (Zeiger *et al.*, 1981; Gentile *et al.*, 1985; Plewa *et al.*, 1993; Seo *et al.*, 1993; Toering *et al.*, 1996).

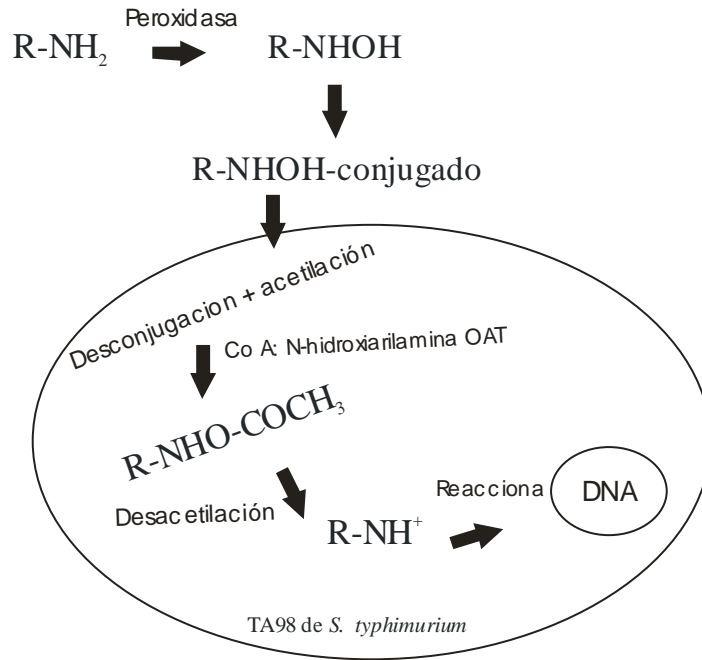


Figura 8. Esquema que resume el posible modelo de activación metabólica vegetal de las aminas aromáticas. Este modelo propone que la amina aromática ($R-NH_2$) se oxida por medio de las peroxidases de las plantas ($R-NHOH$) y el producto se conjuga con una macromolécula. Dentro de la bacteria se produce una acetilación ($R-NHO-COCH_3$) y desacetilación por la CoA: N-hidroxilarilamina OAT de la bacteria, lo que produce un ión muy reactivo ($R-NH^+$) capaz de provocar daño al DNA (Plewa *et al.*, 1993; Seo *et al.*, 1993; Toering *et al.*, 1996).

Desde que se relacionó a los mutágenos y promutágenos con el origen y potenciamiento de enfermedades en el ser humano, los trabajos de búsqueda, caracterización y uso de sustancias que puedan reducir o prevenir los daños al DNA han aumentado. Estos compuestos conocidos como antimutágenos, pueden funcionar de varias formas, por ejemplo inactivando al mutágeno para prevenir la reacción entre éste y el DNA, neutralizando los radicales libres para evitar daños por estrés oxidante, activando mecanismos de reparación del DNA para que las mutaciones no se fijen, inhibiendo a las enzimas activadoras de promutágenos o activando a las enzimas involucradas en el proceso de desintoxicación de xenobióticos (Toering *et al.*, 1996; Hayatsu *et al.*, 1998; Sangwan *et al.*, 1998; Šmerák *et al.*, 2002; Bunkova *et al.*, 2005; Qari, 2008).

Estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo de frutas y verduras con altos contenidos de antioxidantes es un importante factor de protección a la salud, ya que los antioxidantes tienen la capacidad de inhibir o retrasar la oxidación de otras moléculas (Velioglu *et al.*, 1998; Fogliano *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2002; Zuo *et al.*, 2002; García *et al.*, 2004). Las frutas contienen una mezcla compleja de diferentes compuestos como polifenoles, flavonoides, antocianinas, carotenos, ácido ascórbico y vitaminas como E y C. El conjunto de todos estos compuestos dan a las frutas una alta capacidad antioxidante por lo que es importante estudiarlas por el gran potencial antimutagénico que pueden tener (Sangwan *et al.*, 1998; Simic *et al.*, 1998; Velioglu *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000; Zuo *et al.*, 2002). Se ha reportado que las vitaminas C, E y los fenoles reducen la formación de nitrosaminas, mientras que los carotenoides, flavonoides y compuestos relacionados actúan como antioxidantes, esencialmente deshabilitando a los mutágenos (Ikken *et al.*, 1998).

