

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERETARO

FACULTAD DE QUIMICA

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION Y
POSGRADO EN ALIMENTOS

MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

(P R O P A C)

**POTENCIAL ANTIMUTAGENICO DE LOS FENOLES PRESENTES
EN FRIJOL FLOR DE MAYO
(*Phaseolus vulgaris*)**

T E S I S

Que para obtener el Grado de Maestro en Ciencias

P R E S E N T A

EDUARDO PIZAÑA MACIAS

Diciembre - 1994

No. Reg. H54994

".....TS

Clas. 633.33

P695p

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA REPUBLICA

(PROPAC)

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FACULTAD DE QUIMICA

POTENCIAL ANTIMUTAGENICO DE LOS FENOLES PRESENTES EN FRIJOL FLOR DE
MAYO (Phaseolus vulgaris)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

EDUARDO PIZANA MACIAS

DICIEMBRE DE 1994

MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA REPUBLICA
(PROPAC)

"POTENCIAL ANTIMUTAGENICO DE LOS FENOLES PRESENTES EN FRIJOL
FRIJOL FLOR DE MAYO (Phaseolus vulgaris)"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

EDUARDO PIZAÑA MACIAS

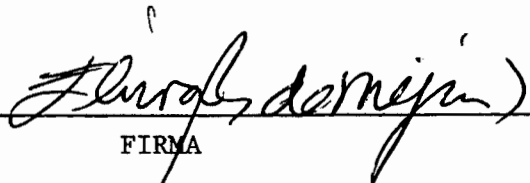
DIRIGIDA POR:

DRA. ELVIRA GONZALEZ DE MEJIA

SINODALES

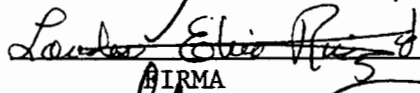
DRA. ELVIRA GONZALEZ DE MEJIA

PRESIDENTE


FIRMA

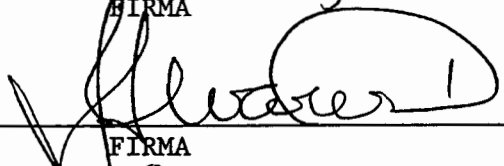
M.C. ELVIA RUIZ FLORES

SECRETARIO


FIRMA

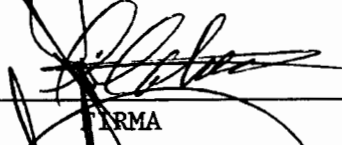
M.C. JORGE ALVAREZ DOMINGUEZ

VOCAL


FIRMA

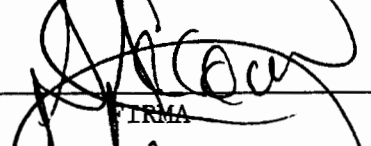
M.C. CRISTINA CABRERA MUÑOZ

SUPLENTE


FIRMA

M.C. SALVADOR LECONA URIBE

SUPLENTE


FIRMA

Q.M. J. MERCED ESPARZA GARCIA
DIR. DE LA FACULTAD DE QUIMICA

M.C. SALVADOR LECONA URIBE
DIR. ESTUDIOS DE POSGRADO

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE TOXICOLOGIA DE ALIMENTOS DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION Y POSGRADO EN ALIMENTOS BAJO LA DIRECCION DE LA DOCTORA ELVIRA GONZALEZ DE MEJIA.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO CON FINANCIAMIENTO DE LA ORGANIZACION
DE ESTADOS AMERICANOS (OEA).

A MI MAMA: LUCERITO

A MIS HERMANOS: SALVADOR, ROSALBA Y CESAR

A MI ESPOSA: ANA LILIA

A MI HIJA: ARANZAZU

Y A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE ME APOYARON

MI MAS SINCERO AGRADECIMIENTO A LAS SIGUIENTES PERSONAS E INSTITUCIONES.

- DRA. ELVIRA GONZALEZ DE MEJIA. UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO
- M.C. JAVIER ESPINOZA AGUIRRE. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
- Q.F.B. GUADALUPE MARTINEZ. CENTRO DE ESTUDIOS ACADEMICOS SOBRE CONTAMINACION AMBIENTAL, UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO.
- SRA LETICIA ALCOCCER. CENTRO DE ESTUDIOS ACADEMICOS SOBRE CONTAMINACION AMBIENTAL. UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO.
- Q.A. JOSE ALFREDO QUINTANAR HERNANDEZ. UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO.
- M.C. JORGE ALVARES DOMINGUEZ. UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO.
- M.C CRISTINA CABRERA MUNOZ. UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO
- M.C. SALVADOR LECONA URIBE. UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO
- M.C. LOURDES ELVIA RUIZ FLORES. UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO
- A TODOS LOS COMPANEROS Y AMIGOS DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION Y POSGRADO EN ALIMENTOS.
- FACULTAD DE QUIMICA DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO.
- CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA
- ORGANIZACION DE ESTADOS AMERICANOS.

INDICE

Lista de figuras.	i
Lista de cuadros.	ii
I. Resumen	1
II. Introducción	5
III. Antecedentes y Justificación	
A. Generalidades.	8
B. Substancias Quimioprotectoras	12
C. Compuestos fenólicos en alimentos y su acción antimutagénica	14
D. Compuestos fenólicos como antioxidantes naturales.	18
E. Potencial antimutagénico de las leguminosas.	22
F. Fenoles, clasificación y propiedades	26
IV. Hipótesis	29
V. Objetivos	
A. General	29
B. Específicos.	29
VI. Metas.	30
VII. Materiales y Metodos.	
A. Materiales.	31
B. Aislamiento y purificación de fenoles.	31
C. Cuantificación de fenoles aislados.	34
D. Estudio de las estructuras químicas.	34
E. Mutaciones genicas en <i>Salmonella typhimurium</i> YG-1024.	36
F. Estudio de antimutagénesis en <i>Salmonella typhimurium</i> .	40
G. Sensibilidad a los antimutágenos.	42
H. Protocolo de mutagénesis de los extractos obtenidos.	43
I. Protocolo de antimutagénesis.	43

J. Estudio de sobrevida.	46
K. Diseño experimental.	47
L. Análisis y procesamiento de datos.	49
VIII Resultados y discusión.	
A. Contenido de fenoles como mg equivalentes de catequina en harina, testa y diferentes extractos de frijol.	50
B. Espectros UV-VIS e IR.	53
C. Curvas dosis-respuesta de B(a)p y 1-Np sobre <i>Salmonella typhimurium</i> YG-1024.	59
D. Toxicidad y mutagenicidad de los extractos de frijol.	59
E. Sensibilidad a los antimutágenos (curva dosis-respuesta).	63
F. Antimutagénesis de los extractos metanólico, acuoso metanol-agua al 50% y de frijol cocido.	63
IX. Conclusiones.	87
X. Bibliografía.	88

Lista de figuras

Fig.		Pag.
1.1	Posible mecanismo de acción de los fenoles como atrapadores endogenos de electrófilos carcinogénicos en el proceso de carcinogénesis.	16
1.2	Deshidrogenación del alcohol coniferil para formar radicales libres.	22
2	Diagrama general para el aislamiento de los fenoles presentes en frijol.	32
3	Obtención de los extractos de frijol.	33
4	Estudios con los extractos de frijol.	35
5	Diagrama de flujo seguido en la mutaciones génicas de <u>Salmonella typhimurium</u> .	37
6	Curva de calibración con (+) catequina usada en la cuantificación de los fenoles en frijol.	52
7	Espectros UV-VIS de fenoles puros y extracto metanólico de frijol flor de mayo.	54
8	Espectro UV-VIS de los extractos metanol agua y acuoso con frijol flor de mayo.	
9	Espectros IR de algunos fenoles comunes.	56

10	Espectros de absorción en IR de los extractos de frijol.	57
11	Curva dosis-respuesta de <i>Salmonella typhimurium</i> con B(a)p.	60
12	Curva dosis-respuesta de <i>Salmonella typhimurium</i> con 1-Np.	61
13	Toxicidad y mutagenicidad de los extractos de frijol con y sin activación metabólica.	62
14	Sensibilidad a los antimutágenos, curva dosis respuesta del ácido elágico sobre Benzo(a)pireno.	64
15	Sensibilidad a los antimutágenos, curva dosis respueswta de ácido elágico sobre 1-Nitropireno.	65
16	Curva dosis-respuesta de la actividad antimutágena del extracto metanólico sobre B(a)p.	72
17	Curva dosis-respuesta de la actividad antimutagénica del extracto matanol-agua sobre el B(à)p.	73

18	Curva dosis-respuesta de la actividad antimutimutagénica del extracto acuoso sobre B(a)p.	74
19	Curva dosis-respuesta de la actividad antimutagénica del extracto de frijol cosido sobre B(a)p.	75
20	Resumen grafico de la inhibición de la mutagénesis del B(a)p por los extractos del frijol.	76
21	Curva dosis-respuesta de la actividad antimutagénica del extracto metanólico sobre el 1-Np.	77
22	Curva dosis-respuesta de la actividad antimutagénica del extracto metanol-agua al 50% sobre el 1-Np.	78
23	Curva dosis-respuesta de la actividad antimutagénica del extracto acuoso sobre el 1-Np.	79
24	Curva dosis-respuesta de la actividad antimutagénica del extracto de frijol cosido sobre el 1-Np.	80
25	Resumen grafico de la inhibición de mutagénesis del 1-Np por los extractos de frijol.	81

Lista de cuadros

Cuadro		Pag.
1	Clasificación de antimutágenos por su mecanismo de acción.	15
2	Protocolo para la obtención de las curvas dosis-respuesta de <u>S.typhimurium</u> con B(a)P y 1-NP (sensibilidad a los mutágenos).	40
3	Protocolo para la obtención de las curvas dosis-respuesta de <u>S.typhimurium</u> con ácido eláxico vs. B(a)P y 1-NP (sensibilidad a los antimutágenos)	43
4	Protocolo para evaluar la mutagenicidad de los extractos obtenidos a partir de cascarilla de frijol Flor de Mayo.	44
5	Protocolo seguido para el estudio del poder antimutagénico de los extractos del frijol.	47
6	Contenido de fenoles totales en los extractos.	51
7	Principales longitudes de onda absorbidas por extractos y compuestos standard en I. R.	58
8	Comportamiento antimutagénico de los extractos metanólico y metanol-agua sobre el B(a)P.	67

9	Comportamiento antimutagénico de los extractos acuoso y de frijol cocido sobre el B(a)P.	68
10	Comportamiento antimutagénico de los extractos metanólico y metanol-agua sobre el 1-NP.	69
11	Comportamiento antimutagénico de los extractos acuoso y de frijol cocido sobre el 1-NP.	70
12	Potencia antimutagénica de los diferentes extractos de frijol Flor de Mayo.	83

1. RESUMEN

Está comprobado tanto en estudios de laboratorio como epidemiológicos que la dieta es un factor importante en el proceso para desarrollar o prevenir cáncer en humanos. En el presente estudio se investigó las propiedades antimutagénicas de los fenoles presentes en frijol Flor de Mayo (*Phaseolus vulgaris*) de alto consumo entre la población Queretana y gran parte de la Republica Mexicana. Se extrajeron los fenoles en medio acuoso, metanólico y en metanol-agua al 50% a partir de la cascarilla de frijol que es donde se concentran principalmente los fenoles, también se obtuvo un cuarto extracto a partir del frijol completo cocido en agua en relación 1:5 respectivamente. Realizadas todas las extracciones cada una se filtró y se procedió a eliminar los solventes no acuosos, a concentrar los acuosos y a congelar a -70°C con nitrógeno líquido para continuar con el liofilizado. Todos los extractos se mantuvieron en ausencia de luz y con la menor cantidad de oxígeno posible a -12°C . Se cuantificó el contenido de fenoles por el método de la vainillina y se informó como equivalentes de catequina por mg de extracto.

