



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO ANTIOXIDANTE DE JUGOS DE FRUTA EN
SALMONELLA TYPHIMURIUM TRATADOS CON
4-NITRO-ORTO-FENILENDIAMINA (NOP).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGA

P R E S E N T A:

GABRIELA ZALDIVAR MENDOZA



DIRECTORA DE TESIS:
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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno.
Zaldivar
Mendoza
Gabriela
58 59 21 57
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
304184574
2. Datos del tutor
Dra.
Sandra Luz
Gómez
Arroyo
3. Datos Sinodal 1
Dr.
Rafael de Jesús
Villalobos
Pietrini
4. Datos Sinodal 2
Dra.
María Elena
Calderón
Segura
5. Datos Sinodal 3
Dr.
Luis Felipe
Jiménez
García
6. Datos Sinodal 4
M. en C.
María Isabel
Rodriguez
Romero
7. Datos del trabajo escrito
Efecto antioxidante de jugos de fruta *en Salmonella typhimurium* tratados con 4-nitro-o-fenilendiamina (NOP).
49 p
2012

Me siento orgullosa de ser mexicana pero mas aun de ser egresada de esta noble institución, la Universidad Nacional Autónoma de México, que representa el saber y pensamiento universal. Mi aprecio y gratitud por siempre por haberme permitido pertenecer a sus aulas brillantes y ser parte de un sueño que hoy termina.

Mis emociones y sentimientos construyeron en mi una fortaleza pincelada a pincelada, cuya génesis inicio al recorrer sus pasillos, al respirar el aire fresco de sus jardines, disfrutar la belleza de sus grandes murales y arquitectura, de impregnarme de los murmullos de las voces de la amistad sincera y la fraternidad cristalina de su comunidad.

Soy pumita y por mi raza hablará el espíritu !!!

Agradecimientos

A mi directora de tesis la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo pues en el difícil y largo recorrido de la vida escolar, fue un placer y un orgullo haber contado con su guía maravillosa llena de luz, alegría y entrega plena. Por siempre, gracias.

A la Dra. Josefina Cortés Eslava mi eterno agradecimiento por compartir su vasta experiencia y calidad humana durante el trayecto de la investigación científica.

Mi plausible y más significativo agradecimiento a la Dra Martha Elena Mora Herrera por permitirme conocer y explorar el mundo mágico del laboratorio para descubrir siempre algo nuevo.

Mi gratitud y reconocimiento a los sinodales que con su paciencia y sabiduría hicieron posible esta tesis:

Dr. Rafael de Jesús Villalobos Pietrini
Dra. María Elena Calderón Segura
Dr. Luis Felipe Jiménez García
M. en C. María Isabel Rodríguez Romero

A mis amigos y compañeros de laboratorio de Citogenética ambiental. Reconozco que llegamos juntos y con un caudal de sueños, imaginando encontrar un túnel del tiempo que nos trasladara a la esencia del conocimiento. El juego, las bromas, la solidaridad, pero sobre todo la amistad nos hizo fuertes y crecimos como uno solo... y lo logramos.

Al PAPIIT (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
INTRODUCCIÓN	2
OXIDANTES Y ANTIOXIDANTES	2
PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LAS FRUTAS	3
<i>Compuestos fenólicos</i>	4
<i>Flavonoides</i>	5
<i>Antocianinas</i>	5
<i>Vitamina C</i>	6
MUTÁGENOS INDIRECTOS O PROMUTÁGENOS	6
AMINAS AROMÁTICAS	7
<i>4- nitro-o-fenilendiamina (NOP)</i>	8
ANTIMUTÁGENOS	9
SISTEMA BIOLÓGICO DE PRUEBA.....	9
<i>Ensayo de Ames</i>	9
OBJETIVOS	11
HIPÓTESIS	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA DPPH, FENOLES, FLAVONOIDES Y ANTOCIANINAS	13
EVALUACIÓN ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	13
CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	13
CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES	14
CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS	14
CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO	14
PREPARACIÓN DE LOS JUGOS DE FRUTAS.....	15
OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN ENZIMÁTICA S10 DE <i>VICIA FABA</i>	15
ACTIVACIÓN DE LA MEZCLA	15
ENSAYO DE AMES	16
<i>Preparación de bacterias</i>	16
<i>Ensayo de antimutagenicidad</i>	16
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	17
DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD PEROXIDASA	17
RESULTADOS	19
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	19

CONTENIDO DE ANTIOXIDANTES	19
ENSAYO DE ANTIMUTAGENICIDAD	19
SIN ACTIVACIÓN METABÓLICA VEGETAL	20
CON ACTIVACIÓN METABÓLICA VEGETAL.....	20
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE LA FRACCIÓN ENZIMÁTICA S10 DE <i>V. FABA</i> Y ACTIVIDAD PEROXIDASA	21
DISCUSIÓN.....	22
CONCLUSIONES.....	28
REFERENCIAS.....	29
TABLAS.....	37
FIGURAS.....	43

Resumen

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) pueden ser agentes causantes de gran cantidad de enfermedades humanas, incluyendo el cáncer. Existen agentes químicos que por sí mismos no son mutagénicos pero al ser metabolizados se transforman en mutágenos, capaces de dañar el DNA, mediante la producción de ERO, como en el caso de las aminas aromáticas. Por lo tanto mecanismos como los antioxidantes que actúan controlando el estrés oxidante (causado por las ERO) representan una importante línea de defensa para regular la salud humana. A los compuestos naturales que poseen propiedades anticarcinogénicas y antimutagénicas se les conoce como quimiopreventivos y la mayoría de ellos están disponibles en frutas y vegetales. Estudios epidemiológicos muestran que el alto consumo de frutas y verduras está asociado a la prevención de enfermedades crónicas, del corazón, diabetes, Alzheimer, con la baja incidencia y mortalidad del cáncer. Los beneficios de las frutas han sido atribuidos a la presencia de sustancias fitoquímicas como la vitamina C, vitamina E, carotenos, compuestos fenólicos entre otros.

El ensayo de Ames detecta mutágenos ambientales a través de mutaciones que llevan a la reversión de cepas muy sensibles de *Salmonella typhimurium* dependientes de histidina (His⁻) de auxótrofas a protótrofas. Si se le introducen fracciones microsómicas vegetales puede detectar promutágenos. Asimismo, su uso para identificar antimutágenos y posibles anticarcinógenos va en aumento.

En este trabajo se evaluó la actividad antioxidante de los jugos de kiwi, melón y sandía mediante el método de inhibición del radical 2,2-difenil-picril-hidrazil (DPPH) y se determinó el contenido de algunos antioxidantes (antocianinas, fenoles, flavonoides y ácido ascórbico) así como el efecto antimutagénico frente a la amina aromática 4-nitro-*o*-fenilendiamina (NOP) y sus metabolitos resultantes de la activación metabólica vegetal en la cepa TA98 de *S. typhimurium*.

La fracción enzimática S10 de *Vicia faba* transformó a la NOP, aumentando su mutagenicidad. Todos los jugos tienen actividad antioxidante en mayor o menor medida, y el contenido de antioxidantes varía en cada uno de ellos. El jugo de kiwi presenta la mayor actividad antioxidante (21 %) y un efecto antimutagénico frente a la NOP (>40 %) y sus metabolitos (>60 %). El jugo de sandía es efectivo al disminuir el número de colonias revertantes causadas por la NOP y sus metabolitos (>30 %) solo cuando se utiliza la concentración más baja, mientras que el jugo de melón no muestra efecto antimutagénico.

Introducción

Oxidantes y Antioxidantes

Las células en los seres humanos y otros organismos están constantemente expuestas a gran variedad de agentes oxidantes, algunos de los cuales son necesarios para la vida. Estos agentes pueden estar presentes en el aire, la comida y el agua, o ser producto de actividades metabólicas dentro de la célula (Liu 2003).

El oxígeno, componente vital para la supervivencia de la especie humana, está presente en la atmósfera en forma de un birradical triplete estable ($^3\text{O}_2$). Una vez dentro del cuerpo en la cadena respiratoria puede ser reducido a agua (Fig. 1), los intermediarios producidos durante este proceso son los radicales: superóxido (O_2^-), hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Ames *et al.* 1993, Ramarathnam *et al.* 1995, Sies 1997).

A estos radicales junto con el óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), el peroxinitrito (ONOO^-), el ácido hipoclorhídrico (HOCl), el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) y el ozono (O_3), se les conoce como especies reactivas de oxígeno (ERO) (Aruoma 1998). Estas pueden dañar el ADN, afortunadamente los animales cuentan con numerosas defensas antioxidantes para reducir los niveles de ERO, así como el daño inducido por éstas.

Los antioxidantes son compuestos que inhiben o retrasan la oxidación de moléculas. Estos pueden “secuestrar” a los radicales libres inhibiendo la iniciación o rompiendo la cadena de propagación o bien suprimiendo la formación de radicales ya sea mediante la unión a iones metálicos, reduciendo el peróxido de hidrógeno o desactivando el superóxido y el oxígeno singulete (Vieloglu *et al.* 1998, Zheng y Wang 2001, Guorong *et al.* 2009).

En los seres humanos estas defensas incluyen enzimas antioxidantes endógenas como la catalasa y la glutatión peroxidasa (ambas remueven el H_2O_2) así como la superóxido dismutasa (SOD) (que cataliza el radical superóxido para formar H_2O_2 y O_2) (Ames *et al.* 1993, Auroma 1998).

La clave para mantener una condición fisiológica óptima del cuerpo es mediante el balance entre los oxidantes y los antioxidantes. Una sobreproducción de oxidantes puede causar desequilibrio, llevando a estrés oxidante.

El estrés oxidante puede causar daño a grandes biomoléculas como proteínas, DNA y lípidos aumentando el riesgo de padecer cáncer y enfermedades cardiovasculares y degenerativas (Sies 1997, Sun *et al.* 2002, Liu 2003, García-Alonso *et al.* 2004). Cuando el daño al DNA no es reparado puede llevar a mutaciones en las bases, rupturas de sencilla y de doble cadena, entrecruzamientos, rompimiento y rearreglo de cromosomas.

Más y más evidencia sugiere que este daño oxidante potencialmente inductor de cáncer puede prevenirse o limitarse por antioxidantes en la dieta que se puede encontrar en frutas y verduras (Sun *et al.* 2002, Liu 2003).

Propiedades antioxidantes de las frutas

Las frutas contienen gran variedad de compuestos antioxidantes (fitoquímicos) como vitaminas, fenoles y carotenoides, que pueden ayudar a proteger los sistemas celulares del daño oxidante y de esta forma disminuir el riesgo de desarrollar algunas enfermedades (Liu 2003).

Las dietas con elevado consumo de frutas y verduras están muy asociadas con bajo riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, diabetes, Alzheimer, así como bajo riesgo de padecer cáncer (Eastwood 1999, Van de Berg *et al.* 2001, Sun *et al.* 2002, García-Alonso *et al.* 2004, Gurong *et al.* 2009).

Esta asociación está respaldada por amplia evidencia epidemiológica, especialmente por estudios de caso, así como de laboratorio que han demostrado el efecto protector de algunas plantas comestibles (Rice-Evans *et al.* 1997, Cortés-Eslava *et al.* 2004, García-Alonso *et al.* 2004).

Se ha mostrado que la población que consume pequeñas cantidades de frutas y verduras tiene mayor incidencia y mortalidad de cáncer, especialmente del tracto digestivo. Además se encontró en las frutas protección significativa en cáncer de pulmón, esófago, cavidad oral y laringe (La Vecchia *et al.* 2000, Liu 2003).