En este estudio se probó la capacidad de 3 extractos de fruta (fresa, piña y manzana) para reducir la mutagenicidad directa e indirecta de la NOP, evaluado con el ensayo de Ames utilizando la cepa TA98 de *S. typhimurium*, como testigo positivo de antimutagenicidad. Se empleó clorofilina (20 µg/placa), la cual inhibe 42.16 % la mutagenicidad directa de la NOP y 33.80 % la producida por la activación vegetal de la NOP. Algunos autores han reportado que la clorofilina no inhibe la actividad de las peroxidasas, por lo que el efecto antimutagénico se da porque la clorofilina actúa como molécula interceptora, formando complejos con el mutágeno o sus metabolitos, limitando su biodisponibilidad y evitando que produzcan daño al DNA o bien neutralizando radicales libres (Ong *et al.*, 1986; Sangwan *et al.*, 1998).

El pre-tratamiento descrito por De Flora y cols. (1992) que se utilizó en los experimentos realizados en este trabajo, está diseñado para favorecer la penetración del antimutágeno en la bacteria. Con este modelo se pueden investigar las reacciones intracelulares del modulador con el mutágeno o los derivados intracelulares del mutágeno, así como la interferencia del modulador con las vías de activación de los mutágenos. Los resultados muestran que los extractos de fresa, piña y manzana no son mutagénicos o citotóxicos por sí mismos en ninguno de los volúmenes aplicados (10, 250 ó 500 µl) y tampoco contienen compuestos que se activen por el metabolismo de la fracción S10 de *V. faba*.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que el extracto de fresa es eficaz inhibiendo la mutagenicidad directa de la NOP, así como la inducida por los productos del metabolismo vegetal de la NOP. Esto sugiere que el efecto de antimutagénesis se debe a que inhibe directamente a la NOP, protegiendo DNA contra el daño y evitando que se produzcan metabolitos reactivos a través del metabolismo vegetal. Lo anterior puede deberse a un compuesto fenólico presente en las fresas, el ácido elágico, el cual se ha reportado que posee fuerte actividad antimutagénica y se ha comprobado que el mecanismo de acción de este antimutágeno se da por la formación de un complejo entre el ácido elágico y el mutágeno, también se sabe que puede inhibir la formación de radicales libres y que reduce la actividad del citocromo P450, por lo que reduce la activación metabólica de sustancias promutagénicas (Sangwan *et al.*, 1998; Šmerák *et al.*, 2002).

Mientras que los resultados con el extracto de piña demuestran que, frente a la mutagenicidad directa de la NOP, solo el menor volumen aplicado (10 μ l) tiene efecto antimutagénico significativo y se reduce conforme se aumenta el volumen de extracto aplicado por placa, este comportamiento se ha reportado ya con los extractos acuosos de piña y manzana (Ikken *et al.*, 1998). Sin embargo todos los volúmenes (10, 250 ó 500 μ l) de extracto de piña inhiben cerca del 35 % la mutagenicidad inducida por los productos del metabolismo vegetal de la NOP. Estos datos sugieren que el modo de acción antimutagénico del extracto de piña ocurre a nivel de la activación metabólica, inhibiendo a las enzimas peroxidasas e impidiendo la formación de intermediarios tóxicos o neutralizando los intermediarios reactivos, previniendo que interactúen con el DNA. Esto coincide con lo reportado por el grupo de Ikken (1998) donde sus resultados muestran que el extracto de piña posee efecto antimutagénico de moderado a fuerte frente a aminas heterocíclicas y las N-nitrosaminas NPIP, NPYR y NDMA activadas metabólicamente con S9 de hígado de rata.

Se ha descrito que los jugos de manzana tienen actividad antimutagénica contra la mutagenicidad inducida por los productos de la pirólisis del triptofano (Martínez *et al.*, 1998); la pectina de las manzanas reduce el número e incidencia de tumores de colon en ratas, también se ha mencionado que el jugo de manzana tiene ligera actividad antimutagénica contra la mutagenicidad de las aminas heterocíclicas activadas y que el extracto acuoso de manzana muestra ligera actividad antimutagénica frente a los metabolitos de la activación metabólica de las N-nitrosaminas NPYR y NDMA dada por S9 de hígado de rata (Ikken *et al.*, 1998).