La identificación parcial de los fenoles de los extractos llevó acabo mediante los espectros ultravioleta-visible e infrarrojo.

Para el experimento de antimutagénesis se utilizó el método de Ames que utiliza una cepa mutante (auxotrofa His⁻) de *Salmonella typhimurium* YG-1024 resistente a la ampicilina y tetraciclina, que requiere histidina para su crecimiento cuyo fundamento

es revertir el fenotipo del operón de la histidina mediante compuestos químicos (mutágenos) que le confieren a las mutantes (prototrofas His.⁺) la capacidad de crecer en medios carentes de este aminoácido. Un compuesto que es capaz de inhibir el efecto de los mutágenos, es decir, que no permite que se revierta la mutación en la bacteria es un antimutágeno.

Para obtener buenos resultados fué preciso evaluar los marcadores genéticos de la bacteria tales como la reversión espontánea la permeabilidad de la membrana y la presencia de plásmidos. Se requirió evaluar la sensibilidad a los mutágenos y antimutágenos y hacer cultivos de 16 hr. para estandarizar la cuenta total bacteriana en $1-2 \times 10^7$ por cada 100 μ l de caldo nutritivo. Se realizaron curvas dosis-respuesta de los mutágenos a usar como 1-nitropireno que es un mutágeno directo y el benzo(a)pireno que requiere de activación metabólica para pasar a su forma activa.

También se hizo necesario probar la no mutagenicidad de los extractos para lo cual se realizaron protocolos que incluían ensayos con y sin activación metabólica usando como estándares positivos 1-nitropireno y benzo(a)pireno respectivamente. Los ensayos de antimutagénesis consistieron en evaluar el efecto de los extractos en diferentes dosis sobre una concentración constante de mutágeno y evaluar el número de sobrevivientes que se tiene cada vez que varía la concentración del extracto.

La concentración de fenoles en el extracto metabólico fué de 813 mg/g y no se detectaron en el extracto de frijol cocido.

Los espectros ultravioleta-visible revelaron picos de absorción tanto en los estándares como en las muestras entre 290 y

276 nm.

En los espectros de infrarrojo se obtuvieron bandas anchas de absorción entre 3500 y 3000 cm^{-1} características de los fenoles polimerizados, así como bandas de absorción entre 1600 y 1400 cm^{-1} características de los grupos arilo mismas que se observan en compuestos como (+)catequina, ácido elágico, ácido tánico y ácido gálico utilizados como referencia.

Como resultado de las curvas dosis-respuesta se obtuvo que 2 μg /caja de benzo(a)pireno y 0.1 μg /caja de 1-nitropireno produjeron 500 y 870 revertantes respectivamente.

Los extractos dieron resultados negativos de toxicidad y mutagenicidad ya que en ningún caso se superó por más del doble la mutación espontánea en ensayos con y sin activación metabólica.

El comportamiento antimutagénico frente al benzo(a)pireno de los extractos metanólico, metanol-agua y acuoso quedó demostrado al obtenerse un 103, 93 y 106% de inhibición de la mutagenicidad respectivamente.

Cabe hacer la observación que se requirió en los experimentos menos extracto metanólico para lograr tal efecto. El extracto de frijol cocido no mostró tener ningún efecto ni antimutagénico ni tóxico a pesar de las altas concentraciones usadas. Sin embargo la mayor potencia antimutagénica la tuvo el extracto metanol-agua seguido por el acuoso y por último el metanólico.

El comportamiento antimutagénico ante el 1-nitropireno no fue tan elocuente, más sin embargo, se observó un 36 % de inhibición por el extracto metanólico y un 46 % de inhibición por el

extracto de frijol cocido. La potencia antimutagénica en este caso fue de 0.3214 revertantes/ μ g de catequina equivalente y de 0.0489 revertantes/ μ g de extracto.

Se concluye que los fenoles presentes en el frijol flor de mayo Phaseolus vulgaris actúan como inhibidores de los mutágenos químicos benzo(a)pireno y 1-nitropireno.

II INTRODUCCION

El medio ambiente que rodea al hombre lo expone a un gran número de mutágenos naturales y artificiales. El impacto a la salud de los mutágenos dietarios y del medio ambiente incluye desórdenes genéticos, defectos de nacimiento, cáncer y enfermedad cardíaca.

Para proteger la salud, es importante la identificación y la reducción en la exposición a estos tóxicos. Aun cuando no es posible la eliminación completa de la exposición humana a los tóxicos del medio ambiente o de los riesgos ocupacionales, puede ser de gran importancia práctica disminuir los riesgos mutagénicos con el uso de sustancias antimutagénicas.

Hasta la fecha se han identificado muchas sustancias antimutagénicas incluyendo antioxidantes como la clorofilina, la clorofila, las vitaminas A, C y E, los retinoides y los carotenoides entre otros (Ames, 1983; Renner, 1985; Osawa 1990; Namiki 1990; Bronzonetti, 1990; Kinsella, 1993).

Varios estudios epidemiológicos han demostrado que existe una relación inversa entre el consumo de alimentos de origen vegetal y el riesgo relativo a desarrollar cáncer de colón y de estómago (Graham, y Col. 1972; Madan y Col, 1975). Asimismo, varios estudios de laboratorio han señalado que algunos alimentos de origen vegetal, o sus extractos, pueden inhibir el proceso de carcinogénesis e interferir con el metabolismo y la mutagenicidad de los productos carcinogénicos (Birt y Bresnick, 1988; Au, 1992; Caragay 1992).

Los derivados del ácido cinámico y los compuestos derivados de los flavonoides son capaces de reducir la incidencia de tumores inducidos químicamente (Wattenberg, 1983).

Entre los materiales de origen vegetal, los taninos poseen actividad antimutagénica contra mutaciones, inducidas por luz ultravioleta en *E coli*. Los taninos son polifenoles que están presentes en algunas familias de las dicotiledóneas como son las leguminosas. Aún cuando la función de estos fenoles en las plantas no es clara, es posible que inhiban el ataque microbiano al tejido vegetal (McLeod, 1974).

Los taninos condensados son los principales taninos en alimentos y forrages y están presentes en frutas como plátanos, manzanas, peras, duraznos y uvas.

El estudio de Ferguson y Col (1985) demostró que los taninos delfinidina y procianidina aislados de clavo blanco indujeron la producción de micronúcleos en células de hamster v-79.

Sin embargo, otros bioflavonoides como la catequina, la quercetina, la naringina, la robinetina y la rutina se les han atribuido efectos favorables en animales mamíferos como es la de reducir la fragilidad capilar, actuar como agentes antioxidantes y como quelantes de iones metálicos; además actúan como antimutágenos contra el benzo (a) pireno y la aflatoxina B1 (Bhattacharyan, 1989).

La catequina es un fenol que se encuentra presente en leguminosas como el frijol y que puede inhibir las reacciones de formación de nitrosaminas, potentes carcinógenos y también interactúa con las formas activas de los hidrocarburos policíclicos y con las aminas aromáticas para bloquear su mutagenicidad (Nagabhushan y Col, 1988).

Además, la catequina puede inhibir la mutagenicidad del tabaco y de los extractos de carne ahumada así como de los condensados del

Entre los materiales de origen vegetal, los taninos poseen actividad antimutagénica contra mutaciones, inducidas por luz ultravioleta en *E coli*. Los taninos son polifenoles que están presentes en algunas familias de las dicotiledóneas como son las leguminosas. Aún cuando la función de estos fenoles en las plantas no es clara, es posible que inhiban el ataque microbiano al tejido vegetal (McLeod, 1974).

Los taninos condensados son los principales taninos en alimentos y forrages y están presentes en frutas como plátanos, manzanas, peras, duraznos y uvas.

El estudio de Ferguson y Col (1985) demostró que los taninos delfinidina y procianidina aislados de clavo blanco indujeron la producción de micronúcleos en células de hamster v-79.

Sin embargo, otros bioflavonoides como la catequina, la quercetina, la naringina, la robinetina y la rutina se les han atribuido efectos favorables en animales mamíferos como es la de reducir la fragilidad capilar, actuar como agentes antioxidantes y como quelantes de iones metálicos; además actúan como antimutágenos contra el benzo (a) pireno y la aflatoxina B1 (Bhattacharyan, 1989).

La catequina es un fenol que se encuentra presente en leguminosas como el frijol y que puede inhibir las reacciones de formación de nitrosaminas, potentes carcinógenos y también interactúa con las formas activas de los hidrocarburos policíclicos y con las aminas aromáticas para bloquear su mutagenicidad (Nagabhushan y Col, 1988).

Además, la catequina puede inhibir la mutagenicidad del tabaco y de los extractos de carne ahumada así como de los condensados del

humo del cigarro para Salmonella (Nagabhushan y Bhide, 1988).

El ácido tánico y otros fenoles están presentes en frijol el cual constituye una fuente abundante de proteínas de bajo costo que adquiere gran importancia ya que forma parte esencial de la dieta del mexicano.

En vista de la importancia nutrica del frijol var. flor de Mayo, en la dieta del pueblo Queretano, resultó interesante investigar el efecto que los compuestos fenólicos pudieran tener sobre la mutagénesis producida por los compuestos genotóxicos presentes habitualmente en el ambiente como son los hidrocarburos aromáticos policíclicos y los nitroaneros.

La presente investigación aporta información original y contribuye con el conocimiento del potencial antimutagénico de los compuestos presentes en un alimento básico como lo es el frijol común, lo que puede proveer formas para prevenir mutaciones las cuales resultarían en cáncer así como otras enfermedades causadas por agentes genotóxicos.

El desarrollo del presente proyecto permitió establecer las metodologías básicas para el estudio sistemáticos de las propiedades antimutagénicas de los compuestos típicos de la dieta de los mexicanos, así como aislar y purificar algunos de sus principios activos.

Asimismo, contribuye a sentar las bases para la planificación de futuros estudios que prueben las hipótesis resultantes con respecto a las moléculas con propiedades antimutagénicas, su consumo y su papel protector del cáncer.

III ANTECEDENTES

A. Generalidades.

Durante las últimas décadas se ha prestado particular interés en la búsqueda e identificación de compuestos relacionados con la producción de cáncer (carcinógenos) presentes en el medio ambiente y asociados al estilo de vida. Esto ha originado el fenómeno de la quimiofobia (miedo a los productos químicos) lo que ha llevado a la prohibición de varios de estos productos algunas veces de manera injustificada.

No hay duda que la identificación de los factores de riesgo y su posterior remoción es la manera más lógica de implementar la prevención primaria del cáncer, sin embargo, esta medida ha resultado poco práctica debido entre otras razones a la gran cantidad de compuestos mutagénicos y carcinogénicos identificados, el elevado costo que significa su remoción, además de que varios se encuentran ligados a los beneficios de la vida moderna y a los hábitos personales.