Compuestos fenólicos

Son metabolitos secundarios pertenecientes a la familia fenilpropanoide (C₃-C₆), derivados del ácido cinámico. Estos compuestos se forman de la fenilalanina y en menor medida en algunas plantas de la tirosina (Shahidi 2000).

Son grupos fitoquímicos de mayor incidencia en las plantas y tienen gran relevancia morfológica y fisiológica en estas ya que juegan un papel importante en el crecimiento y la reproducción, proveen protección contra patógenos y depredadores y contribuyen a características como el color de los frutos (Bravo 1998, Balasundram *et al.* 2006).

Estructuralmente constan de un anillo aromático, que porta uno o más sustituyentes hidroxilo. En la naturaleza van desde simples moléculas fenólicas a grandes compuestos polimerizados y se encuentran principalmente en formas conjugadas con uno o más residuos de azúcar unidos al grupo hidroxilo. Pueden ser clasificados en varios grupos dependiendo de su estructura, distinguiéndose por el número de carbonos que los constituyen como se muestra en la tabla 1 (Bravo 1998, Robards *et al.* 1999, Balasundram *et al.* 2006, Spencer *et al.* 2008).

Se ha reportado que exhiben un amplio rango de efectos biológicos, incluyendo acción antiviral, antibacterial, anti-inflamatoria, antialérgica y vasodilatadora. Además de capacidad antioxidante la cual esta relacionada con su habilidad de secuestrar radicales libres como el hidroxilo y el superóxido (Chimi 1991; Cook y Samman 1996).

Flavonoides

Constituyen una clase de compuestos fenólicos grande e importante y se han identificado más de 4000 tipos. Ubicuos en las plantas, especialmente comunes en las hojas, flores y polen, así como en las partes leñosas como el tallo y las raíces (Rice-Evans 1997 *et al.*, Balasundram *et al.* 2006).

Son compuestos de bajo peso molecular, que constan de 15 átomos de carbono, arreglados en una configuración C6-C3-C6. Su estructura consiste en dos anillos aromáticos A y B, unidos por un puente de 3 carbonos, usualmente en la forma de un anillo heterocíclico (Fig. 2). El anillo A deriva de la vía acetato/malonato, mientras que el anillo B deriva de la fenilalanina a través de la vía del shikimato.

Las variaciones en los patrones de sustitución del anillo C resultan en las clases de flavonoides (Tabla 2). Mientras que las sustituciones de los anillos A y B dan lugar a los diferentes compuestos dentro de cada clase de flavonoides, las cuales pueden ser oxigenación, alquilación, glicosilación, acilación y sulfatación (Cook y Samman 1996, Rice-Evans 1997, Bravo 1998, Balasundram *et al.* 2006, Spencer *et al.* 2008).

Antocianinas

Pertenecen a la clase de los flavonoides y son el más grande y diverso grupo de pigmentos derivados de la vía del fenilpropanoide. Normalmente se encuentran disueltas uniformemente en las vacuolas de las células epidérmicas y juegan un papel importante en el color de muchas frutas frescas y procesadas. Son los responsables de los colores anaranjado, rosa, rojo, violeta y azul (Hou *et al.* 2011, Rogez *et al.* 2011).

Químicamente son glicósidos y acilgliceridos solubles en agua de las antocianidinas. Se encuentran en la forma de polihidroxiados o metoxilados heterósidos, derivados oxigenados del 2-fenilbenzopirilo de las sales de flavilo. Existen 20 antocianidinas que difieren en el número y la posición de los grupos hidroxilo y metoxilo. Seis ampliamente distribuidas en las frutas, éstas son

modificadas resultando en cientos de moléculas de antocianinas, en la naturaleza se han identificado aproximadamente 400 antocianinas individuales (Yi *et al.* 2010, Hou *et al.* 2011).

Vitamina C

La Vitamina C (L-ácido ascórbico AA) (Fig. 3) está implicada en gran número de procesos celulares, actúa como co-substrato de las enzimas hidroxilasa y oxigenasa involucradas en la síntesis de pro-colágeno, carnitina y neurotransmisores.

Es un agente reductor (antioxidante) soluble en agua, que actúa como primera línea de defensa en la sangre contra el ataque de radicales libres, previene la propagación y rompe las cadenas oxidantes (Darias *et al.* 2011).

Mutágenos indirectos o promutágenos

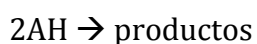
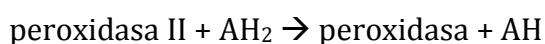
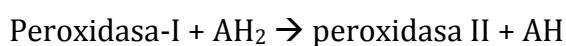
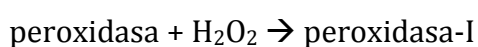
Un mutágeno es cualquier agente químico o físico capaz de incrementar significativamente la frecuencia normal de mutación (Bronzetti 1994). Existen agentes químicos conocidos como mutágenos indirectos o promutágenos que por si mismos no son mutagénicos pero al ser metabolizados por los diferentes sistemas enzimáticos de plantas y animales son transformados en mutágenos (Plewa y Weaver 1982, Gentile *et al.* 1985).

La “activación vegetal” es el proceso por el cual un promutágeno es transformado en mutágeno por los sistemas enzimáticos de las plantas (Plewa *et al.* 1993). Las reacciones responsables de las modificaciones químicas de xenobióticos en las plantas son de dos tipos:

Fase I (activación). Su función es crear sitios reactivos en el xenobiótico por la adición o exposición de grupos funcionales. Implica reacciones de hidroxilación y oxidación.

Fase II (conjugación). En esta los productos activados durante la fase I son inactivados por la unión covalente a una molécula hidrofílica, como glucosa, malonato o glutatión para formar un conjugado soluble en agua (Coleman *et al.* 1997).

Se han obtenido un número de reacciones potenciales para la activación de xenobióticos con enzimas de plantas. Mientras que los sistemas del citocromo P-450 son de importancia en la activación de xenobióticos en los animales, los citocromos P-450 de plantas parecen actuar en los xenobióticos en casos excepcionales (Sandermann 1988). Al parecer el principal mecanismo de biotransformación de xenobióticos en las plantas utiliza enzimas abundantes y ampliamente distribuidas, entre ellas, las peroxidasas (Chiapella *et al.* 2000). Las peroxidasas pueden catalizar reacciones de N- ó C-hidroxilación, N-sulfoxidación, N-acetilación, halogenación o descarboxilación (Plewa *et al.* 1991). Las reacciones de peroxidación normalmente proceden de la siguiente forma:



en donde la peroxidasa-I es designada como FeO_3^+ y la peroxidasa-II como FeO_2^+ , H_2O_2 es el sustrato de la peroxidasa y AH_2 es un sustrato no específico que funciona como un donador de hidrógeno (Higashi 1988, Plewa *et al.* 1991).

La formación de productos metabólicos tóxicos va a depender del tipo de compuesto y de sus propiedades fisicoquímicas (Calderón-Segura 1998). Generalmente el metabolito generado puede causar daño a la planta o ser conjugado y almacenado hasta liberarse y volverse activo al ser consumido por animales o por los seres humanos (Sandermann 1988).

Aminas aromáticas

Las aminas aromáticas son una familia de sustancias reconocidas como una clase de compuestos ambientales dañinos, incluye gran cantidad de agentes promutágenos y mutágenos, algunos de ellos potentes carcinógenos. Se encuentran extensamente distribuidas por su importante significado comercial y ambiental, son ampliamente usadas como intermediarios en la síntesis de anilinas en colorantes, farmacéuticos y plásticos. Además para la producción de pinturas,

barnices, pulidores de zapatos, perfumes, plaguicidas, plásticos, productos derivados del petróleo y resinas sintéticas (Ferrer *et al.* 2001, Janghel *et al.* 2005).

4- nitro-o-fenilendiamina (NOP)

La 4-nitro-o-fenilendiamina (Fig. 4) es una amina aromática monocíclica derivada de la anilina. Es un colorante amarillo de bajo peso molecular utilizado en la elaboración de textiles, comida y bebida, fármacos, cosméticos, tintes de cabello, plásticos, papel, piel, tintas de imprenta, barnices, plaguicidas y explosivos. (Chung *et al.* 1997).

Se ha demostrado que produce transformaciones morfológicas y aberraciones cromosómicas en gran variedad de ensayos en células de mamífero en cultivo (Palmer *et al.* 1977, Searle *et al.* 1977). Exhibe actividad mutagénica débil en ensayos en *Drosophila melanogaster* (Blijleven 1977). No produce aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos ni aumenta la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados en ratones (Niedziela *et al.* 1991) y no exhibe efecto teratogénico en estudios realizados con ratones y conejos (Burnett *et al.* 1976).

Presenta acción mutagénica directa en las cepas TA98 y TA100 de *S. typhimurium*, es decir, en ausencia de activación metabólica animal o vegetal, y esta asociada con el potenciamiento de la mutagenicidad por los sistemas enzimáticos de plantas, como lo han demostrado experimentos con la fracción S9 de plantas como la papa, chícharo y tabaco y S2 de *Zea mays* (Plewa y Weaver 1982, Gentile *et al.* 1985; Ysern *et al.* 1994).

Plewa *et al.* (1993) sugirió un modelo de activación metabólica vegetal para las aminas aromáticas. Éste consiste en la oxidación de la amina aromática por las peroxidasas de la planta, la conjugación a una macromolécula, transporte a la célula bacteriana y una acetilación/desacetilación por la acetilCoA: N-hidroxilamina O-acetiltransferasa (OAT) lo que produce un ion nitronio capaz de causar mutaciones en la bacteria.

Antimutágenos

La actividad antioxidante es una propiedad fundamental muy importante para la vida. Muchas de las funciones biológicas como la antimutagenicidad, anticarcinogenicidad y antienvejecimiento, entre otras se originan de esta propiedad (Velioglu *et al.* 1998).

El término antimutágeno es utilizado para referirse a cualquier agente que reduce el número de mutaciones espontáneas e inducidas (Bronzetti 1994). Han sido clasificados en dos categorías de acuerdo con su modo de acción: los desmutágenos, que inactivan los mutágenos *in vitro*, química y/o enzimáticamente, antes de que ataquen el DNA previniendo que las lesiones y mutaciones ocurran y los bio-antimutágenos que suprimen la fijación de la mutación después de que el DNA ha sido dañado por los mutágenos (Fig. 5) (Kada *et al.* 1987, Kuroda y Hara 1999).

Sistema biológico de prueba

Ensayo de Ames

Los sistemas bacterianos para la evaluación de mutagenicidad han estado disponibles desde hace muchos años. El ensayo de Ames o ensayo de *Salmonella* (para la mutagenicidad) es una prueba a corto plazo de bacterias con mutación reversa diseñado para detectar un amplio rango de agentes químicos que pueden producir daño genético que conduzca a mutaciones en los genes. Esta prueba emplea varias cepas de *Salmonella typhimurium* dependientes de histidina, cada una con una mutación diferente en varios genes del operón de histidina (Mortelmans y Zeiger 2000).

Cuando la cepa de *S. typhimurium* se cultiva en una placa con medio mínimo con trazas de histidina, solo aquellas bacterias que revierten la dependencia a histidina son capaces de formar colonias. El número de revertantes espontáneas es

relativamente constante, sin embargo cuando un mutágeno es añadido a la placa el número de colonias revertantes se incrementa (Mortelmans y Zeiger 2000).

La cepa TA98 detecta varios mutágenos de corrimiento de marco de lectura. Estos tienen la capacidad de cambiar pares de bases que generalmente ocurren en secuencias repetidas o "hot spots" del DNA, lo que resulta en una mutación que devuelve el marco de lectura correcto de la síntesis de histidina (Maron y Ames 1983).