En los resultados de este trabajo, el extracto de manzana no inhibe la mutagenicidad directa de la NOP la potencia, incluso por arriba del valor del testigo positivo de mutagenicidad, un efecto co-mutagénico similar se ha reportado anteriormente con jugos de uva, kiwi, naranja y piña cuando se incuban con los nitroarenos 2-nitrofluoreno y 1-nitroprinereno en la cepa TA98 de *S. typhimurium* (Tang y Edenharder, 1997) y con extractos de *Phyllanthus orbicularis* incubados con m-fenilendiamina en las cepas TA98 y TA100 de *S. typhimurium* (Ferrer *et al.*, 2001). Se han propuesto varios mecanismos por los cuales se producen efectos co-mutagénicos en algunos extractos vegetales, por ejemplo una inactivación de los compuestos antimutagénicos por otros compuestos presentes en los extractos o puede deberse también a la oxidación de ciertas sustancias en el extracto. Esta puede ser la razón del efecto co-mutagénico en el extracto de manzana que se utilizó en este trabajo.

Sin embargo, como en el caso anterior, todos los volúmenes (10, 250 ó 500 μ l) del extracto de manzana inhiben cerca del 30 % la mutagenicidad inducida por los productos del metabolismo vegetal de la NOP. Estos datos sugieren que el modo de acción antimutagénico es parecido al del extracto de piña y que se da a nivel de la activación metabólica, inhibiendo a las enzimas peroxidasa e impidiendo la formación de intermediarios tóxicos o neutralizando los intermediarios reactivos previniendo que interactúen con el DNA.

Se realizaron varias pruebas para cuantificar los contenidos de antioxidantes presentes en los extractos de fruta con el fin de comprobar si éstos eran los responsables del efecto antimutagénico. Los contenidos de compuestos fenólicos, antocianinas y flavonoides del extracto de piña son significativamente más bajos que los de otras frutas, pero iguales a los de la clorofilina. Esto concuerda con los resultados obtenidos, ya que ambos brindan la misma protección frente a los productos del metabolismo vegetal de la NOP; sin embargo el extracto de manzana obtuvo valores similares a los de fresa, pero el extracto de fresa tiene porcentajes de inhibición mucho más altos que los obtenidos con manzana. Esto puede deberse a las diferencias entre estos dos extractos, por ejemplo que el de manzana no contiene ácido ascórbico, ésta puede ser la razón por la cual el extracto se oxida y tiene efecto co-mutagénico; contiene también mayor cantidad de flavonoides, en comparación con el extracto de fresa, sin embargo se ha reportado que la catequina, un tipo de flavonoide, no inhibe la mutagenicidad directa de la NOP, sino que el efecto de antimutagenesis ocurre porque este compuesto intercepta a los productos del metabolismo de la NOP, lo que previene el daño al DNA.

En las determinaciones realizadas en esta tesis se observa que el extracto de fresa contiene un alto nivel de compuestos fenólicos, en especial de ácido elágico, el cual como ya se mencionó, puede formar complejos directamente con la NOP y además reduce la actividad de las peroxidasas e inhibe la formación de radicales libres, contiene también altos niveles de antocianinas que son fuertes neutralizadores de radicales libres.

Los resultados de la actividad antioxidante total detectada con el método de DPPH mostraron el siguiente orden: manzana > fresa > clorofilina = piña, sin embargo este método únicamente detecta antioxidantes solubles en disolventes orgánicos, especialmente en alcoholes, mientras que el método de Folin-Ciocalteu que se utilizó para la cuantificación de compuestos fenólicos no es totalmente selectivo, reacciona con cualquier sustancia reductora en especial con los antioxidantes hidrofílicos, por lo que se puede utilizar para medir indirectamente la capacidad reductora total de una muestra (Apak *et al.*, 2007). En esta prueba el orden de los valores fue el siguiente: fresa > manzana > piña = clorofilina, estos resultados apoyan la teoría de que el efecto antimutagénico de los diferentes extractos se debe a la capacidad de neutralizar o reducir a la NOP o a los productos del metabolismo vegetal de la NOP.

7. Conclusión

La posibilidad de reducir el daño al DNA con productos que se consumen dentro de una dieta balanceada ha abierto una nueva frontera para el control de enfermedades provocadas por mutaciones. Dentro de la fruta se producen interacciones entre los distintos antioxidantes y el resto de componentes que hacen que el efecto antimutagénico y antioxidante global sea superior al que tienen cada uno de los compuestos antioxidantes si los tomamos por separado; además no solo el alimento puede ser más efectivo que el compuesto aislado, sino que el compuesto aislado puede llegar a tener efectos distintos a los esperados ya que a concentraciones muy elevadas un antioxidante se transforma en prooxidante y puede provocar daño por estrés oxidante en las células. Sin embargo, es necesario comprobar la tolerancia de los compuestos activos en los seres humanos; una vez que se descubran los mecanismos de acción de los antimutágenos, la utilidad de estos será más convincente para su empleo como agentes quimiopreventivos.