Teniendo esto en mente se deben de buscar nuevas alternativas para proteger a los humanos de la acción de sustancias genotóxicas, las cuales pudieran ser implementadas a escala poblacional.

Las células tienen la capacidad de contrarrestar, hasta cierto punto y bajo condiciones particulares, los efectos mutagénicos y carcinogénicos de componentes fisiológicos o de aquellos extraños al organismo. De acuerdo con la teoría mutacional del cáncer la ocurrencia de un efecto genotóxico en una célula somática conduciría a la iniciación de la enfermedad. Sin embargo, esta última etapa es

expresión final de una intrincada cadena de eventos como son la absorción del compuesto, su distribución y transporte a órganos y tejidos, su paso a través de membranas de las células que lo metabolizan o de células blanco, el acceso al núcleo, el daño al material genético (ácido desoxirribonucleico, ADN) y finalmente la fijación de la mutación, que depende de la proliferación celular.

Todas estas etapas que preceden a la iniciación y a las subsecuentes etapas del fenómeno de carcinogénesis, son el resultado de la acción de mecanismos opuestos como son la activación metabólica y la detoxificación, la forma de derivados electrofílicos y su bloqueo por nucleófilos, la generación de especies reactivas de oxígeno y su atrapamiento por antioxidantes, el daño al ADN y su posterior reparación.

El proceso es complejo por lo que se hace difícil el proporcionar una descripción simple del mismo, pero al mismo tiempo da la oportunidad de interferir con él abordando múltiples estrategias.

De acuerdo a una estimación epidemiológica un mínimo de 75-80% de los casos de cáncer en Estados Unidos son causados por factores ambientales y deben ser considerados como evitables (Dull y Peto 1981).

Al considerar el hecho de que la formación de un tumor es un proceso complejo que involucra una serie de pasos, algunos de los cuales son probablemente epigenéticos, no se conoce en la actualidad en que grado operan los factores ambientales para causar mutación; sin embargo, datos experimentales sobre mutagénesis química conducen a la conclusión de que algunos factores mutagénicos juegan un papel

importante en carcinogénesis.

Los resultados de investigación sugieren que ciertos tipos de cáncer en humanos pueden ser prevenidos al identificar agentes mutagénicos en el ambiente y proteger a los humanos de la exposición a tales agentes. El desarrollo y el uso de sistemas apropiados de prueba para la identificación de químicos con actividad mutagénica y carcinogénica, sin duda es de gran importancia.

La carcinogénesis química, o sea el cáncer inducido o provocado con una sustancia química definida, es de gran interés en la investigación científica. Este interés ha servido de aliciente en las dos últimas décadas para estudiar la relación de los tipos de cáncer en el humano y relacionarlos, por ejemplo, con la composición química de los alimentos, el aire y los fluidos, que están íntimamente involucrados con los procesos de carcinogénesis (Mukhtar y Col, 1988). Los estudios se han dirigido hacia los componentes del medio que han demostrado una comprobada mutagenicidad en pruebas definidas de laboratorio.

Las sustancias carcinogénicas no están presentes en forma individual en la vida real, sino que se encuentran en combinación con otros compuestos lo cual puede aumentar o inhibir sus efectos mutagénicos o carcinogénicos. Tales interacciones son de importancia ya que la inducción química de mutaciones es precedida por una serie de eventos involucrando biotransformación de metabolitos reactivos, la reacción de tales metabolitos con ADN, y finalmente alteraciones celulares.

Es decir, que diferentes agentes pueden actuar sobre diferentes etapas específicas en este proceso y pueden aumentar o disminuir la

mutagenicidad (Hartman y Col, 1990).

Algunos estudios sobre la transformación neoplásica sugieren que un mínimo de dos eventos mutagénicos están involucrados en la transformación de células para la iniciación del cáncer (Land y col. 1983). Newbold y Overel 1983) aunque muchos tienen efectos en las etapas de promoción como un evento epigenético (Cerutti y col. 1983); Cerutti, 1985) ha encontrado que generalmente los promotores actúan a nivel de la membrana celular causando peroxidación de lípidos, formación de radicales libres y formación de factores clastogénicos (Ramel y Col, 1986).

La hipótesis de que las diferencias en la incidencia de cáncer en los diferentes tipos étnicos en el mundo es debida a factores culturales más que a factores genéticos, se apoya principalmente en los estudios realizados en inmigrantes. En general, la incidencia de cáncer de estas poblaciones es similar a la de su país de origen; sin embargo, después de una o más generaciones adquieren aquella que prevalece en el país anfitrión (Hirayama 1977; Henderson 1990). Estas observaciones generaron la búsqueda de factores etiológicos ligados al estilo de vida como la dieta.

La mayor parte de la información concerniente a la presencia de mutágenos y carcinógenos en los alimentos ha sido generada por investigadores japoneses debido a la elevada incidencia de cáncer gástrico en Japón. Aunado a la identificación de varios agentes mutagénicos presentes en la dieta típica de ese país, se han encontrado sustancias que disminuyen o anulan los efectos genotóxicos de los mutágenos.

B. Sustancias Quimioprotectoras.

Se han encontrado sustancias que disminuyen o anulan los efectos genotóxicos de los mutágenos (Ames, 1983). A estas sustancias se les conoce como antimutágenos y pertenecen a una gran variedad de familias químicas como son fenoles, tocoferoles, ácidos grasos, tioles, iones metálicos, proteínas, etc. y han sido aislados principalmente de organismos pertenecientes al reino vegetal.

Se sabe que varios de los inhibidores de la mutagénesis (para algunos se ha probado también su capacidad anticarcinogénica en modelos animales) actúan a nivel de las diferentes etapas que constituyen el proceso mutacional, aunque también existen antimutágenos cuyo mecanismo de acción es desconocido.

La presencia de los compuestos con propiedades antimutagénicas en varios vegetales y frutas de consumo común, abre la posibilidad de contar con un sistema de protección constante que aunado a los mecanismos de defensa naturales de la célula, se pueda disminuir el riesgo de padecer cáncer o cualquier otra enfermedad relacionada con procesos mutacionales.

El término antimutágeno se usó originalmente para describir un agente que reduce la velocidad aparente de mutaciones espontáneas o inducidas independientemente del mecanismo involucrado. En el término original se incluyen a los desmutágenos los cuales causan modificaciones químicas y bioquímicas de mutágenos antes de que causen daño al ácido desoxirribonucleico o material genético. Por otro lado, los bioantimutágenos reducen las frecuencias aparentes de mutaciones interfiriendo con los procesos celulares de fijación de mutágenos (Kada y Col, 1986).

Los desmutágenos incluyen a los agentes reductores, a los antioxidantes, las modificaciones enzimáticas y la absorción por sustancias fibrosas. Algunos desmutágenos inhiben la actividad enzimática necesaria para la activación metabólica de los mutágenos, y como resultado provocan la supresión indirecta de la inducción mutagénica.

Los bioantimutágenos incluyen sustancias las cuales actúan sobre el proceso de reparación y de replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) en las células afectadas. Además de los mecanismos básicos de aplicación de los antimutágenos, existe interés en el papel que puedan jugar como anticarcinógenos.

Se ha demostrado que el compuesto presente en té, epigallocatequingalato, con actividad antimutagénica en bacterias, también inhibe el crecimiento de tumores en ratón (Kada y Col, 1985).

Se ha dado menor atención a las sustancias que pueden servir como protectores contra los mutágenos químicos o carcinógenos, así como a los iniciadores de procesos de carcinogénesis. Existen varias revisiones que describen la acción de las sustancias químicas y de los componentes de la dieta en la estimulación del metabolismo y describen también la eliminación de los procarcinógenos antes de la última etapa donde se forma el carcinógeno propiamente dicho (Hartman y Shankel, 1990).

Kada y Col (1981) enfatizan la importancia de distinguir entre los agentes antimutagénicos que actúan fuera de la célula (desmutágenos) y aquellos cuya función es dentro de la célula (bioantimutágenos). La clasificación de los antimutágenos se divide en tres categorías.

La primera consiste de compuestos que previenen la formación de mutágenos/carcinógenos desde un precursor químico.

La segunda categoría la componen los compuestos que previenen la carcinogénesis por medio de una reacción con sitios críticos en una célula por ejemplo los agentes bloqueadores.

La tercera categoría de los inhibidores de la carcinogénesis, la componen los llamados agentes supresores porque suprimen la expresión de la neoplasia en células previamente expuestas a dosis con agentes carcinogénicos. Así los inhibidores de la mutagenicidad y la carcinogenicidad son reconocidos por Ramel (1986) en dos etapas. La etapa 1, comprende aquellos que actúan extracelularmente y la etapa 2, comprende a los agentes que actúan intracelularmente; cada etapa se divide como se muestra en el Cuadro 1.

C. Compuestos fenólicos en alimentos y su acción antimutagénica.

El término fenólico o polifenol se define químicamente como una sustancia que posee un anillo aromático con uno o más substituyentes hidroxil incluyendo derivados funcionales (ésteres, metil éteres glicosidos etc). (Harborne, 1989). Los fenoles tienen dos o más grupos hidroxil y son sustancias bioactivas presentes en plantas comestibles. (Fig. 1.1).

Los compuestos fenólicos que se encuentran comunmente en alimentos se pueden clasificar en tres grupos, fenoles simples y ácidos fenólicos, derivados del ácido hidroxicinámico y flavonoides.

Los fenoles simples y ácidos fenólicos incluyen monofenoles como el p-cresol aislado de varias frutas (frambuesa) (Van Straten, 1977), y difenoles como la hidroquinona la cual es probablemente el más común de los fenoles simples (Van Sumere, 1989). El ácido galico, un

Cuadro 1. CLASIFICACION DE ANTIMUTAGENOS POR SU MECANISMO DE ACCION.

1. Extracelular.

a. Inhibidores de la formación o captura de mutágenos.

b. inactivadores de promutágenos o mutágenos.

2. Intracelular.

a. Agentes bloqueadores que previenen los mutágenos de reaccionar con sitios estratégicos.

i. Inhiben la conversión al último carcinógeno.

ii. Incrementa la actividad de enzimas detoxicantes.

b. Almacenadores de radicales.

c. Agentes supresores previenen la expresión inicial de la neoplasia de las células.

d. Agentes que estimulan la reparación del ADN.