Es una prueba versátil, flexible y útil para evaluar las propiedades antimutagénicas de mezclas complejas, para la identificación de componentes activos y para el estudio de los mecanismos de antimutagénesis. Una de las ventajas de esta prueba es la rapidez para obtener resultados. Además es usada mundialmente como un indicador inicial del potencial mutagénico de sustancias químicas y medicamentos o drogas (Mortelmans y Zeiger 2000, Ferrer *et al.* 2001).

Las bacterias son incapaces de metabolizar agentes químicos vía citocromo P450, por esta razón para que la prueba sea útil es necesario proveer a la bacteria de un sistema metabólico exógeno (Mortelmans y Zeiger 2000). En este trabajo se utilizó la fracción enzimática S10 de *Vicia faba* como activador metabólico, la cual ha probado ser efectiva activando plaguicidas *in vivo* e *in vitro* y el daño genotóxico y citotóxico de los metabolitos se ha demostrado en experimentos de intercambio de cromátidas hermanas (Calderón-Segura *et al.* 2007).

Objetivos

- Determinar la capacidad antioxidante de los jugos de kiwi (*Actinidia chinensis*) sandía (*Citrillus lanatus*) y melón (*Cucumis melo*)
- Valorar si los antioxidantes confieren un efecto antimutagénico a los jugos de frutas frente a la mutagenicidad inducida por la amina aromática 4-nitro-o-fenilendiamina y sus metabolitos en la cepa TA98 de *S. typhimurium*.
- Evaluar la capacidad de la fracción enzimática S10 de *V. faba* para potenciar la mutagenicidad de la amina aromática: 4-nitro-orto-fenilendiamina (NOP).

Hipótesis

- Se espera que la fracción enzimática S10 de *V. faba* aumente la mutagenicidad inducida por la NOP en las cepa TA98 de *S. typhimurium*.
- El alto contenido de antioxidantes de los jugos de frutas presentará una actividad antioxidante, que los hará capaces de disminuir la mutagenicidad inducida en *Salmonella typhimurium* por la amina aromática NOP y sus metabolitos producto de la activación metabólica vegetal.

Materiales y métodos

Obtención de muestras para DPPH, fenoles, flavonoides y antocianinas

Se pesa 0.1g de muestra y se maceran en etanol al 80 %, se pusieron en baño de agua por 5 min. Se centrifugó a 13 000 rpm por 5 min.

Evaluación actividad antioxidante

Se realizó mediante el método de inhibición del radical 2,2-difenil-picril-hidrazil (DPPH), descrito por Brand-Williams *et al.* (1994) con modificaciones de Martha Elena Mora Herrera (comunicación personal). Se hizo reaccionar 250 µL de muestra con 2750 µL de DPPH (50 µM) en etanol al 80 %, durante una hora en oscuridad. Se leyó la absorbancia a 517 nm. Para la determinación de la actividad antioxidante los resultados fueron expresados como mg equivalentes de Trolox (TE)/100 g de peso fresco. El Trolox es un derivado soluble en agua de la vitamina E. Y en términos de reducción de DPPH aplicando la siguiente fórmula:

% reducción DPPH = $((A_0 - A_1) / A_0) \times 100$, donde A_1 es la absorbancia de la muestra y A_0 es la absorbancia de la solución de DPPH.

Cuantificación de compuestos fenólicos

Se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu (Waterman y Mole 1994) con modificaciones de Martha Elena Mora Herrera (comunicación personal). Se hizo reaccionar 0.2 mL de muestra con 0.15 mL de solución Folin-Ciocalteu (1/10 en agua). Se le adicionaron 0.5 mL de solución de carbonato de sodio al 20% y se aforó a 4.5 mL con agua destilada. Las muestras se dejaron reposar en oscuridad durante 30 min. Se leyó la absorbancia a 760 nm. El contenido de compuestos fenólicos totales se expresó como equivalentes de ácido gálico (GAE)/100 g de peso fresco.

Cuantificación de flavonoides

Se realizó mediante el método descrito por Huang *et al.* (2006), con modificaciones de Martha Elena Mora Herrera (comunicación personal). A 0.5 mL de muestra se le añadió 1.0 mL de cloruro de aluminio al 2 %. Se dejó reaccionar 15 min en oscuridad. La absorbancia se leyó a 430 nm. El contenido de flavonoides se calculó en las bases de curva de calibración de quercetina y los resultados se expresaron como mg de quercetina por 100 g de peso fresco.

Cuantificación de antocianinas.

Se llevo a cabo mediante el método del pH diferencial reportado por Villanueva-Tiburcio *et al.* (2010). Se tomaron 200 µL de muestra y se diluyeron en 1,800 µL de amortiguador de pH 1,0. Se tomaron otros 200 µL de muestra y se diluyeron en 1,800 µL de amortiguador de pH 4.5. Se leyó la absorbancia de ambas muestras a 510 nm y 700 nm.

La concentración de antocianinas fue calculada con la siguiente formula:

$$C \text{ (mg/mL)} = A \times 482.82 \times (1000/24825) \text{ DF.}$$

Donde A = (Abs510-Abs700) pH1.0 - (Abs510-Abs700) pH4.5, 484.82 es la masa molecular de la cianidina 3-glucósido, 24825 es la absortividad molar a 510 nm, DF es el factor de dilución.

Cuantificación de ácido ascórbico

Se realizó mediante el método descrito por Barros *et al.* (2007), con modificaciones de Martha Elena Mora Herrera (comunicación personal).

Se extraen 75 mg de muestra en 1.5 mL de ácido metafosfórico al 1 %. Se dejó en agitación por 30 min en oscuridad y se centrifugó a 1600 g durante 15 min a 4 °C.

Alícuotas de 250 mL se mezclaron con 2.25 mL de dicloroindofenol. La absorbancia se leyó inmediatamente a 515 nm. El contenido de ácido ascórbico se calculó en las bases de la curva de calibración con ácido ascórbico auténtico y los resultados se expresaron como mg de ácido ascórbico por 100 g de peso fresco.

Preparación de los jugos de frutas

Las muestras de las frutas bajo investigación (kiwi, sandía y melón), fueron compradas en un supermercado. Se prepararon según el protocolo de Edenharter *et al.* (2002). Se cortó la fruta y las partes comestibles fueron homogeneizadas con un extractor casero. Los jugos obtenidos se centrifugaron a 10 000 rpm durante 60 min a 4°C. El sobrenadante se ajustó a pH 7.4 con NaOH (10 M) y se esterilizó por filtración millipore (0.45 µL). Los extractos se probaron inmediatamente o se almacenaron a -20 °C .

Obtención de la fracción enzimática S10 de *Vicia faba*

Las semillas de *V. faba* se remojaron 24 horas en oscuridad, se pusieron a germinar en dos capas de algodón humedecido con agua. Cuando las raíces del haba alcanzaron una longitud de aproximadamente 5 cm a las plántulas se les cortaron 2 cm de la raíz, se maceraron en un mortero en proporción 1:1 con una solución de fosfato de sodio monobásico y dibásico 0.1 M a un pH de 7.4, 1 mM de ditiotreitól 1 mM de EDTA, 0.6 M de Manitol, polivinilpolipirrolidona al 10 %, se homogeneizaron en un macerador de tejidos vegetales por 3 min aproximadamente, finalmente se centrifugó a 11 500 rpm durante 30 min a 4 °C. Se extrajo el sobrenadante y se esterilizó por filtración millipore (0.45 µL).

Activación de la mezcla

Para activar la mezcla enzimática S10 a la fracción microsómica S10 de *V. faba* se le añadió en relación 1:9 v/v una mezcla de amortiguador de fosfatos (pH 7.4) con MgCl₂ 8 X 10⁻³ M, KCl 3.3 X 10⁻² M, Glucosa 6-fosfato 5 X 10⁻³ M y NAD 4 X 10⁻³ M (Calderón- Segura *et al.* 1999).

Ensayo de Ames

Preparación de bacterias

Antes de iniciar el ensayo se verificaron los marcadores genéticos para la cepa TA98 de *S. typhimurium*, descrito por Sánchez-Estrada (2008). A partir de una placa patrón de la cepa se seleccionaron cinco colonias y se sembraron en un tubo con medio LB en agitación constante a 37 °C durante 24 h para su proliferación. A partir de cada tubo se realizó la siembra en los medios correspondientes para verificar los marcadores genéticos.

La dependencia a histidina (His-) fue comprobada sembrando la bacteria en estrías en medio mínimo con biotina y medio con histidina y biotina en exceso. Solo debe haber crecimiento en la placa con histidina y biotina en exceso. La mutación rfa fue comprobada por la sensibilidad a cristal violeta. Se sembró la bacteria perpendicular a líneas de cristal violeta en una placa de medio mínimo. Se debe presentar una clara zona de inhibición de crecimiento en las áreas con cristal violeta. La presencia del plásmido pKM101 fue comprobada por la resistencia a antibióticos al sembrar la cepa en una placa con medio completo (NB) y una placa con medio completo NB suplementado con ampicilina. Debe de haber crecimiento en ambas placas.

Ensayo de antimutagenicidad

El efecto antimutagénico de cada jugo de fruta fue probado mediante el método de Ames (Maron y Ames 1983) utilizando el procedimiento de preincubación. Una mezcla de la bacteria y de los diferentes volúmenes de extracto de fruta (10, 250 y 500 µL) fue preincubada a 37 °C durante una hora. En un tubo de agar de superficie fundido se añadieron 600 µL de la mezcla antes mencionada y 100 µL de NOP con y sin S10 (500 µL). El agar de superficie se vertió sobre una placa de agar de medio mínimo. Se contaron el número de revertantes por placa después de ser incubadas 37 °C durante 48 h.

El efecto antimutagénico es expresado como el porcentaje de inhibición de la mutagenicidad (Ikken *et al.* 1998).

% Inhibición = $100 - (R_1/R_0 \times 100)$, donde R_1 es el número de colonias revertantes de las placas expuestas a los extractos frutales y R_0 es el número de colonias revertantes del testigo positivo para mutagenicidad. El número de revertantes espontáneas se restó del numerador y del denominador. Los porcentajes se clasificaron de la siguiente forma: 0-20 (negativo), 20-40 (positivo débil), 40-60 (positivo), 60-80 (muy positivo), 80-100 (se sospecha toxicidad) (Bunkova *et al.* 2005).

Las placas solo con la bacteria fueron consideradas como el testigo negativo, las placas con la amina aromática (NOP) fueron consideradas como testigo positivo. Además se añadió un testigo positivo para la antimutagenicidad (clorofilina 10 μ L).

Cuantificación de proteínas

Se utilizó el método BioRad (Bradford 1976) para determinar el contenido de proteína en la fracción S10 de *V. faba*.

El volumen total de reacción fue de 1 mL, en cada cubeta de espectrofotómetro se agregó:

795 μ L de agua destilada

5 μ L de la muestra de S10

200 μ L de reactivo de Bradford

Las muestras se cuantificaron por triplicado en un espectrofotómetro a 595 nm, media hora después de haber hecho la mezcla.

Determinación de actividad peroxidasa

Para determinar la actividad peroxidasa, se midió la oxidación de guayacol a tetraguayacol, monitoreando el cambio de absorbancia a 470 nm durante 5 min cada 30 s en un espectrofotómetro.