8. Referencias

Ames B.N., Gurney E. G., Miller J. A. y Bartsch H. (1972). Carcinogens as frameshift mutagens: Metabolites and derivatives of 2-acetylaminofluorene and other aromatic amine carcinogens. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **69** : 3128-3132.

Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Celik S.E., Bektaşoglu B. Berker K.I. y Özyurt D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. Molecules **12**:1496-1547.

Arimoto S., Fukuoka S., Itome C., Nakano H., Rai H. y Hayatsu H. (1993). Binding of polycyclic planar mutagens to chlorophyllin resulting in inhibition of the mutagenic activity. Mutat. Res. **287**: 293-305.

Blair L.C., Plewa M.J. y Gentile J.M. (1985). Impurities of commercial 4-nitro-o-phenylenediamine and a novel plant activated promutagen. Environ. Mutagen. **7** : 40 (abstract).

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of the microgram quantities utilizing the principle of protein-die binding. Anal. Biochem. **72**: 248-254.

Bunkova R., Marova I., Pokorna Z. y A. Lojek. (2005). Analysis of plant extracts antimutagenicity using the Ames test and the cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes. Sage Publications **11**: 107–112.

Calderón-Segura M. E. y Espinosa-Ramírez M. (1998). Efecto de butilate y de molinate sobre la división de los linfocitos humanos en cultivo con y sin activación metabólica *in vivo* e *in vitro* por *Vicia faba*. Rev. Int. Contamin. Ambient. **14**: 39-47.

Chung K.T., Kirkovsky L., Kirkovsky A. y Purcell W.P. (1997). Review of mutagenicity of monocyclic aromatic amines: quantitative structure–activity relationships. Mutat. Res. **387** : 1-16.

Coleman J., Blake-Kalff M. y Davies E. (1997). Detoxification of xenobiotics by plants: Chemical modification and vacuolar compartmentation. Trends Plant Sci. **2** : 144-151.

Cortés-Eslava J., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R. y Espinosa-Aguirre J.J. (2001). Metabolic activation of three arylamines and two organophosphorus insecticides by coriander (*Coriandrum sativum*) a common edible vegetable. *Toxicol. Lett.* **125**: 39-49.

De Flora S., Camoirano A., D' Agostini F. y Balansky R. (1992). Modulation of mutagenic response in prokaryotes. *Mutat. Res.* **267**: 183-192.

DeBruin L.S. y Josephy P.D. (2002). Perspectives on the chemical etiology of breast cancer. *Environ. Health Perspect.* **110**:119-128.

DeBruin L.S., Pawliszyn J.B. y Josephy P.D. (1999). Detection of monocyclic aromatic amines, possible mammary carcinogens, in human milk. *Chem. Res. Toxicol.* **12**:78-82.

Edenharder R., Kurz P., Jonh K., Burgard S. y Seeger K. (1994). In vitro effect of vegetable and fruit juices on de mutagenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline. *Food Chem. Toxicol.* **32**: 453- 459.

Edenharder R., Sanger J.W., Glatt H., Muckel E. y Platt K.L. (2002). Protection by beverages, fruits, vegetables, herbs, and flavonoids against genotoxicity of 2-acetylaminofluorene and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in metabolically competent V79 cells. *Mutat. Res.* **521**: 57 - 72.

EPA (Enviromental Proteccion Agency) (1980). Sixth Report of the Interagency Testing Committee to the Administrator, Receipt of the Report and Request for Comments Reagarding Priority List of Chemicals, *Federal Register* 45, pp. 35897-35910.

Ferrer M., Sánchez- Lamar A., Fuentes J.L., Barbé J. y Llagostera M. (2001). Studies on the antimutagenesis of *Phyllanthus orbicularis*: mechanisms involved against aromatic amines. *Mutat. Res.* **498**: 99-105.

Fogliano V., Verde V., Randazzo G. y Ritieni A. (1999). Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 1035–1040.

García A.M., Pascual T.S., Santos B. C. y Rivas G. J.C. (2004). Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chem.* **84**: 13–18.