Ramel, y col, (1986)

Mutat. Res. 168:47-65

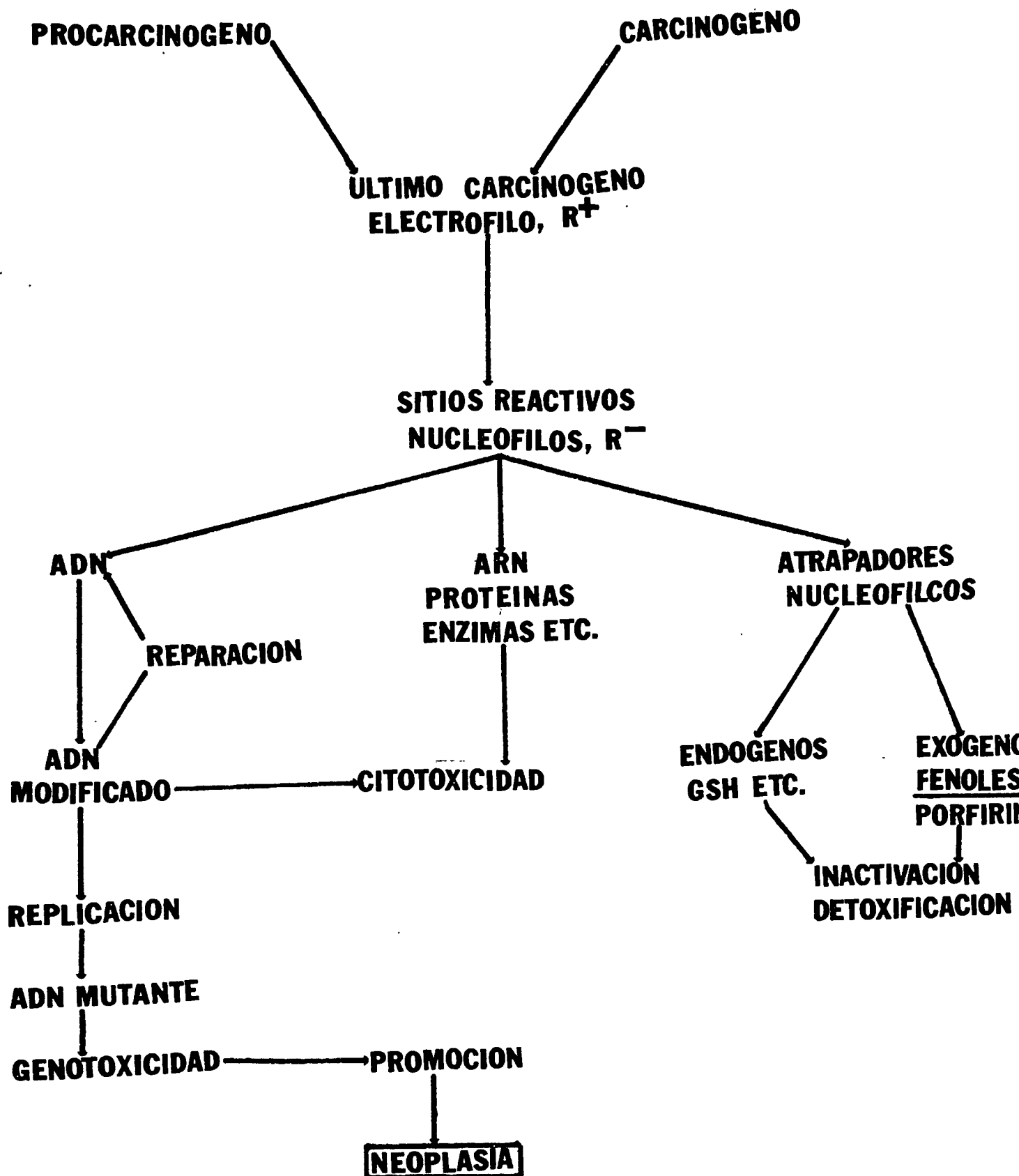


Fig. 1.1 Papel de algunos fenoles en el proceso de carcinogenesis.

trifenol, está presente en su forma esterificada en té.

Los derivados del ácido hidroxicinámico son exclusivamente derivados de los ácidos p-cumarico, caféico, y ferúlico y rara vez del ácido sinápico (Herrman, 1989). Los ácidos hidroxicinámicos están usualmente en formas conjugadas más frecuentemente como ésteres que como glicocidos. El más importante miembro de este grupo en alimentos es el ácido clorogénico el cual es el sustrato para el oscurecimiento enzimático particularmente en manzanas y peras.

Los flavonoides son el grupo más importante de fenoles en alimentos los cuales consisten principalmente de catequinas, proantocianinas, antocianidinas y flavonas, flavonoles y sus glicocidos.

Las catequinas están ampliamente distribuidas en las plantas en té pueden estar presentes hasta en un 30% del peso seco. Los extractos de té han mostrado tener actividad antioxidante que se relaciona con su contenido de epigallocatequina galato no solo inhibiendo los radicales libres y su reacción con lípidos de la membrana celular sino también inhibiendo la mutagenicidad sobre el ADN. (Mangiapanè, 1992)

Proantocianidinas, o taninos condensados, son poliflavonoides y consisten de cadenas de unidades de flavan-3-ol, están presentes en alimentos tales como manzanas, uvas, fresas, ciruelas, sorgo etc. (Haslam E., 1989). Estos compuestos tienen pesos moleculares relativamente altos y tienen la habilidad para complejarse fuertemente con proteínas y carbohidratos.

Las antocianinas son los colorantes en las plantas responsables del brillante anaranjado, rosa, escarlata, rojo, violeta y azul en las flores y frutos de muchas plantas (Harborne, 1967). Las

antocianinas como colorantes en alimentos se han investigado recientemente (Francis, 1989).

Flavonas, flavonoles y sus glicosidos también están ampliamente distribuidos en el reino vegetal sus variaciones estructurales y distribución han sido objeto de varios estudios en recientes años. Estos estiman que humanos que consumen en su dieta muchas frutas y vegetales ingieren arriba de 1 gramo de estos compuestos diariamente. El más comun y biológicamente activo flavonol es la quercetina. Se encontro que la quercetina inhibe la iniciación de la mutación por 7,12-dimetilbenzo(a)antraceno (DMBA) y la promoción por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acatato (TPA) de piel de ratón (Markham, 1989). Starvic et al. sugiere que la quercetina y otros polifenoles como el ácido elágico y el ácido clorogénico pueden jugar un papel protector en carcinogénesis por reducción de carcinogenos disponibles y por interferencia con su biotransformación en el hígado. Mediante un modelo experimental Deschner pudo demostrar que bajo condiciones de bajo consumo de grasa, la quercetina y rutina tienen una consideralbe actividad en la supresión de hiperproliferación de células epiteliales en el colon, reduciendo las areas de displasia y por último la incidencia de cáncer en colon.

D. Compuestos fenólicos como antioxidantes naturales.

Muchos antioxidantes naturales son fenoles. Algunos de los alimentos que los contienen son el chile, el oregano, tomillo, Los polifenoles no unicamente inhiben la autoxidación de lipidos sino algunas veces también tienen la habilidad de retardar la lipoxidación por inhibición de la lipoxigenasa. Se cree que el metabolismo de ácido araquidónico a peróxidos de lipidos y otros productos de oxidación tienen un papel importante en carcinogénesis (Zhi, 1991)

(Powles, 1982). Cuatro compuestos en el té verde han tenido fuerte actividad antioxidante y también varios grados de inhibición de la actividad de la lipoxigenasa. (-)Epigallocatequin galato, (-)epicatequin galato, epigallocatequin y (-)epigallocatequina

Los fenoles en los alimentos son agentes bloqueadores de la carcinogénesis. La ionización del fenol puede formar un nucleófilo potente o donador de electrones para el electrofilo, último químico carcinogénico.

La facilidad de ionización depende del pH, y en especial del pKa del fenol involucrado, generalmente es de 9 a 10. Los catecoles ortofenólicos tienen un bajo pKa para su primera ionización, lo que los hace más activos.

El té verde (Camellina sinensis) que crece en Japón tiene un alto poder bioantimutagénico sobre el B. subtilis 1125. La fracción del extracto reconocida como responsable fue un tanino llamado (-)epigallocatequingalato. Sin embargo, en sistemas como S. typhimurium y efectos de radiación se obtuvo una respuesta negativa (Kada y col. 1985).

En China, el té verde ha sido considerado como medicinal por 4000 años, con diferentes efectos farmacéuticos tales como protección de vasos sanguíneos, supresión de cáncer y alargamiento de la vida; estadísticamente se ha visto que los bebedores de té verde disminuyen su tendencia a morir por cáncer estomacal.

También se ha observado que pequeñas cantidades de ácido elálgico, un fenol de origen natural, ha dado protección significativa contra la generación de tumores en la piel de ratón inducidos por el 3-metilcolantreno un hidrocarburo aromático policíclico carcinogénico. Este efecto se atribuye a la inhibición de la

activación metabólica del hidrocarburo; esto sugiere, que un suplemento con ácido elálgico en la dieta disminuye el riesgo de tumores cancerosos en la piel inducidos por químicos ambientales (Mukhtar y Col, 1986).

En la primera conferencia internacional sobre mecanismos de antimutagénesis y anticarcinogénesis. Ames (1987) destacó que algunos tipos de cáncer pueden ser prevenidos evitando el tabaco o modificando la dieta y disminuyendo la presencia de pesticidas o factores hormonales (Shankel y Col, 1987).

El procesamiento térmico de los alimentos genera algunos compuestos mutagénicos y otros antimutagénicos resultando interesante la forma en que se sintetizan y actúan. Dos ejemplos son la caramelización y las reacciones de Maillard ambos de obscurecimiento no enzimático formando compuestos volátiles, no volátiles y pigmentos oscuros llamados melanoidinas, que se forman a partir del calentamiento de un azúcar y un aminoácido dando origen a una sustancia con actividad mutagénica (Yen, 1991).

La fracción insoluble del café (melanoidina) tiende a inhibir la mutagenicidad de las sustancias como la aflatoxina B1 (AFB1) y el N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) y el benzo (a) pireno en dispersiones acuosas encontrándose que estos dos antimutágenos son efectivos agentes enlazantes para carcinógenos (Powrie y Col, 1986).

Sin embargo, estas sustancias del mismo café como es la cafeína han probado tener actividad mutagénica que al igual que la quinacrina es inhibida por isopropiltiogalactosidasa en un sistema utilizando *E. coli* (Clarke y Shankel, 1988).

Lo que parece un tanto contradictorio es que la cafeína, al igual que la etionina, acriflavina, procaina y cinamaldehído son

polimerización (Newmark, 1987).

Los estudios de la biosíntesis de la lignina (Conn 1981) han demostrado que ésta se realiza a través de la condensación y polimerización de radicales fenoxi derivados de los iones hidroxilados. Un ejemplo de esto es la oxidación del alcohol coniferil para formar radicales libres como se ilustra en la Fig. 1

Algunos de estos podrían actuar como donadores potenciales de un electrón hacia un electrófilo, con la formación de derivados covalentes o complejos entre el fenol y el electrófilo. Se pueden hacer relaciones análogas con los compuestos fenólicos presentes en frutas y vegetales como los ácidos hidroxicianámicos los cuales se les ha observado que *in vivo* podrían servir como bloqueadores de electrófilos carcinogénicos (Waters y Col, 1990).

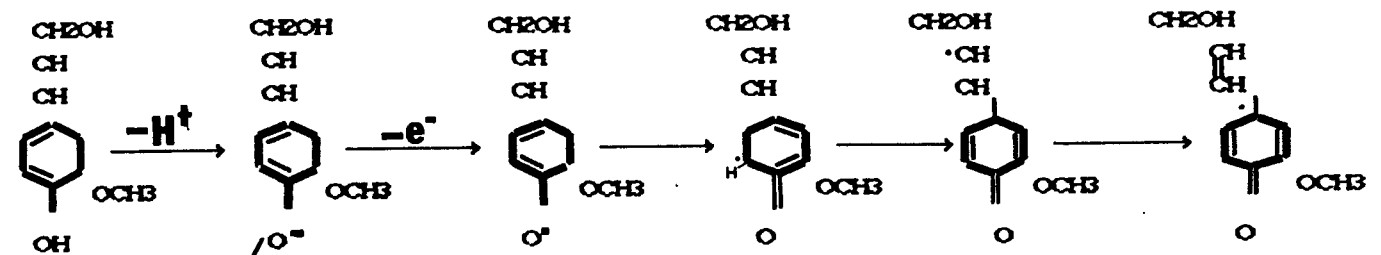


Fig 1.2 Deshidrogenación del alcohol coniferil para formar radicales libres. (Can. J Physiol. Pharmacol. 65:463).