Se analizó la actividad peroxidasa en un volumen de reacción de 3 mL, en cada cubeta de espectrofotómetro se agregó:

1 mL de H₂O₂ al 3%

1 mL de guayacol al 1 %

10 µL de la muestra de S10

990 µL de amortiguador de fosfatos pH 7.4

Después de adicionar el último componente (guayacol) rápidamente se invirtió la cubeta dos veces y se comenzó a monitorear la reacción. Se realizaron de 3 a 5 repeticiones para cada muestra en cada experimento.

La tasa de la actividad peroxidasa se estimó de acuerdo con la siguiente ecuación (Gichner *et al.* 1994):

$$\frac{[(A470/E470 \times l) V/P]}{t \text{ min}}$$

Donde:

A470 es la absorbencia a 470 nm.

E470 es el coeficiente de extinción del tetraguayacol (26.6/Mm/cm)

l es la longitud de trayectoria de la cubeta (1 cm)

V es el volumen en reacción en litros

P es el contenido de proteínas en µg

t min es el tiempo en minutos

Resultados

Determinación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante total de los jugos de frutas se obtuvo al evaluar la reducción del radical DPPH. El extracto con mayor capacidad antioxidante es el jugo de kiwi con 21 % de reducción del DPPH seguido por el jugo de melón (6.4 %), la clorofilina (4.8 %) y el jugo de sandía (1.6 %) (Fig. 6).

Contenido de antioxidantes

La tabla 3 muestra el contenido de fenoles, flavonoides, antocianinas y ácido ascórbico de los jugos de kiwi, sandía y melón. También se exponen los resultados de la actividad antioxidante expresados como equivalentes de Trolox.

De los extractos analizados el jugo de kiwi es el que presenta mayor contenido de fenoles totales, seguido por la clorofilina, el jugo de melón y por último el jugo de sandía. En cuanto al contenido de flavonoides el extracto que exhibe una mayor cantidad es la clorofilina seguida del jugo de kiwi, jugo de sandía y jugo de melón. El jugo de sandía es el que muestra mayor contenido de antocianinas seguido del jugo de kiwi. No se detectó la presencia de estos pigmentos en el extracto de clorofilina ni el jugo de melón. El contenido de ácido ascórbico es el siguiente: kiwi>melón>clorofilina>sandía. Los resultados de la actividad antioxidante se expresaron como mg equivalentes de Trolox por 100 g de peso fresco. El mayor contenido lo presenta el jugo de kiwi, seguido del jugo de melón, la clorofilina y el jugo de sandía.

Ensayo de antimutagenicidad

Ninguno de los jugos de fruta muestra efecto mutagénico ó citotóxico en concentraciones de hasta 500 μ L/placa en la cepa TA98 de *S. typhimurium* (Tabla 4).

El efecto antimutagénico de los jugos de frutas fue evaluado por medio de la prueba de Ames, los resultados se presentan como la media de colonias revertantes de tres experimentos independientes (Tabla 5). Se muestra los valores del testigo negativo, del testigo positivo para mutagenicidad (NOP) y para antimutagenicidad (clorofilina).

Sin activación metabólica vegetal

Los jugos de kiwi y sandía disminuyen el número de colonias revertantes con respecto al testigo positivo para la mutagenicidad (NOP). En el caso del jugo de kiwi (Fig. 7) con todas las concentraciones empleadas la disminución es significativa ($p < 0.001$), mientras que con el jugo de sandía (Fig. 8) el número de colonias revertantes presenta disminución significativa ($p < 0.001$) sólo con 10 μL /placa. Con 250 μL y 500 μL /placa la reducción en el número de colonias revertantes no es significativa. El jugo de melón no varía significativamente el número de colonias revertantes con ninguna de las concentraciones empleadas (Fig. 9).

En la Fig. 10 se pueden observar los porcentajes de antimutagenicidad obtenidos para todos los jugos de frutas. El jugo de kiwi exhibe una inhibición de la mutagenicidad alta con todos los volúmenes empleados, 43 %, 49 % y 53 % con 10, 250 y 500 μL , respectivamente. El jugo de sandía inhibe la mutagenicidad de la NOP moderadamente (39 %) con 10 μL /placa. Las concentraciones de 250 y 500 μL /placa presentan porcentajes de inhibición bajos (<20 %). Por su parte el jugo de melón no presenta efecto inhibidor (0 %) con ninguna concentración empleada.

Con activación metabólica vegetal

La fracción S10 transformó la amina aromática, lo cual se puede observar en un aumento significativo en el número de colonias revertantes con respecto al testigo negativo.

El jugo de kiwi disminuye el promedio de colonias revertantes de forma significativa ($p < 0.001$) con respecto al testigo positivo para la mutagenicidad

(NOP) con todas las concentraciones empleadas (Fig. 7). Con el jugo de sandía se observa disminución significativa ($p < 0.001$) con la menor concentración (10 $\mu\text{L}/\text{placa}$), con 250 y 500 $\mu\text{L}/\text{placa}$, la reducción en el número de colonias revertantes no es significativa (Fig. 8). La disminución en el número de colonias revertantes es significativa ($p < 0.001$) con el jugo de melón únicamente cuando se utilizaron 250 $\mu\text{L}/\text{placa}$. Para las concentraciones de 10 y 500 $\mu\text{L}/\text{placa}$ no hay variación significativa en el número de revertantes (Fig. 9).

Todos los jugos de fruta inhiben la mutagenicidad en menor o mayor medida. (Fig. 10). El jugo de kiwi presenta inhibición alta (>60 %) en todos los volúmenes utilizados. Por su parte, el jugo de sandía muestra inhibición moderada con 10 $\mu\text{L}/\text{placa}$ (30 %) y baja 19 % y 13 % para 250 y 500 $\mu\text{L}/\text{placa}$, respectivamente. El jugo de melón inhibe la mutagenicidad de forma baja (15 y 20 %) con 10 y 250 $\mu\text{L}/\text{placa}$, respectivamente, con 500 $\mu\text{L}/\text{placa}$ no se observa efecto inhibitor (0 %).

Cuantificación de proteínas de la fracción enzimática S10 de *V. faba* y actividad peroxidasa

Para tratar de elucidar el mecanismo de acción de la amina aromática se cuantificó el contenido de proteínas totales y la actividad peroxidasa en el extracto de la fracción S10 de *V. faba* incubada con la NOP durante 4 horas (Tabla 6). La concentración de proteínas y la actividad peroxidasa no variaron significativamente con respecto al valor testigo ($p < 0.001$) ANOVA *post hoc* Tukey.

Discusión

Las prácticas de agricultura moderna hacen que las plantas utilizadas para consumo humano estén expuestas a gran número de agentes xenobióticos (Sandermann 1988). Esto es de vital importancia ya que han demostrado ser capaces de transformar o potenciar la actividad de algunos xenobióticos, como las aminas aromáticas, que son ampliamente usadas en la elaboración de plaguicidas (Janghel *et al.* 2005).

Se han desarrollado muchas técnicas para estudiar las bio-transformaciones, entre estas se incluye el uso de plantas intactas, suspensión de células y extractos de tejidos (Gentile *et al.* 1985). El método *in vitro*, consiste en la incubación de un agente químico con un homogeneizado de planta suplementado con cofactores. Este homogeneizado es ensayado posteriormente con un microorganismo como indicador para detectar la presencia de metabolitos generados (Plewa 1978, Calderón-Segura 1998).

Gran cantidad de trabajos muestran que los homogeneizados de plantas son muy efectivos en activar promutágenos a mutágenos o en potenciar su mutagenicidad. Esas fracciones son: la S2 de *Zea mays*, la S9 de papa, papa de Jerusalén, chícharo y tabaco. Sin embargo, aunque han demostrado ser efectivos, la activación de los agentes químicos depende del homogeneizado utilizado (Ysern *et al.* 1994). La NOP es un mutágeno directo, cuya actividad ha sido potenciada en presencia del metabolismo de *Z. mays* y de células de tabaco (Plewa *et al.* 1982, Gentile *et al.* 1985).

En este trabajo la activación vegetal *in vitro* fue utilizada, la fracción enzimática S10 de *V. faba* se incubó con la NOP y se ensayó en la cepa TA98 de *S. typhimurium*. Los resultados obtenidos (Tabla 5) muestran la capacidad de la S10 para transformar metabólicamente a la NOP, potenciando su mutagenicidad, al aumentar a más del doble el número de colonias revertantes, comparadas con el número obtenido en ausencia de activación metabólica.

Se ha propuesto que la activación metabólica vegetal se produce por acción de enzimas peroxidasas (Plewa *et al.* 1993). En este trabajo se realizó la cuantificación de proteínas y se calculó la actividad peroxidasa de la fracción enzimática S10 de *V. faba* sola y después de haber sido incubada por 4 h con la NOP. Los resultados obtenidos muestran que no existe diferencia significativa en el contenido de proteínas y no se registran cambios en la actividad peroxidasa. Esto sugiere que la activación de la amina aromática es seguida de la actividad peroxidasa; en otros estudios en los que se han utilizado fracciones vegetales como activadores metabólicos se han obtenido los mismos resultados (Cortés-Eslava *et al.* 2004).

La capacidad de las plantas para metabolizar estos compuestos representa un riesgo latente a la salud humana, estos promutágenos pueden ser responsables de la producción excesiva de ROS en el organismo, dañando al DNA (Murata *et al.* 2001).

Se ha asociado la producción de radicales libres con el padecimiento de cáncer y enfermedades cardiovasculares y degenerativas (Ferrer *et al.* 2001, Sun *et al.* 2002). La prevención de este tipo de enfermedades se conoce como quimioprevención y es un área de creciente interés cuyo objetivo final es la implementación de medidas para mejorar la salud humana. Para lograr este objetivo se ha dado a la búsqueda de agentes quimiopreventivos, muchos de los cuales se pueden encontrar en la dieta, en el consumo de frutas y verduras (Ikken *et al.* 1998, Ferrer *et al.* 2001).

La prueba de Ames es versátil, flexible y útil para identificar antimutágenos y posibles anticarcinógenos. De hecho su uso para estudiar los mecanismos de antimutagénesis en mezclas va en aumento (Ferrer *et al.* 2001, Bunkova *et al.* 2005).

Específicamente el procedimiento de preincubación está diseñado para favorecer la penetración del modulador, en este caso el jugo de fruta en las células bacterianas previo a la exposición al mutágeno. Esto hace posible investigar las reacciones intracelulares del modulador con el mutágeno (De Flora *et al.* 1992).

En este trabajo se evaluó por medio del ensayo de Ames la capacidad antimutagénica de los jugos de kiwi, melón y sandía frente a la mutagenicidad inducida por la NOP y sus metabolitos producto de la activación metabólica vegetal.

Los resultados obtenidos indican que el jugo de kiwi tiene efecto antimutagénico contra la mutagenicidad directa de la NOP y contra sus metabolitos obtenidos por la activación metabólica vegetal, ya que disminuyó significativamente el número de revertantes (Fig. 7). No se observa inhibición dosis-dependiente ya que no existe diferencia significativa en la reducción de la mutagenicidad con las diferentes concentraciones utilizadas (10, 250 y 500 $\mu\text{L/placa}$). En los tratamientos en los que no se proporcionó activación metabólica vegetal, el porcentaje de inhibición de la mutagenicidad alcanzó el 53 % y en presencia del metabolismo vegetal el 64 %, esto permite clasificar al jugo de kiwi, de acuerdo con Bunkova *et al.* (2005) como un antimutágeno positivo (Fig. 10). No solo la disminución en el número de revertantes si no el porcentaje de inhibición de la mutagenicidad es significativamente mayor en comparación con los resultados obtenidos con la clorofilina, antimutágeno reconocido (García y Altamirano 2007), utilizado en este trabajo como testigo positivo.