García-Rodríguez M.C. y Altamirano-Lozano M.A. (2007). La clorofilina como modulador y protector de daño al ADN: Experiencia en el ratón *in vivo*. *Bioquímica.* **32**: 15-24.

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

Gentile J.M., Gentile G.J. y Plewa M.J. (1986). *In vitro* activation of chemicals by plants: a comparison of techniques. *Mutat. Res.* **164**: 53-58.

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

Gentile J.M. y Gentile G.J. (1991). The metabolic activation of 4-nitro-o-phenylenediamine by chlorophyll-containing plant extracts: The relationship between mutagenicity and antimutagenicity. *Mutat. Res.* **250**: 79-86.

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 mutagenesis mechanism of diethyldithiocarbamate and ammonium metavanadate. *Mutat. Res.* **316**: 164-172.

Gómez-Arroyo S., Noriega-Aldana N., Juárez-Rodríguez D. y Villalobos-Pietrini R. (1987). Sister chromatid exchanges induced by the organophosphorous insecticides methyl parathion, dimethoate, phoxim and methyl azinphos in cultured human lymphocytes. *Contam. Ambient.* **3**: 63-70.

Gómez-Arroyo S., Castillo-Ruiz P., Cortés-Eslava J. y Villalobos-Pietrini R. (1988). *Vicia faba*- sister chromatid exchanges of the organophosphorus insecticides methyl parathion, dimethoate, oxydemeton methyl, azinphos methyl and phoxim. *Cytologia* **53**: 627-634.

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

Gómez-Arroyo S., Calderón-Segura M.E. y Villalobos-Pietrini (1995). Sister chromatid exchange in human lymphocytes induced by propoxur following plant activation by *Vicia faba*. Environ. Mol. Mutagen. **26** : 324-330.

Gómez-Arroyo S., Díaz-Sanchez Y., Meneses-Pérez M.A., Villalobos-Pietrini R. y De León-Rodríguez J. (2000). Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture workers group exposed to pesticides. Mutat.Res. **446**: 117-124.

Gómez-Arroyo S., Calderón-Segura M.E., Cortés-Eslava J., Villalobos-Pietrini R. y Flores-Maya S. (2006). Contribución del metabolismo vegetal sobre el efecto genotóxico de plaguicidas. En Tópicos de Genética. Editorial de México (CEDIMSA). México. pp. 95-118.

Hadnagy W. y Seemayer N.H. (1988). Antimutagenicity of chlorophyllin against airborne pollutants. Mutat. Res. **203**: 205-206.

Hayatsu H., Arimoto-Kobayashi S. y Negishi T. (1998). Use of activated heterocyclic amines in the screening of dietary antimutagens. Mutat. Res. **402**: 225-230.

Huang Y.C., Chang Y.H. y Shao Y.Y. (2006). Effects of genotype and treatment on the antioxidant activity of sweet potato in Taiwan. Food Chem. **98** : 529-538.

Ikken Y., Cambero I., Martín M.L., Martínez A., Haza A.I. y Morales P. (1998). Antimutagenic effect of fruit and vegetable aqueous extracts against *N*-nitrosamines evaluated by the Ames test. J. Agric. Food Chem. **46**: 5194-5200.

Janghel E.K., Rai J.K., Rai M.K. y Gupta V.K. (2005). New analytical technique for the simultaneous determination of aromatic amines in environmental samples. J. Sci. Ind. Res. **64**: 594-597.

Kada T. y Shimoi K. (1987). Desmutagens and bio-antimutagens- Their modes of action. Bioassays. **7**: 113- 116.

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

Lee J., Durst R. W. y Wrolstad R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *J. AOAC Int.* **88** : 1269-1278.

Maron D.M. y Ames B.N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**: 137-217.

Martínez A., Cambero I., Ikken Y., Marín M.L., Haza A.I. y Morales P. (1998). Protective effect of broccoli, onion, carrot and licorice extracts against cytotoxicology of N-nitrosamines evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 585-589.

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

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.

Niedziela S.L., Shi X., Nath J. y Ong T. (1991). Studies on three structurally related phenylenediamines with the mouse micronucleus assay system. *Mutat. Res.* **259**:43-48.

O' Hare S. y Atterwill C.K. (1995). *In Vitro Toxicity Testing Protocols*. Human Press. New Jersey.