C. Potencial antimutagénico de las leguminosas.

Las leguminosas constituyen una fuente abundante y de bajo costo de proteínas, adquiriendo gran importancia ya que forman parte esencial de la dieta de la población mexicana. A pesar de su alto

contenido proteicos, las leguminosas son consideradas con un valor nutricional limitado, ya que contiene factores antifisiológicos como son los taninos entre otros (Berroga y Col, 1985). Los taninos son compuestos fenólicos polimerizados pertenecientes al grupo de los flavonoides que se encuentran en la testa de las leguminosas como el frijol y pueden causar efectos dañinos al formar complejos indigeribles con proteínas y enzimas, e impartir astringencia en ciertos alimentos (Desphande y Cheryan, 1987).

Por otra parte, se ha encontrado un efecto inhibitorio de la mutagénesis por varios flavonoides. La geranina, la miricetina y la ruitina pueden inhibir la mutagénesis provocada por el derivado diol epóxido del benzo (a) pireno (Huang y Col, 1986), así como también algunos flavonoides sintéticos (Torigde y Col, 1983). Otras sustancias como el ácido gálico, es supresor de la mutagenicidad de la aflatoxina B1, un conocido carcinógeno de origen natural (San y Chan, 1987). No se conoce el mecanismo de acción de los flavonoides, pero las evidencias experimentales indican que pueden actuar ya sea inhibiendo el metabolismo del premutágeno, o interactuando con su molécula.

Existen datos adicionales que señalan al ácido tánico y otros fenoles de origen natural, como inhibidores de tumores producidos en ratón por carcinógenos ambientales como el benzo (a) antraceno (Mukhtar y Col. 1988).

El sistema para la detección de mutágenos con la prueba de Salmonella typhimurium (Ames y Col, 1975) ha sido ampliamente utilizado con el objeto de identificar la presencia de compuestos mutagénicos y antimutagénicos de origen natural. Esta técnica es de fácil manejo, bajo costo y además los resultados se pueden obtener en

un corto período de tiempo. Este sistema es sumamente útil para el rastreo de sustancias activas en mezclas complejas y ha permitido su identificación química final.

Ciertos fenoles naturales son inhibidores efectivos de algunos mutágenos y carcinógenos químicos, como es el caso de los tetrapirroles y las porfirinas que pueden actuar como agentes bloqueadores; los fenoles y las porfirinas son principalmente activos contra carcinógenos aromáticos en sistemas *in vitro*.

Los fenoles presentes en alimentos incluyen una amplia variedad de estructuras químicas y actúan como agentes bloqueadores de la carcinogénesis en uno o más de varios posibles mecanismos de acción (Con. 1981).

Wood y Col (1982) demostraron *in vitro* que los ácidos cafeicos, clorogénicos, ferúlicos y eláigico, particularmente el último son potentes inhibidores de la mutagénesis contra el diol epoxibenzo (a) pireno en la cepa de *S. typhimurium*. También encontraron que el ácido eláigico es un potente inhibidor de otros epóxidos policíclicos de hidrocarburos aromáticos.

Huang y Col, (1983) reportaron la inhibición de la mutagénesis de dioles epóxidos de hidrocarburos poliaromáticos por 27 flavonoides. La actividad antimutagénica dependió de la presencia de grupos fenólicos libres. El grupo más activo fue la miricetina, la quercetina, el luteolina, la robinetina, la 7- metoxiquercetina y la rutina (glucósido de quercetina) (Newmark, 1987).

Un estudio más reciente reveló que el ácido tánico, la quercetina, la miricetina y el ácido antroflávico son capaces de inhibir el metabolismo y subsecuente ataque al ADN de la epidermis del ratón por el N meti-N nitrosourea que induce tumores, así como

del dimetilbenzo (a)-antraceno y el benzo (a) pireno. De todos los fenoles probados, el ácido tánico fue el que mostró la máxima quimoprotección, aún cuando los otros fenoles también presentaron dicha protección (Nukhtar y Col, 1988).

Hang (1985) encontró que el ácido tánico y varias antraquinonas hidroxiladas y derivadas del ácido cinámico, los cuales son fenoles presentes en alimentos para humanos, inhiben la mutagenicidad *in vitro* de diol epóxidos de hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Steel y Col (1985) informaron que la (+)catequina inhibió la mutagenicidad de aminas aromáticas, del 2-aminofluoreno y del 4-aminobifenilo *in vitro* aparentemente por acción con el carcinógeno. Lesca (1983) encontró que el ácido elágico tiene un potente efecto de protección contra tumores en ratones, inducidos por benzo (a) pireno. (Newmark, 1987).

Los fenoles están ampliamente distribuidos en los alimentos principalmente de origen vegetal (no están presentes en alimentos de origen animal, excepto como trazas residuales). Sin embargo, los fenoles de las plantas se oxidan rápidamente en el estado libre, por lo que son frecuentemente destruidos durante el almacenamiento o por técnicas de procesamiento, especialmente cuando la estructura de la planta es destruida.

Las sustancias antimutagénicas pertenecen a una gran variedad de familias químicas como son: los fenoles, los tocoferoles, los ácidos grasos, los tioles, los iones metálicos, las proteínas, etc.

Por ejemplo, las chalconas inhiben la mutagenicidad del benzo (a) pireno en Salmonella typhimurium destacando aquellas que contienen insaturaciones y grupos ésteres susceptibles de ser

hidrolizados por la fracción S-9, observándose también que los grupos adicionales de OH dan mayor potencia de protección al igual que los grupos $-O-CH_2-CH=CH_2$ en comparación con los grupos alquilo (Itoh, 1983).

Una de las pruebas más usadas para demostrar la antimutagenicidad de las sustancias, como el ácido elágico, la riboflavina, el ácido clorogénico, el butilhidroxianisol, β -caroteno el ácido ascórbico contra mutágenos como el humo condensado de cigarro y el benzo (a) pireno, es el método que utiliza *Salmonella typhimurium* TA-98 con activación metabólica (Termen y Vander, 1985).

Wargovich y Newman (1983) encontraron, usando pruebas cortas las cuales detectan aberraciones del núcleo de células epiteliales de colon, que la administración oral de varios fenoles de plantas (ácido ferúlico, ácido elágico, curcumina y quercetina) no inhibieron la genotoxicidad de la 1,2 dimetilhidrazina. Sin embargo, cuando se administró un hidrocarburo poliaromático intrarrectalmente, la administración oral de ácido caféico, ferúlico, elágico y quercetina inhiben significativamente la aberración nuclear (Wargovich y col. 1985).

Con el fin de usar un enfoque preventivo, un aspecto importante para bajar el riesgo de cáncer es sin duda el hábito dietario. Se sugiere disminuir el consumo de grasa saturada, aumentar la ingesta de fibra dietaria, aumentar la proporción de proteína vegetal entre otros.

F. Fenoles, clasificación y propiedades.

Los fenoles son alcoholes aril en los cuales el grupo $-OH$ está enlazado a un hidrocarburo aromático. El más simple de estos compuestos es el fenol, en el cual la porción hidrocarbonada es el

grupo fenil. Algunos de los más importantes fenoles y sus propiedades son:

Compuesto	Propiedades
Fenol	solido blanco, olor caracteristico, pf 41°C pe 182°C.
m-Cresol	Amenudo se encuentra mezclado con orto y para cresol ó ácido cresilico, líquido amarillo pf 11°C, pe 203°C.
o-Cresol	Solid, pf 31°C, pe 191°C.
p-Cresol	solido cristalino olor cararteristico, pf 36° C, pe 202°C.
1-Naftol	Alfa-naftol, solido incoloro, pf 96°C, pf 282°C.
2-Naftol	Beta-naftol, pf 122°C, pe 288°C.

Los fenoles tienen propiedades diferentes a las de sus correspondientes alcoholes alifaticos y alcoholes olefinicos. Muchos compuestos fenólicos importantes tienen grupos nitro ($-NO_2$) y halogenos (particularmente Cl) unido a los anillos aromáticos. Estos sustituyentes pueden afectar fuertemente sus propiedades fisicas y químicas y conducta toxicológica.

Propiedades y usos de los fenoles.

Estos compuestos son ácidos debiles que se ionizan a iones fenolato en presencia de base.

Los fenoles son extraídos comercialmente desde alquitranes dentro de bases acuosas como iones fenolato. El mayor uso comercial de los fenoles es en la manufactura de polimeros de resinas fenolicas, usualmente con formaldehido. Fenoles son usados como antisépticos y desinfectantes en areas donde el olor del fenol puede ser soportado. Los fenoles fueron originalmente usados sobre heridas y en cirugía. (Stanley E Manhan).

Existen en la naturaleza sustancias que funcionan como antimutágenos, es decir, interfieren con la expresión de las mutaciones; los compuestos fenólicos son un ejemplo ya que actúan, mediante una serie de mecanismos bioquímicos, como antimutágenos y anticarcinógenos.

El alto consumo de frijol por parte de la población mexicana, en particular de frijol flor de mayo por el pueblo Queretano así como el contenido de fenoles condensados en la testa de los mismos podrían estar contribuyendo a contrarrestar los efectos mutagénicos de contaminantes ambientales como benzo(a)pireno y 1-nitropireno compuestos comunmente presentes en el aire, derivados de la combustion de gasolinas y probada capacidad mutagenica o de compuestos, como por ejemplo, las aflatoxinas en la dieta diaria provenientes de la contaminación por hongos.

IV HIPOTESIS

Los fenoles presentes en el frijol común (Phaseolus vulgaris) var. Flor de Mayo inhiben la acción mutagénica de los contaminantes ambientales benzo (a) pireno y 1-nitropireno.

V. OBJETIVOS

A. GENERAL.

Investigar las propiedades antimutagénicas de los fenoles presentes en frijol común (Phaseolus vulgaris).

B. ESPECIFICOS.

1. Aislar, purificar e identificar parcialmente los fenoles del frijol Flor de Mayo.

2. Establecer la mutagenicidad en Salmonella typhimurium de los contaminantes ambientales que se usarán como controles positivos de mutagénesis: benzo (a) pireno y 1-nitropireno.

3. Probar la capacidad de diferentes extractos de fenoles presentes en frijol crudo y cocido para inhibir la mutagénesis de los controles positivos.

VI METAS

-Conocer el grado de acción antimutagénica de los compuestos presentes en la dieta del pueblo Queretano.

-Implementar metodologías adecuadas para el aislamiento y cuantificación de los fenoles presentes en frijol.

-Determinar la concentración de los fenoles extraídos que tienen la capacidad de inhibir una cierta cantidad de mutágenos ambientales.