Los datos de este trabajo indican que el jugo de sandía exhibe un efecto antimutagénico en los ensayos con y sin activación metabólica pero sólo con la concentración más baja (10 $\mu\text{L/placa}$), esto junto con los porcentajes de inhibición (Figs. 8 y 10) permite clasificar al jugo de sandía como un antimutágeno débil solo en la dosis más baja utilizada, para las otras concentraciones no se observa efecto antimutagénico.

Para el jugo de melón solo se observó una disminución significativa en el ensayo en el que se utilizó la fracción S10 como activador metabólico con 250 $\mu\text{L/placa}$ (Fig. 9). El porcentaje de inhibición de la mutagenicidad de 21 %, al comparar con los demás resultados del jugo de melón, se puede observar que los porcentajes de

inhibición de la mutagenicidad en todos los casos son menores a 20 % (Fig. 10), y la disminución en el número de revertantes en la mayoría de los casos no es significativa, por lo tanto no es considerado un antimutágeno.

Los resultados obtenidos en este trabajo no muestran una respuesta dosis-dependiente, esto es común al trabajar con muestras complejas como los jugos de frutas. El efecto del agente químico que se modifica puede verse potenciado o inhibido dependiendo del mecanismo de acción del jugo. Además los jugos pueden actuar fuera de la bacteria interviniendo así con su metabolismo. Otros efectos dentro o fuera de la bacteria pueden incluir la modificación química o enzimática del mutágeno. En trabajos en los que se evalúa la capacidad antimutagénica de extractos de frutas y verduras se ha observado esta respuesta no-lineal (Ikken *et al.* 1998).

En este trabajo se trató de elucidar el mecanismo de antimutagénesis, el jugo de kiwi es un antimutágeno efectivo en todos los volúmenes empleados para disminuir la mutagenicidad causada por la NOP y sus metabolitos, mientras que el jugo de sandía solo tiene actividad antimutagénica débil con 10 µL/placa. Estos resultados junto con los obtenidos para la actividad peroxidasa y la concentración de proteínas, los cuales indican que no hubo cambio después de la incubación con el mutágeno, sugiere que la interferencia de los jugos de fruta ocurre con los grupos activos de las aminas aromáticas y/o con sus metabolitos, pero no con las enzimas metabólicas.

Se ha sugerido que los fitoquímicos purificados pueden no tener las mismas propiedades benéficas que la mezcla que existe en una fruta completa o en una mezcla de frutas. Se considera que los suplementos no tienen el mismo efecto que una dieta rica en frutas y verduras, ya que, tomados solos, los antioxidantes estudiados en casos clínicos no parecen tener un efecto preventivo consistente. Esto puede deberse a que el compuesto por si solo puede perder bioactividad o no comportarse de la misma forma en que lo hace en la fruta (Sun *et al.* 2002, Liu 2003).

La hipótesis planteada es que la actividad antimutagénica que exhiben los jugos de frutas se debe a su actividad antioxidante. La actividad antioxidante de los jugos de frutas se evaluó mediante la reducción del ion DPPH, los resultados obtenidos (Fig. 6) muestran que todos los extractos tienen actividad antioxidante en mayor o menor medida. Siendo el jugo de kiwi el de mayor. No existe diferencia significativa ($p > 0.001$) entre el jugo de melón y sandía con respecto a la clorofilina.

Los resultados para el contenido de los diferentes antioxidantes evaluados se muestran en la tabla 3, se puede observar que existe una diferencia entre la composición de cada extracto. El jugo de kiwi tiene presentes todos los antioxidantes, es el de mayor contenido de vitamina C, equivalentes de Trolox y fenoles totales.

El jugo de sandía es el de mayor contenido de antocianinas y tiene cantidades bajas de los otros antioxidantes. El jugo de melón no presenta antocianinas y tiene un bajo contenido de los demás antioxidantes. La clorofilina es el extracto con mayor contenido de flavonoides, un alto contenido de fenoles, bajo contenido de ácido ascórbico, equivalentes de Trolox y no se encontraron antocianinas.

El kiwi que es el jugo con mayor actividad antioxidante es también el de mayor efecto antimutagénico, sin embargo los extractos de sandía, melón y clorofilina cuya actividad antioxidante no varía exhiben diferencias en cuanto a la disminución de la mutagenicidad de la NOP, la clorofilina es un antimutágeno positivo, la sandía es un antimutágeno positivo débil solo para el volumen más bajo y el melón no muestra efecto antimutagénico. Esto sugiere que la actividad aditiva y sinérgica de los compuestos presentes en la fruta es la responsable de sus beneficios. Por lo tanto es más recomendable obtener los antioxidantes de una dieta rica en frutas y verduras que de suplementos alimenticios.

Los componentes en el jugo de kiwi y sandía tienen actividad antioxidante y de secuestradores de iones por lo tanto sus mecanismo de acción antimutagénica puede incluir la interacción de los grupos activos o los radicales libres que resultan

del agente químico (NOP). Esto permite clasificar a los jugos de fruta según Kada y Shimoi (1987) como desmutágenos, ya que actúan directamente con las moléculas formando compuestos inactivos o lo vuelven inadecuado para la activación enzimática.

Los resultados de este trabajo apoyan la idea de que los constituyentes naturales de las frutas pueden modular los procesos de mutagénesis y posible carcinogénesis. La capacidad antimutagénica del jugo de kiwi quedó demostrada y debe ser un resultado importante a tomar en cuenta, para incluir el consumo de esta fruta en la dieta.

Se debe considerar que los resultados obtenidos en este trabajo son el resultado de ensayos *in vitro*, y deben de servir para respaldar futuras investigaciones realizadas *in vivo* que permitan mejorar el entendimiento del papel de los antimutágenos provenientes de la dieta en la prevención de enfermedades crónicas en seres humanos.

Conclusiones

Los resultados obtenidos aunados a la revisión de la literatura permiten concluir:

- La fracción enzimática S10 de *Vicia faba* es capaz de activar metabólicamente agentes químicos. Aumenta la actividad mutagénica de la NOP.
- Todos los jugos de frutas tienen actividad antioxidante, sin embargo no todos exhiben efecto antimutagénico.
- El jugo de kiwi puede clasificarse como un antimutágeno positivo frente a la acción de la NOP y sus metabolitos.
- El jugo de sandía actúa como un antimutágeno débil solo con 10 µL/placa.
- El jugo de melón no inhibe la mutagenicidad de la NOP, por lo tanto en las condiciones estudiadas en este trabajo no es considerado un antimutágeno.
- La potente actividad antioxidante de algunas frutas es resultado de la combinación natural de fitoquímicos presentes en éstas.
- Incrementar el consumo de frutas es una estrategia práctica de los consumidores para mejorar su salud y reducir el riesgo de padecer enfermedades crónicas.

Referencias

Ames B. N., Shigenaga M. K. y Hagen T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *PNAS*. 90: 7915-7922.

Auroma O. I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 75: 199-208.

Balasundram N., Sundram K. y Samman S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99: 191-203.

Barros L., Ferreira M. J., Queirós B., Ferreira I. C. F. R. y Baptista P. (2007). Total phenols, ascorbic acid, b-carotene and lycopene in portugese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry*. 103: 413-419.

Blijleven W. H. G. (1977). Mutagenicity of four hair dyes in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*. 48: 181-186.

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

Brand-Williams W., Cuvelier M. E. y Berset C. (1995). Use of a free radical to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*. 28: 25-30.

Bravo L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutrition significance. *Nutrition Reviews*. 56: 317-333.

Bronzetti G. (1994). Antimutagens in food. *Trends in Food and Science & Technology*. 5: 390-394.

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

Burnett C., Goldenthal E. I., Harris S. B., Wazeter F. X., Strausburg J., Kapp R., y Voelker R. (1976). Teratology and percutaneous toxicity studies on hair dyes. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 2: 657-662.

Calderón-Segura M. E. (1998). Evaluación del efecto genotóxico provocado por los herbicidas tricarbámicos molinate y butilato en dos sistemas de prueba con la participación del metabolismo vegetal. Tesis de Doctorado en Ciencias. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

Calderón-Segura M. E., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini, R. y Espinosa-Ramírez M. (1999). *In vivo* and *in vitro* promutagen activation of thiocarbamate herbicides molinate and butylate to products inducing sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. *Mutation Research*. 438: 81-88.

Calderón-Segura M. E., Gómez-Arroyo S., Molina-Alvarez B., Villalobos-Pietrini R., Calderón-Ezquerro C., Cortés-Eslava J., Valencia Quintana P. R., López-González L., Zuñiga-Reyes R. y Sánchez-Rincón J. (2007). Metabolic activation of herbicide products by *Vicia faba* detected in human peripheral lymphocytes using alkaline single cell gel electrophoresis. *Toxicology in Vitro*. 21: 1143-1154.

Chiapella C., Radovan R. D., Moreno J. A., Casares L., Barbé J. y Llagostera M. (2000). Plant activation of aromatic amines mediated by cytochromes P450 and flavin-containing monooxygenases. *Mutation Research*. 470: 155-160.

Chimi H., Cillard J., Cillard P. y Rhamani M. (1991). Peroxyl and hidroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *Journal of the American Oil Chemist's Society*. 68: 307-312.

Chung KT., Kirkovsky L., Kirkovsky A. y Purcell W. P. (1997). Review of mutagenicity of monocyclic aromatic amines: quantitative structure-activity relationship. *Mutation Research*. 387: 1-16.

Coleman J. O. D., Blake-Kalff M. M.A. y Davies T.G. E. (1997) Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science*. 2: 144-151.

Cook N. C., Samman S. (1996). Flavonoids — Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry*. 7: 66-76.

Cortés-Eslava J., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R. y Espinosa-Aguirre J. J. (2004). Antimutagenicity of coriander (*Coriandrum sativum*) juice on the mutagenesis produced by plant metabolites of aromatic amines. *Toxicology Letters*. 153: 283-292.

Darias M.J., Mazurais D., Koumoundouros G., Cahu C.L., Zambonino-Infante J.L. (2011). Overview of vitamin D and C requirements in fish and the influence on the skeletal system. *Aquaculture*. 315: 49-60.

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

Eastwood M. A. (1999). Interaction of dietary antioxidants *in vivo*: how fruit and vegetables prevent disease? *QJMedicine (Oxford)* 92: 527-530.

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. *Mutation Research*. 522: 57-72.

Farr S. B. y Kogoma T. (1991). Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiological Reviews*. 55: 561-585.

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. *Mutation Research*. 498: 99-105.

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

García-Alonso M., Pascual-Teresa S., Santos-Buelga C. y Rivas-Gonzalo J. C. (2004). Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chemistry*. 84: 13-18.

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

Gichner T., Cabrera L. G., Wagner E. D. y Plewa M.J. (1994). Induction of somatic mutations in *Tradescantia* clone 4430 by three phenylenediamine isomers and the mutagenesis mechanism of diethylditiocarbamate and ammonium metavanadate. *Mutation Research*. 316: 164-172.

Guorong D., Mingjun L., Fengwang M. y Dong L. (2009) Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and vitamin C in *Actinidia* fruits. *Food Chemistry*. 113: 557-562.

Higashi K. (1988). Metabolic activation of environmental chemicals by microsomal enzymes of higher plants. *Mutation Research*. 197: 273-288.

Hou Z., Qin P., Cui S. y Ren G. (2011). Identification of anthocyanins isolated from black rice (*Oryza sativa* L.) and their degradation kinetics. *Food Research International*. doi:10.1016/j.foodres.2011.07.037.