Ong T., Whong W.Z., Stewart J. y Brockman H.E. (1986). Chlorophyllin: a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures. *Mutat. Res.* **173**: 11-115.

Perry P. y Searle C. (1977). Introduction of sister chromatid exchange in Chinese hamster cells by the hair dye constitutes 2-nitro-o-phenylenediamine and 4-nitro-o-phenylenediamine. *Mutat. Res.* **56**: 207-210.

Plewa J.M. y Gentile J.M. (1982). The activation of chemicals into mutagens by green plants. En: *Chemical mutagens, principles and methods for their detection*. Plenum Press, Nueva York. Vol. 7, pp. 401-420.

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

Plewa M.J., Smith S.R. y Wagner E.D. (1991). Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. *Mutat. Res.* **247**: 57-64.

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

Qari S.H. (2008). *In vitro* evaluation of the antimutagenic effect of *Origanum majorana* extract on meristematic root cells of *Vicia faba*. *JTUSCI.* **1**:6-11.

Sánchez Estrada L. (2008). Mutagenicidad inducida en *Salmonella typhimurium* por los insecticidas organofosforados gusación y metamidofos activados por la fracción S10 de *Vicia faba*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

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

Sangwan N.S., Shanker S., Sangwan R.S. y Kumar S. (1998). Plant-derived products as antimutagens. *Phytother. Res.* **12**: 389-399.

Searle C.D., Harnden D. y Venitt S. (1975). Carcinogenicity and mutagenicity test of some hair colorants and constituents. *Nature (Londres)* **255**: 505-507.

Seo K.Y., Riley J., Cortez D., Wagner E.D. y Plewa M.J. (1993). Characterization of stable high molecular weight mutagenic product(s) of plant-activated m-phenylenediamine. *Mutat. Res.* **299**: 111-200.

Simić D., Vuković-Gačić B. y Knežević-Vukčević J. (1998). Detection of natural bioantimutagens and their mechanisms of action with bacterial assay-system. *Mutat. Res.* **402**: 51-57.

Šmerák P., Šestáková H., Polívková Z., Bárta I., Turek B., Bártová J., Langová M. y Anděl M. (2002). Antimutagenic effect of ellagic acid and its effect on the immune response in mice. *Czech J. Food Sci.* **20**: 181–191.

Srivastava M.K. y Dwivedi U.N. (1998). Salicylic acid modulates glutathione metabolism in pea seedlings. *J. Plant Physiol.* **153**: 409-414.

Sun J., Chu Y.F., Wu X. y Liu R.H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 7449–7454.

Tang X. y Edenharder R. (1997). Inhibition of mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofurantrene and 1-nitropirene by vitamins, porphirins and related compounds, and vegetable and fruit juices and solvent extracts. *Food Chem. Toxicol.* **35**: 373-378.

Toering S.J., Gentile G.J. y Gentile J.M. (1996). Mecanism of antimutagenic action of (+)-caechin against the plant-activated aromatic amine 4-nitro-o-phenylenediamine. *Mutat. Res.* **36**: 81-87.

Toney S. y Claxton L.D. (1983). Compilation of Ames *Salmonella typhimurium* plate incorporation test protocols. U.S. Environmental Protection Agency, Health Effects Research Laboratory. Cincinnati. pp. 1-3.

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

Velioglu Y. S., Mazza G., Gao L. y Oomah B. D. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 4113–4117.

Wagner E.D., Marengo M.S. y Plewa J.M. (2003). Modulation of the mutagenicity of heterocyclic amines by organophosphate insecticides and their metabolites. *Mutat. Res.* **536**: 103-115.

Wang S.Y. y Lin H.S. 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 140–146.

Waterman P.G. y Mole S. (1994). Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publication, Oxford, pp. 1-238.

Ysern P., Riera J., Sitjes J. y Llagostera M. (1994). Activation of 4-nitro-o-phenylenediamine by the S2 fraction of *Zea mays* to mutagenic product(s). *Mutat. Res.* **312**: 25-31.

Zeiger E., Pagano D.A. y Robertson I.G.C. (1981). A rapid and simple scheme for confirmation of *Salmonella* tester strain phenotype. *Environ. Mutagen.* **3**: 205-209.

Zuo Y., Wang C. y Zhan J. (2002). Separation, characterization, and quantiation of benzoic and phenolic antioxidants in American cranberry fruit by GC-MS. *J. Agric. Food Chem.* **50** : 3789-3794.