VII. MATERIALES Y METODOS

A. Materiales.

Se utilizó frijol (*Phaseolus vulgaris*) var. flor de Mayo procedente de El Bajío el cual se mantuvo en refrigeración a 4 °C hasta su análisis. Debido a que en la testa es donde se encuentra el mayor porcentaje de fenoles, ésta se separó manualmente para obtenerla libre de cotiledón y del embrión. Se guardó a 4 °C protegida de la luz.

B. Aislamiento y purificación de fenoles.

En la Fig. 2 se muestra el diagrama para el aislamiento y cuantificación de los fenoles del frijol.

Una vez que se adquirió, se limpió con una gasa para librarlo de sustancias extrañas que se puedan quitar de ésta forma. El descascarillado se realizó en forma manual auxiliándose de una navaja o bisturí, procurando solo desprender la cascarilla.

Para la extracción de los fenoles se usaron tres solventes: metanol al 100 %, metanol-agua al 50 % y agua al 100 %, la relación fue de 200 mg de polvo de cascarilla en 10 ml de solvente y se pusieron en un matraz Erlenmeyer tapado y este a su vez en un baño de agua a 30 °C con agitación durante una hora. Además se preparó un extracto de frijol cocido en una relación de frijol:agua de 1:5. Los solventes orgánicos se evaporaron mediante el uso de un rotoevaporador al vacío a 40 °C y finalmente se liofilizaron los extractos (Fig. 3). Para el proceso de liofilización se requirió que el extracto se encontrara disuelto o suspendido en agua desionizada

Fig. 2 Diagrama general para el aislamiento de fenoles en frijol.

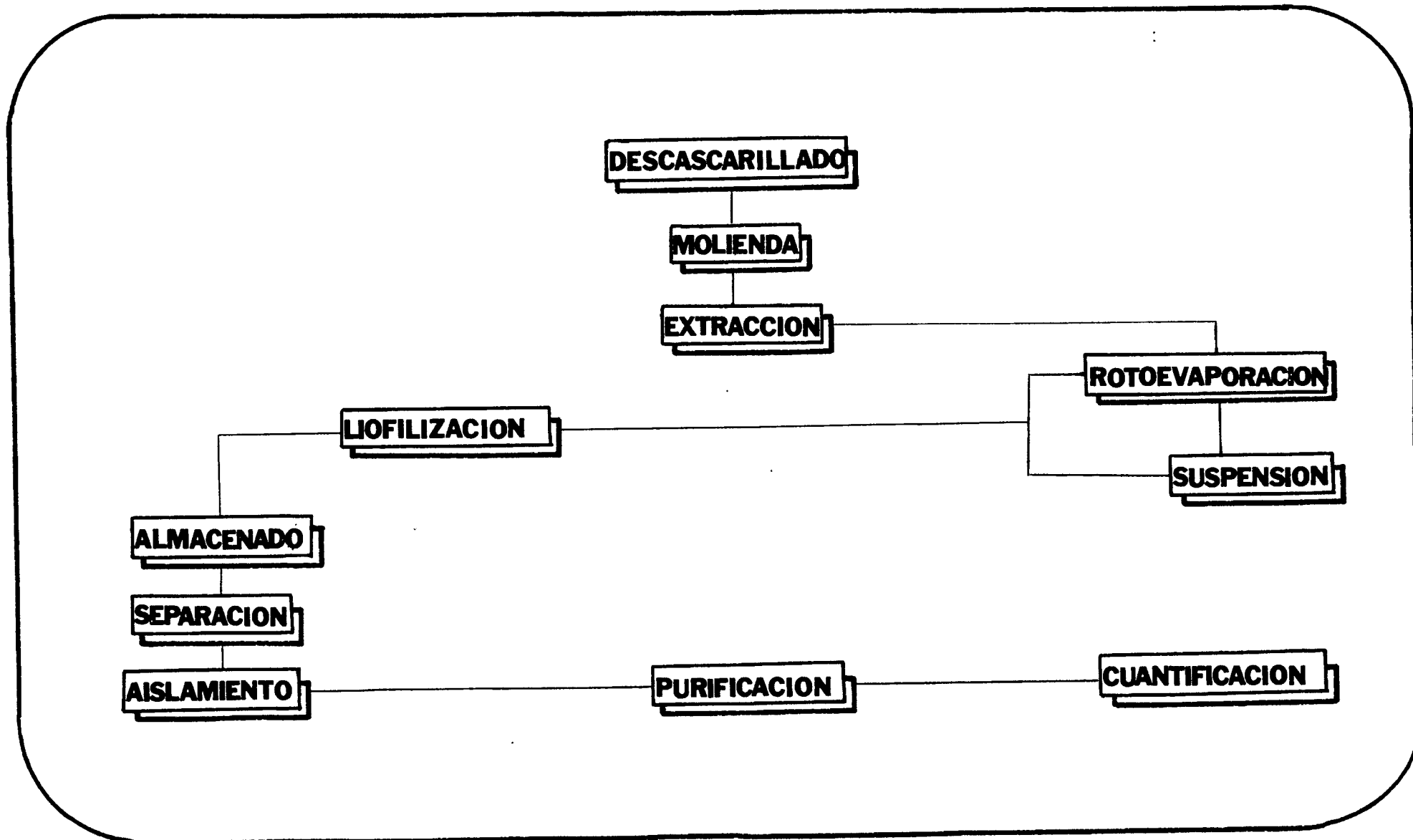
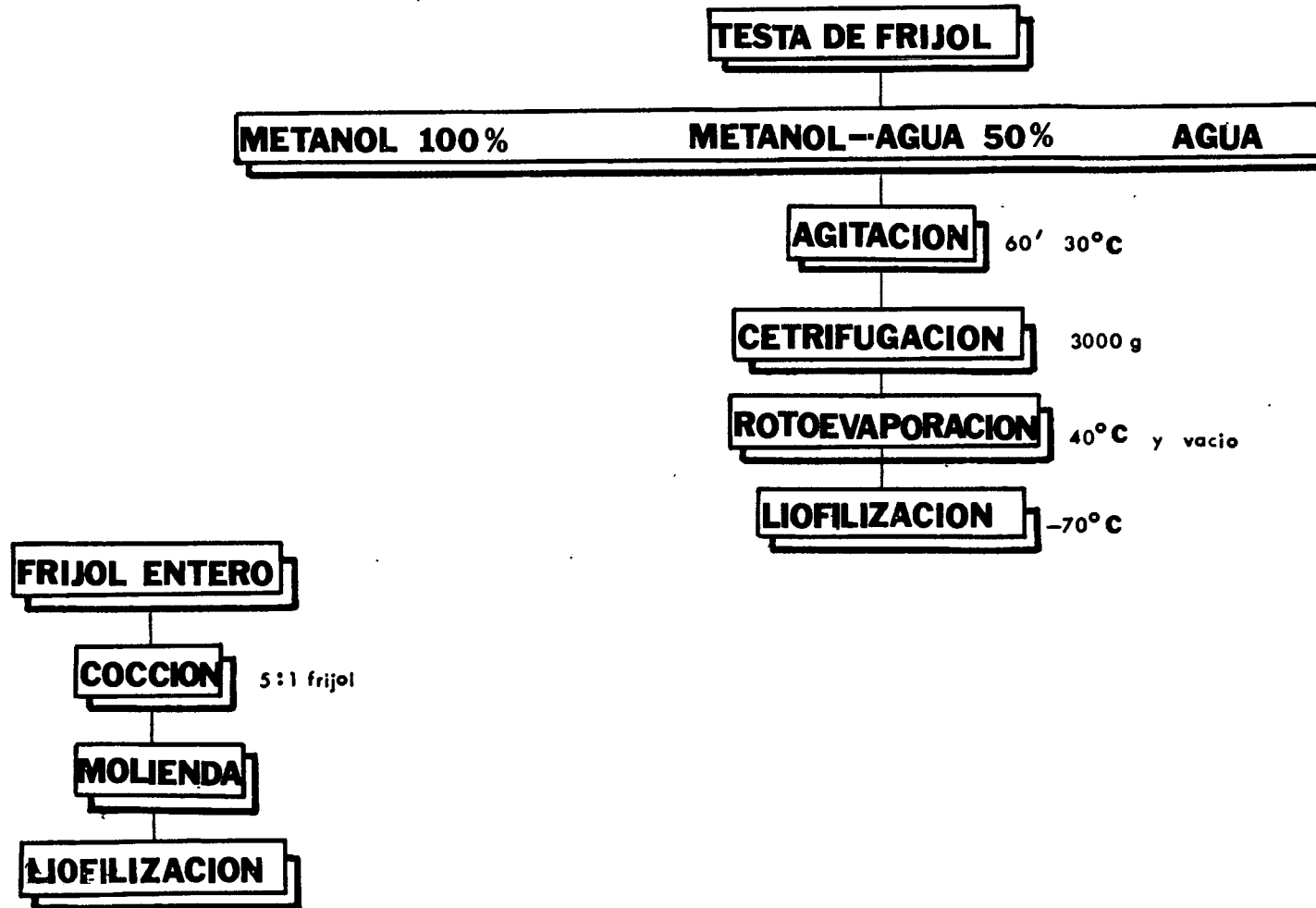


Fig. 3 Obtención de los extractos de frijol.



estéril ya que ambos se congelaron a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de meterlos al liofilizador. El extracto acuoso y el del frijol completo cocido se liofilizaron directamente después de la extracción, sin pasar por otro proceso.

Los compuestos extraídos se almacenaron a $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ libres de oxígeno y en ausencia de luz en recipientes estériles. Se procedió a su cuantificación, identificación y al estudio antimutagénico (Fig. 4).