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

Ikken Y., Cambero I., Marín M. L., Martínez A., Haza A. I. y Morales P. (1998). Antimutagenic effect of fruit and vegetables aqueous extracts against n-nitrosamines evaluated by the Ames test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 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. *Industrial Research*. 64: 594-597.

Kada T. y Shimoi K., (1987). Desmutagens and bio-antimutagens — their modes of action. *BioEssays*. 7: 113-116.

Kuroda Y. y Hada Y. (1999). Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutation Research*. 474: 71-85.

La Vecchia C., Altieri A. y Tavani A. (2001). Vegetables, fruit, antioxidants and cancer: a review of italian studies. *European Journal of Nutrition*. 40: 261-267.

Liu R. H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *American Journal of Clinical Nutrition* 78: 517-520.

Maron D. M. y Ames B. N. (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*. 113: 173-215.

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

Murata M., Tamura A., Tada M. y Kawanashi S. (2001). Mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic 4-aminobiphenyl. *Free Radical Biology and Medicine*. 30: 765-773.

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

Palmer K. A., Denunzio A., y Green S. (1977). The mutagenic assay of some hair dye components using the thymidine kinase locus of L5178Y Mouse lymphoma cells. *Journal of Environmental Phatology and Toxicology*. 1: 87-91

Plewa M. J. (1978). Activation of chemicals into mutagens by green plants: a preliminary discussion. *Environmental Health Perspectives*. 27: 45-50.

Plewa M. J. y Weaver D. L. (1982). Activation of 2-aminofluoreno by cultured plant cells. *Science*. 219: 1427-1429.

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. *Mutation Research*. 247: 57-64.

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

Ramarathnam N., Osawa T., Ochi H. y Kawakishi S. (1995). The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends in Food Science and Technology*. 6: 75-82.

Rice-Evans C. A., Miller N. J. y Paganga G. (1997). Antioxidants properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*. 2: 152-159

Robards K., Prenzler P. D., Tucker G., Swatsitang P. y Glover W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*. 66: 401-436.

Rogez H., Pompeu D.R., Akwie S.N.T. y Larondelle Y. (2011). Sigmoidal kinetics of anthocyanines accumulation during fruit ripening: a comparison between acai fruits (*Euterpe oleracea*) and other anthocyanin-rich fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*. 245: 796-800.

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.

Sandermann H. (1988). Mutagenic activation of xenobiotics by plant enzymes. *Mutation Research*. 197: 183-194.

Searle C. E., Harden D. G., Venitt S. y Gide O. H. B. (1975). Carcinogenicity and mutagenicity tests of some hair colourants and constituents. *Nature* 255: 506-507.

Shahidi F. (2000). Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung*. 44: 158-163.

Sies H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*. 82: 291-295.

Spencer J. P. E., Abd El Mohsen M. M., Minihane A.M. y Mathers J. C. (2008). Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *British Journal of Nutrition*. 99: 12-22.

Sun J., Chu Y., Wu X. y Liu R. H. (2002). Antioxidant activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 7449-7454.

Van den Berg R., Van Vliet T., Broekmans W. M. R., Cnubben N. H. P., Vaes W. H. J., Roza L., Haenen G. R.M.M., Bast A. y Van den Berg H. (2001). A vegetable/fruit concentrate with high antioxidant capacity has no effect on biomarkers of antioxidant status in male smokers. *Journal of Nutrition*. 131: 1714-1722.

Vieloglu Y. S., Mazza G., Gao L. y Oomah B. D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 4113-4117.

Villanueva-Tiburcio J. E., Condezo-Hoyos L. A. y Asquieri E. R., (2010). Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 30: 151-160.

Waterman P. G. y Mole S. (1994). Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications. Methods in Ecology. Oxford.

Yi L., Chen C., Jin X., Mi M., Yu B., Chang H., Ling W. y Zhang T. (2010). Structural requirements of anthocyanins in relation to inhibition of endothelial injury induced by oxidized low-density lipoprotein and correlation with radical scavenging activity. *FEBS Letters*. 584: 583-590.

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). *Mutation Research*. 312: 25-31.

Zheng W. y Wang S. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 5165-5170.

Tabla 1.

Clasificación de los compuestos fenólicos. Modificado de Bravo (1998).


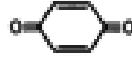
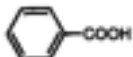
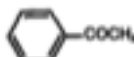




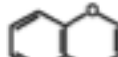

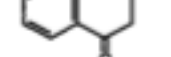



Clase	Esqueleto base	Estructura base
Fenoles simples	C ₆	
Benzoquinonas	C ₆	
Ácidos fenólicos	C ₆ -C ₁	
Acetofenonas	C ₆ -C ₂	
Ácidos fenilacéticos	C ₆ -C ₂	
Ácidos hidroxicinámicos	C ₆ -C ₃	
Fenilpropenos	C ₆ -C ₃	
Cumarinas, isocumarinas	C ₆ -C ₃	
Cromonas	C ₆ -C ₃	
Naftoquinonas	C ₆ -C ₄	
Xantonas	C ₆ -C ₁ -C ₆	
Estilbenos	C ₆ -C ₂ -C ₆	
Antraquinonas	C ₆ -C ₂ -C ₆	
Flavonoides	C ₆ -C ₃ -C ₆	
Lignanós, neolignanós	(C ₆ -C ₃) ₂	
Ligninas	(C ₆ -C ₃) _n	

Tabla 2.
Clasificación de los flavonoides. Modificado de Bravo (1998).

Flavonoide	Estructura básica
Chalconas	
Dihidrochalconas	
Auronas	
Flavonas	
Flavonoles	
Dihidroflavonol	
Flavanonas	
Flavanol	
Flavandiol o leucoantocianidina	
Antocianidina	
Isoflavonoide	
Biflavonoide	
Proantocianidina o taninos condensados	

Tabla 3. Contenido de fenoles totales, flavonoides, antocianinas y ácido ascórbico y actividad antioxidante de los jugos de frutas.

Extracto	Fenoles totales^a	Flavonoides^b	Antocianinas^c	Ácido Ascórbico^d	Actividad antioxidante^e
Clorofilina	54.04 ± 7.71	6525.31 ± 298.01	0	4.23 ± 0.60	53.03 ± 11.25
Kiwi	93.75 ± 6.47	512.58 ± 44.99	19095.00 ± 485.42	60.25 ± 1.75	176.23 ± 8.92
Melón	30.66 ± 2.74	195.36 ± 30.68	0	13.73 ± 2.61	64.86 ± 2.64
Sandía	18.97 ± 0.57	234.75 ± 51.58	1986.11 ± 285.70	3.56 ± 4.97	28.77 ± 8.80

^a Fenoles totales expresados como mg equivalentes de ácido gálico/100 g de peso fresco.

^b Flavonoides expresados como mg de quercetina/100 g de peso fresco.

^c Contenido de antocianinas en mg/100 g de peso fresco.

^d Contenido de ácido ascórbico en mg/100 g de peso fresco.

^e Actividad antioxidante expresada como mg equivalentes de Trolox/100 g de peso fresco.

Tabla 4. Actividades de los jugos de fruta en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium* con y sin activación metabólica por *Vicia faba* S10.

	Revertantes por placa ^a	
	- S10 ^b	+ S10 ^b
Testigo Negativo		
TA98	21.67 ± 1.66	30.00 ± 1.15
Jugos		
μL/placa		
Kiwi		
10	23.33 ± 1.86	20.67 ± 3.38
20	23.67 ± 2.91	20.33 ± 5.36
50	22.00 ± 2.88	23.33 ± 4.48
100	22.00 ± 3.05	24.33 ± 2.81
200	24.00 ± 0.57	29.33 ± 3.18
500	23.00 ± 0.57	31.33 ± 7.21
Melón		
10	25.00 ± 0.57	25.67 ± 3.18
20	25.33 ± 1.33	26.33 ± 1.20
50	23.33 ± 3.18	24.33 ± 2.19
100	25.00 ± 2.52	26.67 ± 4.70
200	24.33 ± 1.67	32.67 ± 3.18
500	25.00 ± 1.53	33.67 ± 3.33
Sandía		
10	22.33 ± 1.45	22.33 ± 0.66
20	22.00 ± 4.16	23.00 ± 1.52
50	23.67 ± 2.91	25.33 ± 3.93
100	25.33 ± 0.33	25.33 ± 2.91
200	26.00 ± 0.57	30.33 ± 1.33
500	28.33 ± 4.05	32.00 ± 1.15

^a Media de revertantes obtenidas en tres experimentos independientes ± error estándar.

^b Fracción enzimática S10 de *Vicia faba* (0 ó 500 μL).

Tabla 5. Efecto antimutagénico de los extractos de frutas 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.

	- S10^b		+ S10^b	
	Revertantes por placa ^a	% Antimutagenicidad ^e	Revertantes por placa ^a	% Antimutagenicidad ^e
Testigo Negativo TA98	23.89 ± 0.62		36.22 ± 1.79	
Testigos positivos				
Mutagenicidad NOP ^c	815.13 ± 11.49		2022.33 ± 19.92	
Antimutagenicidad Clorofilina ^d + NOP	440.87 ± 14.43	47.29	1343.33 ± 14.45	34.18
Tratamientos µL de extracto/placa				
Kiwi + NOP				
10	475.57 ± 27.33*	42.91	782.80 ± 16.96**	62.41
250	423.10 ± 12.70*	49.54	786.33 ± 45.00**	62.23
500	394.87 ± 8.79*	53.11	737.70 ± 37.36**	64.68
Sandía + NOP				
10	502.20 ± 74.67*	39.54	1422.00 ± 107.78*	30.23
250	706.43 ± 31.32	13.72	1627.00 ± 70.44	19.90
500	782.80 ± 6.40	4.07	1651.00 ± 12.90	18.70
Melón + NOP				
10	861.67 ± 6.27	0	1710.06 ± 22.05	15.72
250	903.72 ± 10.03	0	1603.78 ± 5.84*	21.07
500	972.56 ± 18.55	0	2122.06 ± 8.78	0

^a Media de revertantes obtenidas en tres experimentos independientes ± error estándar.

^b Fracción enzimática S10 de *Vicia faba* (0 ó 500 µL).

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

^d Clorofilina: 10 µg/placa

* Diferencia significativa ANOVA *post hoc* Tukey (p<0.0001) entre el testigo positivo (NOP) y los tratamientos.

+ Diferencia significativa ANOVA *post hoc* Tukey (p<0.0001) entre el testigo positivo (clorofilina) y los tratamientos.

Tabla 6. Cuantificación de proteínas y actividad peroxidasa de la fracción S10 de *Vicia faba* incubada con la amina aromática 4-nitro-*o*-fenilendiamina (NOP).

Fracción S10 de <i>Vicia faba</i>	Contenido total de proteínas ^a μg/10 μl	Actividad peroxidasa ^a nM de tetraguaiacol/min/μg de proteína	
		Inicial	Final
Testigo negativo	4.18 ± 0.01	0.0026 ± 0.015	0.0503 ± 0.074
NOP	3.91 ± 0.33	0.0041 ± 0.022	0.0441 ± 0.063

^a Media de tres experimentos independientes ± error estándar.

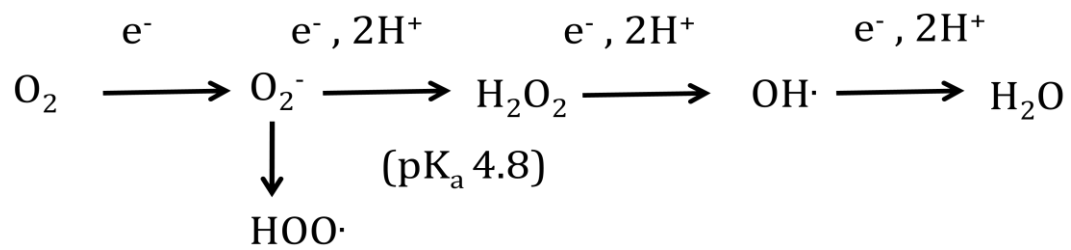


Fig. 1. Oxidantes del metabolismo normal. Ilustra la formación de especies reactivas de oxígeno por adición sucesiva de electrones al triplete O_2 . Modificado de Farr y Kogoma (1991).