C. Cuantificación de los fenoles aislados.

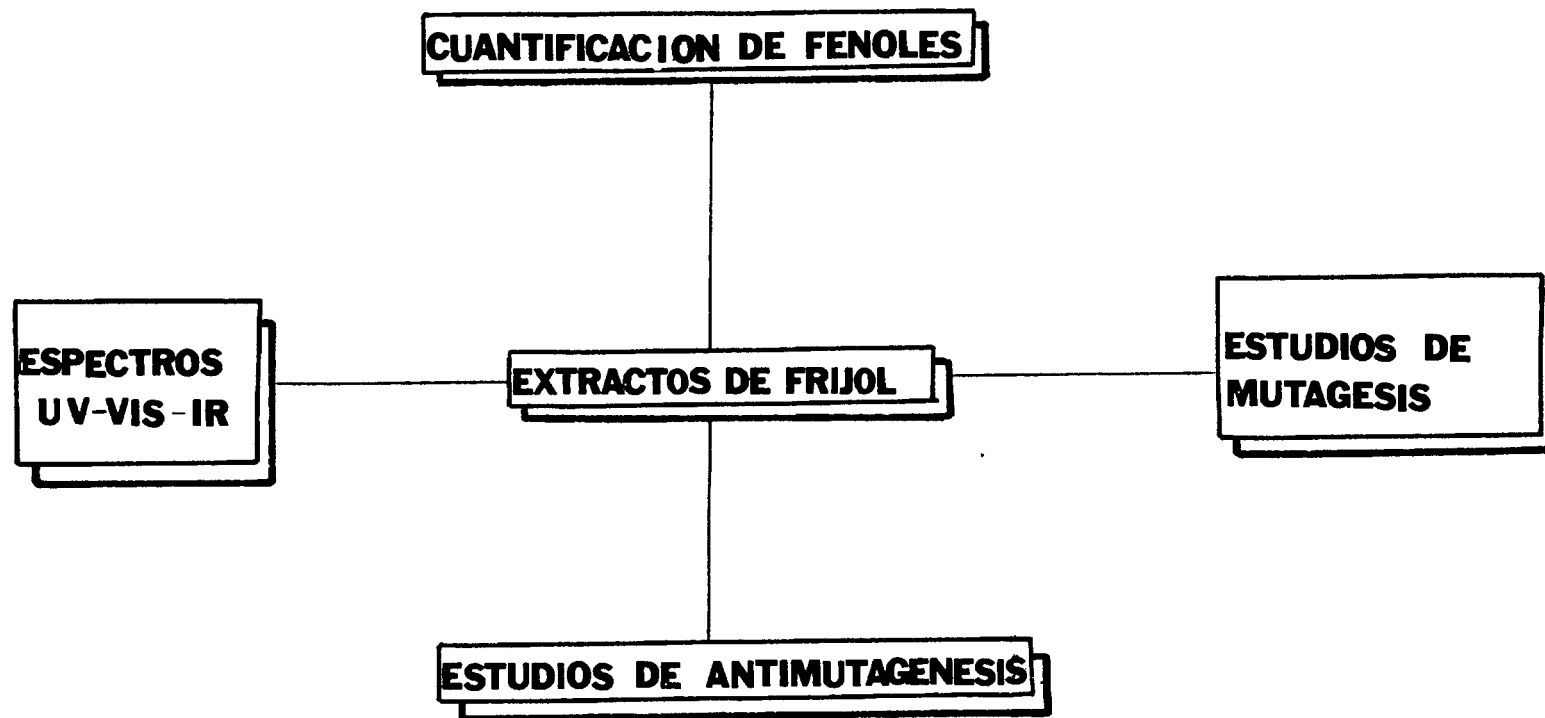
Para la cuantificación de los fenoles presentes en los extractos de frijol se utilizó el método de Price y Butler (1978) que utiliza vainillina en medio ácido y catequina como estándar. Para su cuantificación, se construyó una curva de calibración hasta 0.2 mg/ml de catequina, la reacción se desarrolló a temperatura controlada de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando reactivos recién preparados.

En el caso de la cuantificación de los fenoles presentes en los extractos se pesaron 200 mg. y se les agregaron 10 ml. de metanol y se agitó durante 1 hora a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se procedió con la reacción de la vainillina como se indicó anteriormente. Los resultados se expresaron como mg-equivalente de catequina con respecto a 100 g. de muestra.

D. Estudio de las estructuras químicas de los compuestos aislados.

Con el fin de conocer acerca de la estructura química de los compuestos extraídos del frijol, se obtuvieron los espectros de absorción en la región visible ($350\text{--}750\text{ nm}$) ultravioleta ($200\text{--}350\text{ nm}$) e infrarrojo ($4000\text{--}600\text{ cm.}^{-1}$). Para tal fin se usó un espectrofotómetro DU-65 marca Perkin-Elmer y un equipo IR por transformada de Fourier serie 1900 marca Perkin-Elmer.

Fig. 4 Estudios con los extractos de frijol



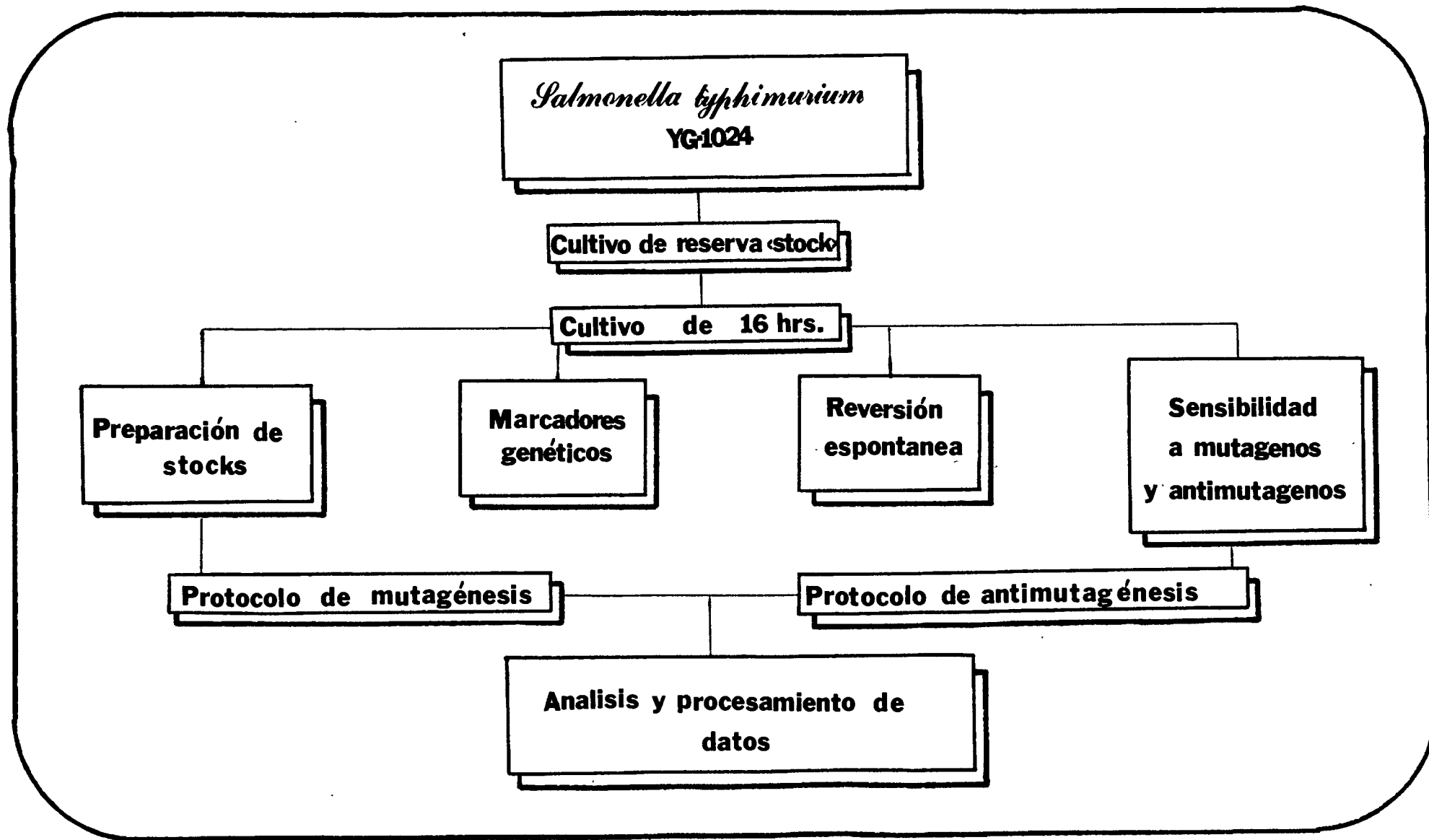
E. Mutaciones génicas en Salmonella typhimurium YG-1024.

En la Fig. 5 se muestra el diagrama de flujo seguido en el estudio para las mutaciones génicas de Salmonella typhimurium.

Una de las pruebas más difundidas para la identificación de mutágenos es la desarrollada por el doctor Bruce N. Ames de la Universidad de California (1971) empleando como sistema biológico diversas cepas mutantes aisladas a partir de cepas silvestres de Salmonella typhimurium.

La cepa bacteriana que se utilizó fue Salmonella typhimurium YG-1024 mutante (auxótrofa, His⁻) resistente a la ampicilina y tetraciclina que requiere de histidina para su crecimiento. La mutación inducida (por algún agente químico) revierte el fenotipo del operón de histidina lo que confiere a las revertantes (prototrofas His⁺) la capacidad de crecer en medios carentes del aminoácido o cantidades limitantes de él. La base de la prueba consiste en la inhibición de los mutágenos por sustancias que se añaden con el fin de evaluar su posible efecto antimutagénico

Fig. 5 Estudios de las mutaciones genicas en *Salmonella typhimurium*



1. Cultivo de reserva

Las bacterias obtenidas por conducto del doctor Ames vienen en discos de papel filtro impregnados con cultivos recientes de cada cepa dentro de bolsitas de plástico con agar blando, para evitar su desecación. Lo antes posible se colocan los discos con pinzas estériles en 5 ml de caldo nutritivo y se incuban como se explica a continuación. De dicho cultivo se toman 0.8 ml de la suspensión bacteriana más 0.07 ml. de dimetilsulfóxido y se congelan rápidamente sobre nitrógeno líquido y se mantienen a -50°C .

2. Cultivo de 16 hrs.

Se tomó con un aplicador de madera estéril una muestra del stock o cultivo de reserva y se sembró en 5 ml de caldo nutritivo al cual se le ha agregado $1\ \mu\text{g}$ de ampicilina y $1\ \mu\text{g}$ de tetraciclina por ml de caldo, se incubó con agitación por 16 hrs. a 37°C .

3. Preparación del stock.

Para evitar congelar y descongelar constantemente el cultivo de reserva, de un cultivo de 16 hrs., se comprobaron sus marcadores genéticos, la reversión espontánea y la sensibilidad a mutágenos y se sembró por medio de estrias en cajas petri con medio mínimo de Vogel-Bonner complementado con exceso de histidina.

4. Marcadores genéticos.

La presencia de los plásmidos que le confieren resistencia a los antibióticos como son ampicilina y tetraciclina y que aumenta la sensibilidad a los mutágenos se evaluó sembrando a la bacteria mediante estrias perpendiculares a estrias de los antibióticos (0.1

ml de una solución de 1 mg/ml en hidróxido de sodio 0.02 N) sobre medio mínimo con exceso de histidina, de manera que dividía en dos la caja de petri y se dejaba secar. La prueba era positiva si la bacteria lograba crecer a lo largo de toda la estría, es decir que no se inhibía al pasar por el antibiótico, después de 12 a 24 hrs. de incubación a 37 °C.

5. Permeabilidad de la membrana.

Se verificó mediante la sensibilidad de las cepas al cristal violeta; inoculando 0.1 ml del cultivo en cajas de petri con medio completo de Vogel-Bonner y se dejó secar. Se colocó un disco de papel filtro estéril (0.5 cm de diametro) en el centro de la caja. Con ayuda de una pipeta estéril se colocó sobre el disco de papel 10 ml. de una solución de cristal violeta (1 mg/ml) se incubó de 12-24 hrs. a 37 °C. Una zona clara de inhibición alrededor del disco indicaba la presencia de la mutación.

6. Reversión espontánea.

Se colocó 0.1 ml del cultivo en un tubo con tapón de rosca que contenía 2 ml de agar de superficie enriquecido con histidina a 45 °C, se mezcló el contenido con ayuda de un vortex y se distribuyó perfectamente sobre medio mínimo de Vogel-Bonner. Se dejó solidificar, se invirtieron las cajas y se incubaron a 37 °C por 48 hrs. Se contaron las revertantes y se verificó la presencia de una densa capa de microcolonias (con ayuda de un microscopio de disección) que resultaron como consecuencia de las trazas de histidina presentes en el agar de superficie. Esta capa de microcolonias tendía a desaparecer cuando el compuesto que se probaba era tóxico. El número

de revertantes espontáneas en promedio fué de 90-150 colonias por caja.