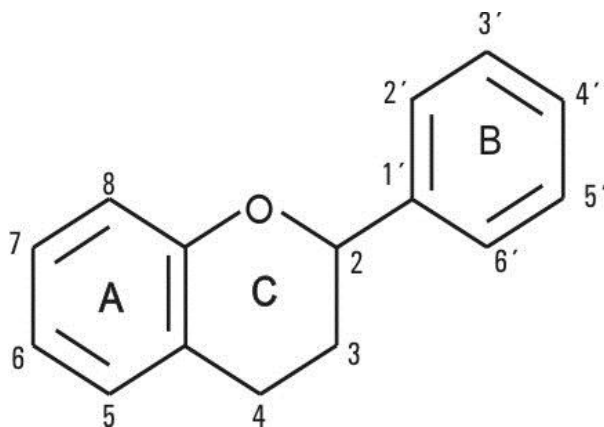


Fig. 2. Estructura básica de un flavonoide.

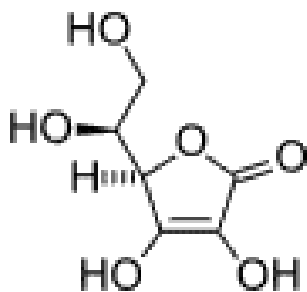


Fig. 3. Estructura del ácido ascórbico.



Fig. 4. Estructura de la 4-nitro-o-fenilendiamina (NOP).

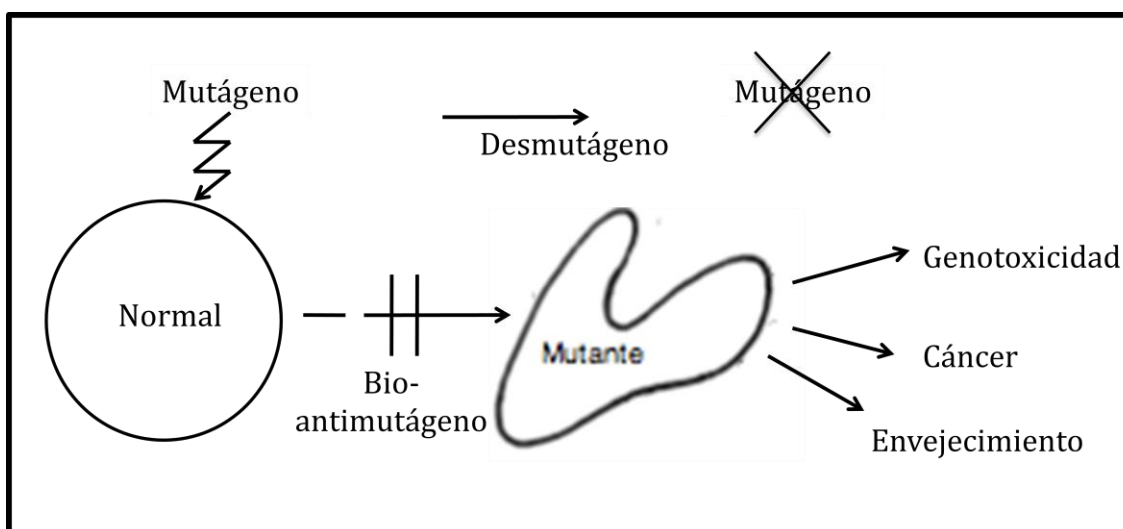


Fig. 5. Clasificación de antimutágenos según su modo de acción, muestra las dos categorías de supresión de las mutaciones inducidas. Modificado de Kada y Shimoi (1987).

Actividad Antioxidante

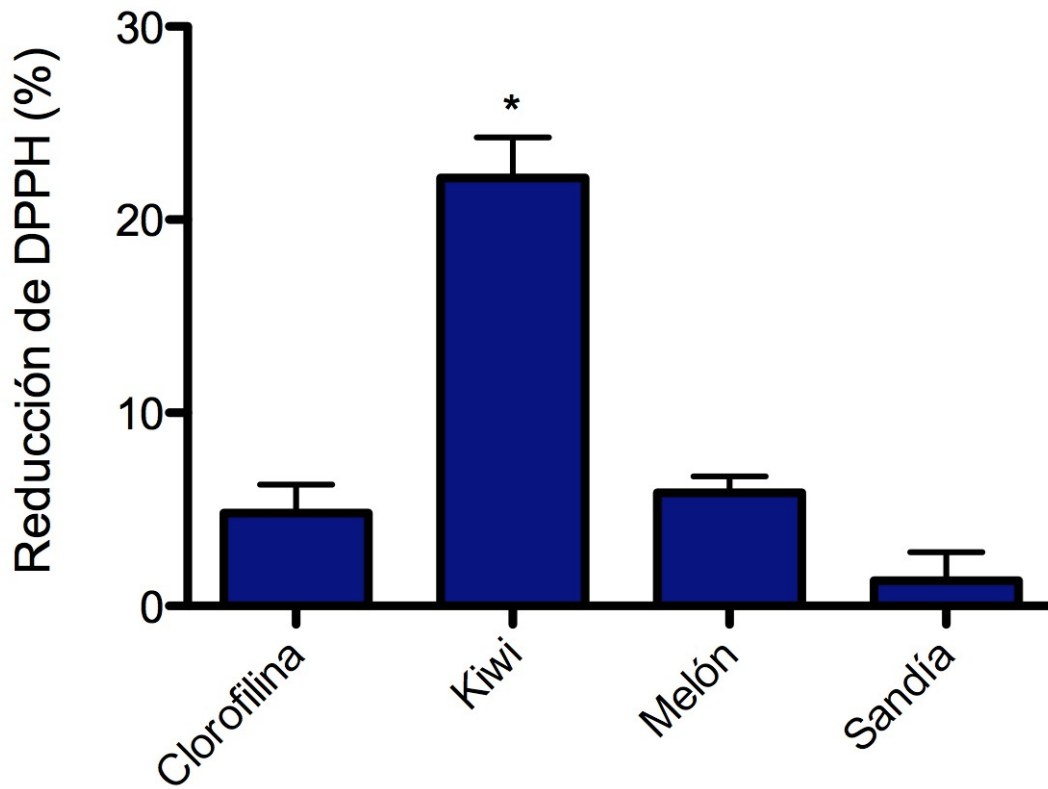


Fig. 6. Porcentaje de reducción del ión DPPH como actividad antioxidante por los jugos de fruta. Cada barra representa la media \pm error estándar (n=3).

* Diferencia significativa entre el extracto y el testigo positivo (clorofilina). ANOVA *post hoc* Tukey $p < 0.001$.

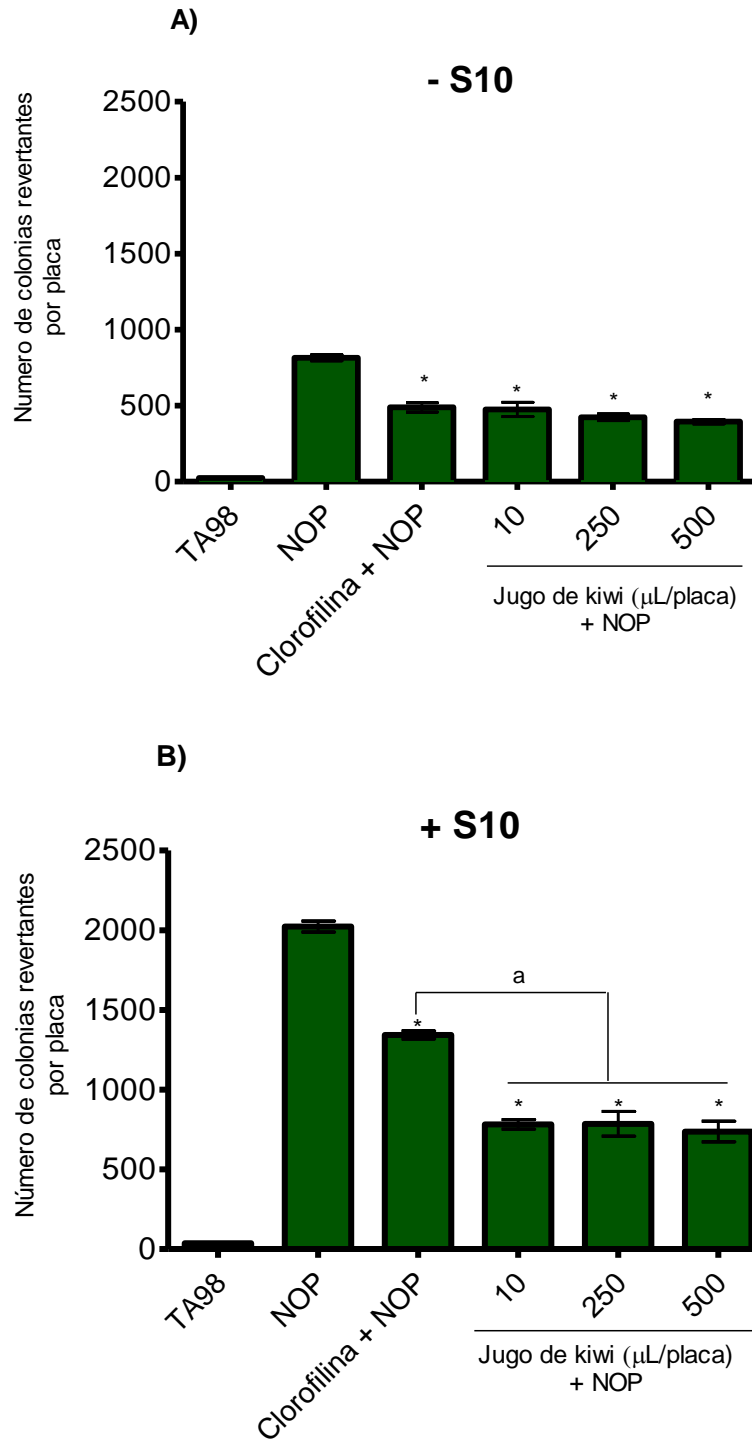


Fig. 7. Efecto antimutagénico del jugo de kiwi en la cepa TA98 de *S. typhimurium*. A) Sin activación metabólica. B) Con activación metabólica. Cada barra es la media \pm error estándar (n=9).

*Diferencia significativa $p < 0.001$ con respecto a la NOP. ANOVA *post hoc* Tukey.

^aDiferencia significativa $p < 0.001$ con respecto a la Clorofilina. ANOVA *post hoc* Tukey.

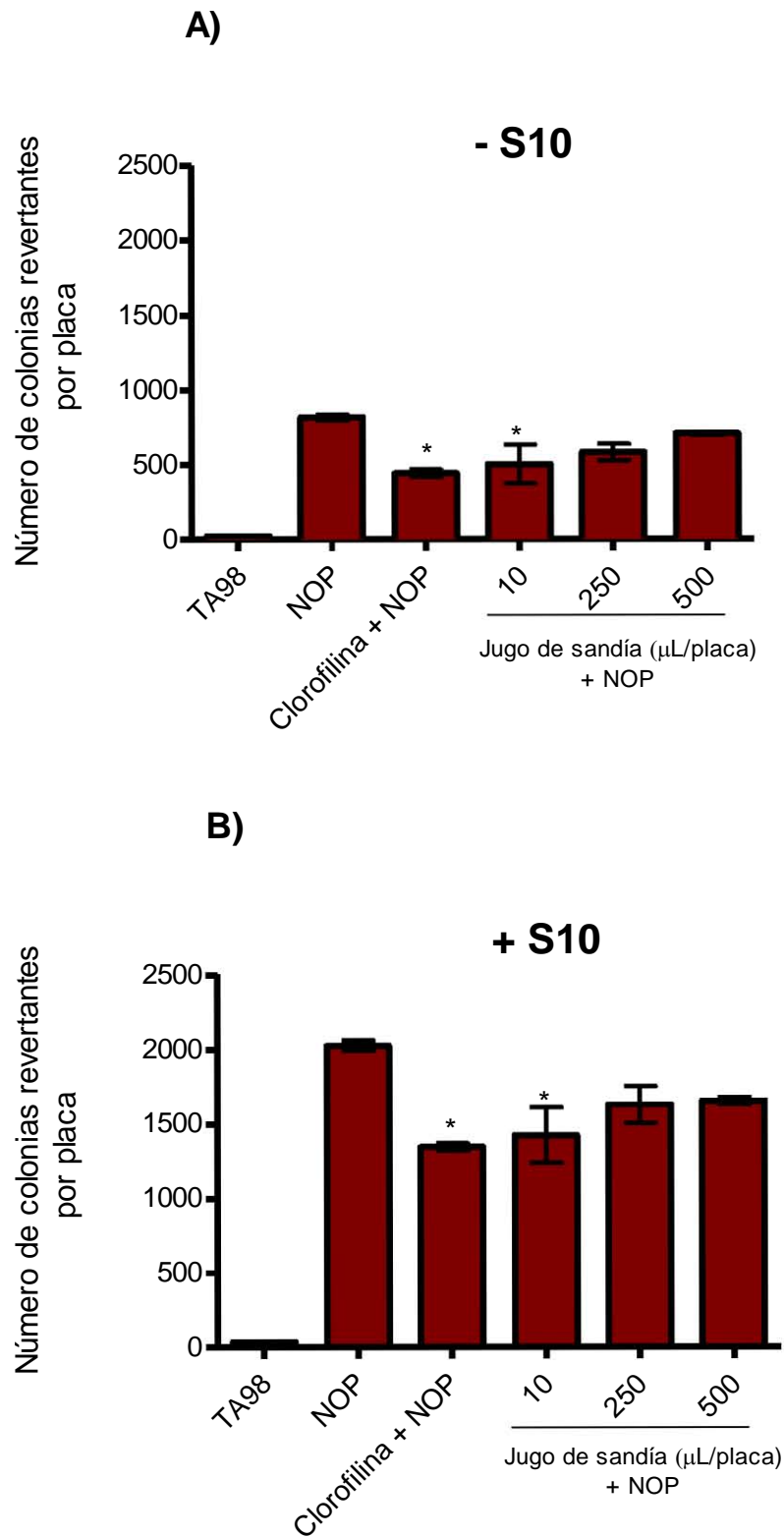


Fig. 8. Efecto antimutagénico del jugo de sandía en la cepa TA98 de *S. typhimurium*. A) Sin activación metabólica. B) Con activación metabólica. Cada barra es la media \pm error estándar (n=9). *Diferencia significativa $p < 0.001$ con respecto a la NOP. ANOVA *post hoc* Tuckey.

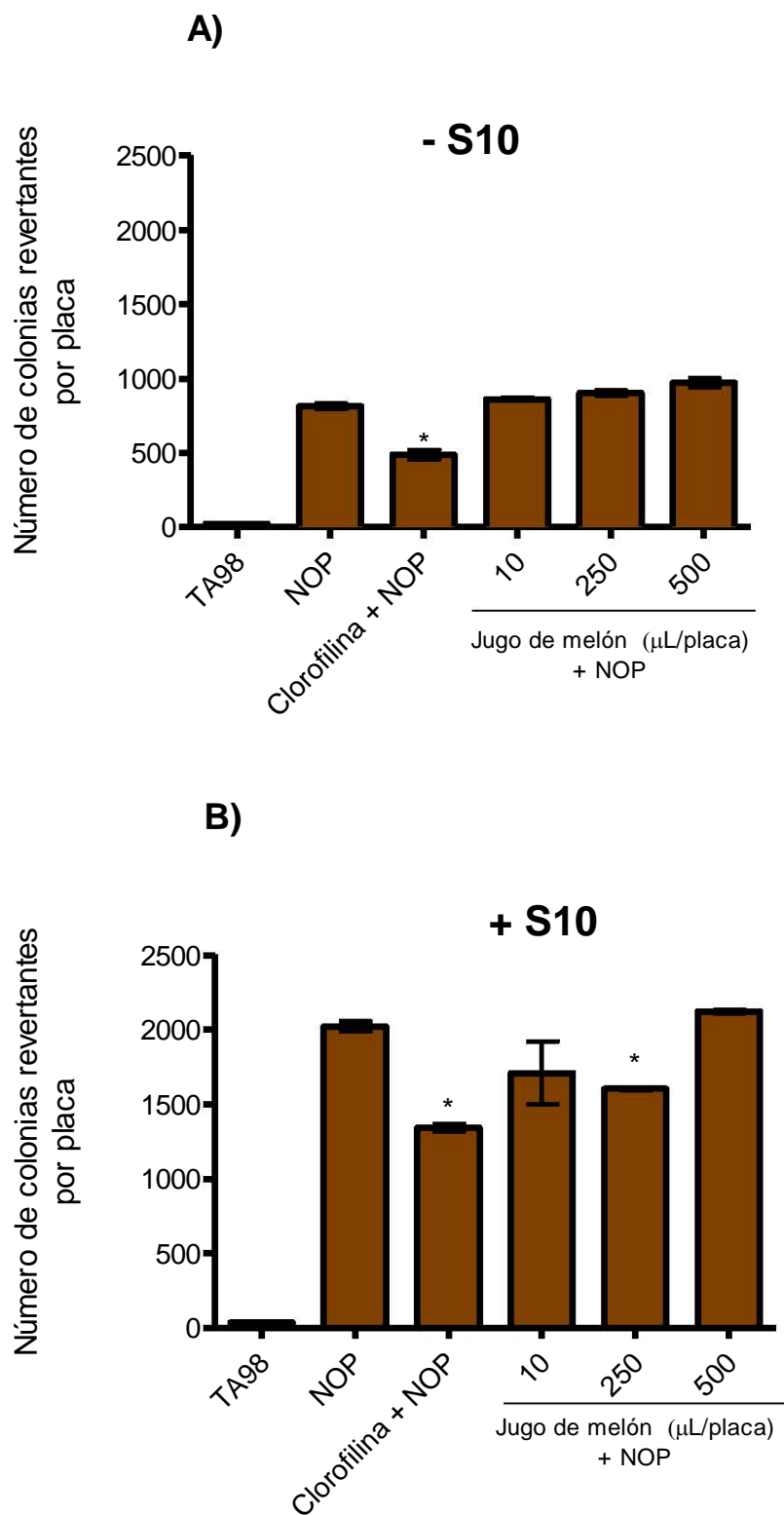


Fig. 9. Efecto antimutagénico del jugo de melón en la cepa TA98 de *S. typhimurium* A) Sin activación metabólica. B) Con activación metabólica. Cada barra es la media \pm error estándar (n=9). *Diferencia significativa $p < 0.001$ con respecto a la NOP. ANOVA *post hoc* Tuckey.

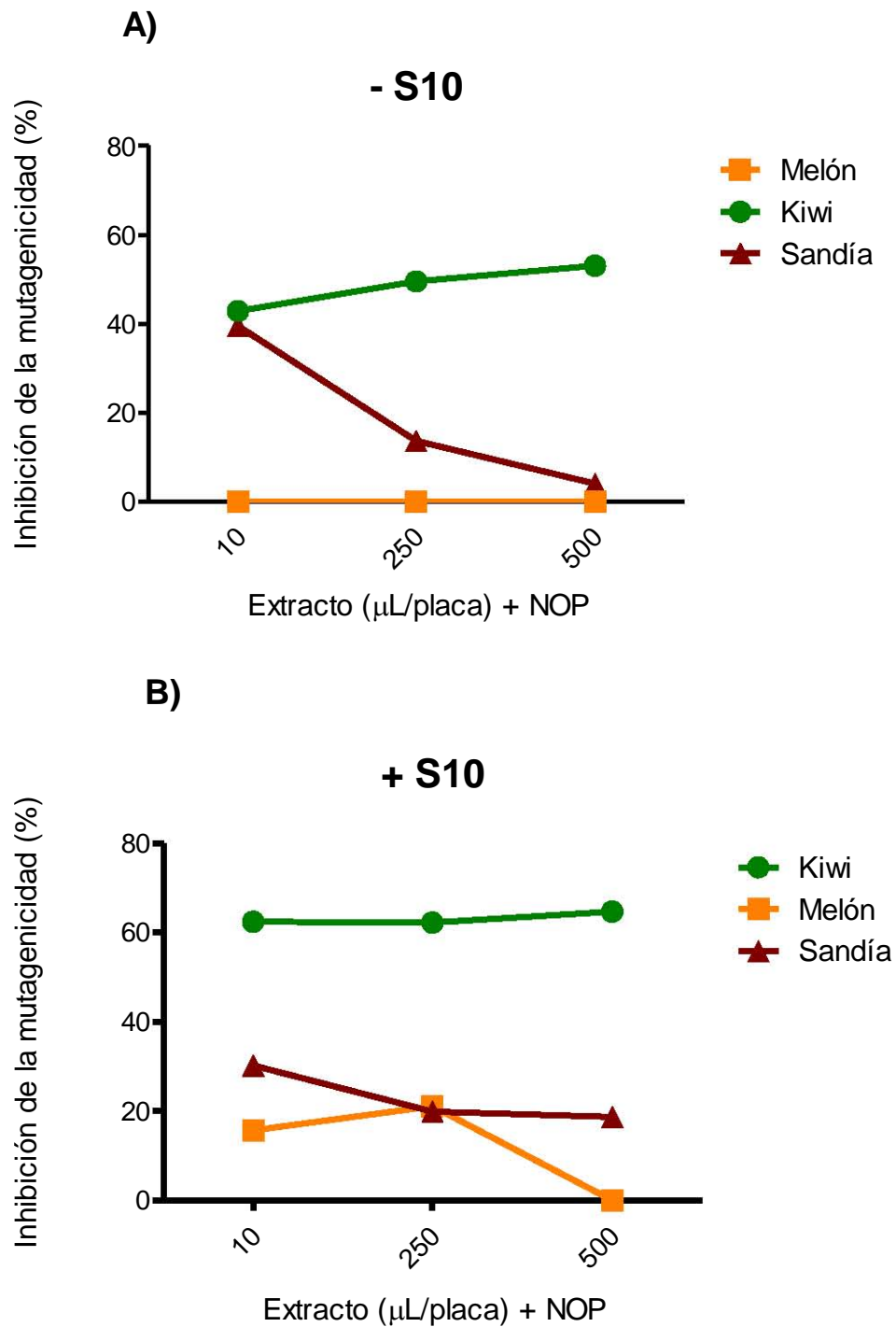


Fig. 10. Efecto antimutagénico de los jugos de frutas expresado como el porcentaje de inhibición de la mutagenicidad de la NOP. A) En ausencia de activación metabólica. B) En presencia de activación metabólica.