7. Sensibilidad a mutágenos.

Para evaluar la sensibilidad a mutágenos se realizaron curvas dosis-respuesta para Salmonella typhimurium YG-1024 contra dos contaminantes ambientales que figuran como de los más comunes (Powrie y Col, 1986) y que han sido elegidos también por sus diferentes formas de actuar. Estos son el benzo(a)pireno un promutágeno que requiere de una activación metabólica (con una fracción denominada S-9) y 1-nitropireno que es un mutágeno directo. Para ello se realizaron los protocolos que se presentan en el Cuadro 2. Se define como un resultado positivo, al aumento en el número de revertantes que supera por más de dos veces la frecuencia en la reversión espontánea y que muestra un incremento en el número de mutantes en función de la concentración del compuesto.

F. Estudio de antimutagénesis en Salmonella typhimurium.

En esta parte se presentan los pasos para cuantificar el porcentaje de inhibición de la acción mutagénica del benzo(a)pireno, y del 1- nitropireno, sustancias mutagénicas usadas como control. En este estudio se verificó la presencia de los marcadores genéticos, se evaluó la frecuencia de la reversión espontánea y se determinó la sensibilidad a mutágenos y antimutágenos conocidos, realizando para esto curvas dosis-respuesta que mostraron la dosis óptima de cada sustancia (la que mostró en su caso mayor inducción o inhibición de la reversión).

CUADRO 2. PROTOCOLO PARA LA OBTENCION DE LAS CURVAS DOSIS
 RESPUESTA DE *S. typhimurium* CON B(a)P Y 1-NP.

caja	YG-1024	1Np	B(a)P	S-9	DMSO
1	100 ml		-	-	-
2	100 ml		-	-	50 ml
3	100 ml		-	500 ml	-
4	100 ml		0.5 µg	500 ml	-
5	100 ml		1.0 µg	500 ml	-
6	100 ml		1.5 µg	500 ml	-
7	100 ml		2.0 µg	500 ml	-
8	100 ml		4.0 µg	500 ml	-
9	100 ml		8.0 µg	500 ml	-
10	100 ml		-	-	-
11	100 ml		-	-	50 ml
12	100 ml	0.03 µg	-	-	-
13	100 ml	0.06 µg	-	-	-
14	100 ml	0.08 µg	-	-	-
15	100 ml	0.10 µg	-	-	-

s-9 homogenado de higado de rata.

b(a)p benzo(a)pireno

s-np 1nitropireno

Se guardó la suspensión bacteriana con dimetilsulfóxido a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$; para evitar congelar y descongelar los cultivos de reserva, se prepararon cajas de Petri con cultivos que se guardaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta por 1-2 meses. Se tomó con un aplicador estéril una muestra del cultivo y se sembró en caldo nutritivo. Se incubó con agitación por 16 hrs. a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se comprobaron los marcadores genéticos, la reversión espontánea y la sensibilidad a los mutágenos. Se sembró en medio de Vogel Bonner complementado con exceso de histidina. En el caso de la cepa YG-1024 se agregaron soluciones estériles de tetraciclina y ampicilina al caldo nutritivo durante la incubación de 16 hrs. con agitación.

La cantidad de la fracción S-9, homogenado hepático que se agregó en el experimento, es determinante en la respuesta que se obtiene, por lo que se debió averiguar cual es la óptima antes de iniciar la prueba. Para este propósito se utilizaron mutágenos conocidos como el benzo(a)pireno y el 1-nitropireno en concentración de $2\text{ }\mu\text{g/caja}$ y $0.1\text{ }\mu\text{g/caja}$ respectivamente.

Además del control positivo, se incluyó un control con el solvente y un control de esterilidad de la mezcla S-9 ya que esta hace variar el número de revertantes espontáneas.

G. Sensibilidad a los antimutágenos.

La sensibilidad a los antimutágenos se evaluó con ácido elágico, con respecto a las concentraciones de B(a)P ($2.0\text{ }\mu\text{g}$) y 1-NP ($0.1\text{ }\mu\text{g}$) en las que se obtuvo mayor número de revertantes como resultado de la mutación inducida por los controles positivos. Esto con el fin de encontrar la cantidad del fenol que inhibe mayormente a cada mutágeno, para lo cual se ensayaron varias concentraciones que van de

50-500 μg /caja de ácido elálgico. En el Cuadro 3 se muestra el protocolo utilizado para el estudio de sensibilidad.

La concentración de ácido elálgico óptima encontrada se utilizó como control positivo durante el experimento de antimutagénesis.

H. Protocolo de mutagénesis de los extractos obtenidos.

Antes de evaluar la capacidad antimutagénica en los extractos de frijol, fué necesario probar su incapacidad para producir mutación en S. typhimurium. El protocolo usado es el siguiente: a 100 μl de bacteria se le agregaron 100, 250, 500 y 1000 μg de el extracto correspondiente, un control positivo de mutagénesis se corre al mismo tiempo; B(a)P cuando la prueba es con activación metabólica y 1-NP cuando es sin activación, obteniéndose un resultado positivo si la reversión espontánea es superada dos veces como mínimo y a su vez esta se incrementa conforme aumenta la cantidad de extracto, el Cuadro 4 resume éste protocolo.

I. Protocolo de antimutagénesis.

Los ensayos de antimutagénesis consistieron en:

1. Evaluar el efecto que tienen los extractos en diferentes dosis sobre una concentración constante del mutágeno, es decir, netamente el experimento de antimutagénesis.
2. Evaluar el número de sobrevivientes que se tienen cada vez que se varía la concentración del extracto.

Además, en cada ensayo de antimutagénesis se reportó el número de revertantes por cada 10^7 sobrevivientes para eliminar el error causado por la muerte de bacterias y obtener un número de revertantes real. El protocolo de antimutagénesis que se siguió para los extractos fué de 100 μl de bacteria, 0.1 μg de 1NP, 250-1000 μg de

CUADRO 3. PROTOCOLO DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMUTAGENOS. (ACIDO ELAGICO).

caja	YG-1024	B(a)P	á. elágico	S-9	1-Np
16	100 μ l	-	-	-	-
17	100 μ l	-	-	500 μ l	-
18	100 μ l	-	500 μ g	500 μ l	-
19	100 μ l	2 μ g	-	500 μ l	-
20	100 μ l	2 μ g	50 μ g	500 μ l	-
21	100 μ l	2 μ g	125 μ g	500 μ l	-
22	100 μ l	2 μ g	250 μ g	500 μ l	-
23	100 μ l	2 μ g	500 μ g	500 μ l	-
24	100 μ l	-	-	-	-
25	100 μ l	-	500 μ g	-	-
26	100 μ l	-	-	-	0.1 μ g
27	100 μ l	-	50 μ g	-	0.1 μ g
28	100 μ l	-	125 μ g	-	0.1 μ g
29	100 μ l	-	250 μ g	-	0.1 μ g
30	100 μ l	-	500 μ g	-	0.1 μ g

CUADRO 4 PROTOCOLO PARA EVALUAR LA MUTAGENICIDAD DE LOS EXTRACTOS DEL FRIJOL.

CAJA	CEPA	EXTRACTO	1-NP	B(a)P	S-9
1	100 μ l	-----	-----	-----	-----
2	100 μ l	-----	-----	2.0 μ g	500 μ l
3	100 μ l	-----	0.1 μ g	-----	500 μ l
4	100 μ l	100 μ g	-----	-----	-----
5	100 μ l	250 μ g	-----	-----	-----
6	100 μ l	500 μ g	-----	-----	-----
7	100 μ l	1000 μ g	-----	-----	-----
8	100 μ l	100 μ g	-----	-----	500 μ l
9	100 μ l	250 μ g	-----	-----	500 μ l
10	100 μ l	500 μ g	-----	-----	500 μ l
11	100 μ l	1000 μ g	-----	-----	500 μ l

extracto de frijol con su correspondiente control de esterilidad y de disolvente (DMSO y H₂O) según el caso en que se evaluó su posible toxicidad. En el caso del B(a)P se utilizaron 2 µg del mutágeno con 500 µl de mezcla S-9 y se varió la cantidad de extracto de 250-1000 µg. Un resumen de esto se muestra en el Cuadro 5.

J. Estudio de sobrevivencia.

Se realizó conjuntamente con la prueba de antimutagénesis, ésta consiste en tomar una alícuota constante de cada una de las 16 mezclas que son llevadas a un volumen total, que debe ser igual en todos los casos, y que se logra añadiendo en cada caso la cantidad suficiente de un amortiguador de fosfatos que cumpla con este fin. Una vez hechas las diluciones se separan las primeras (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) y se trabajó con los tres restantes (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}). De cada una de éstas mezclas se tomó 0.1 ml que se añadieron en tubos de tapón de rosca con 2 ml de agar blando completo a 45 °C, se agitó perfectamente en un vortex y se vació en medio completo de Vogel-Bonner, se incubaron las cajas invertidas una vez solidificadas durante 24 hrs. a 37 °C, después de lo cual se contaron las colonias en cada caja (estas son las sobrevivientes).

Los ensayos en donde se utiliza S-9 se trabajan en hielo para evitar que las enzimas pierdan su actividad. Cada experimento se realizó por triplicado con tres repeticiones independientes como mínimo para observar su reproducibilidad.

K. Diseño experimental

El diseño experimental seguido en el estudio de antimutagénesis es el siguiente:

DISEÑO EXPERIMENTAL

EXTRACTO

3(a1,a2,a3,a4, b1,b2,b3,b4, c1,c2,c3,c4, d1,d2,d3,d4)

B(A)P

1-NP

MUTAGENICIDAD

TOXICIDAD

ANTIMUTAGENICIDAD

A, B, C, D extractos
a1, a2, b4, c3 concentraciones

caja	cepa	1-NP	extracto	á.elágico
1	100 μ l		-	-
2	100 μ l	-	1000 μ g	-
3	100 μ l	0.1 μ g	-	-
4	100 μ l	0.1 μ g	250 μ g	-
5	100 μ l	0.1 μ g	500 μ g	-
6	100 μ l	0.1 μ g	750 μ g	-
7	100 μ l	0.1 μ g	1000 μ g	-
8	100 μ l	0.1 μ g	-	500 μ g

Protocolo de antimutagenesis de los extractos sobre 1-NP

caja	cepa	B(a)P	extracto	S-9	á.elágico
9	100 μ l	-	-	500 μ l	-
10	100 μ l	-	1000 μ g	500 μ l	-
11	100 μ l	2 μ g	-	500 μ l	-
12	100 μ l	2 μ g	250 μ g	500 μ l	-
13	100 μ l	2 μ g	500 μ g	500 μ l	-
14	100 μ l	2 μ g	750 μ g	500 μ l	-
15	100 μ l	2 μ g	1000 μ g	500 μ l	-
16	100 μ l	2 μ g	-	500 μ l	500 μ g

protocolo de antimutagenesis de los extractos sobre B(a)P.

L. ANALISIS Y PROCESAMIENTO DE RESULTADOS

Los datos de los experimentos se promediaron para cada triplicado independiente y se obtuvo la desviación estándar. Los datos se expresaron como número de revertantes por cada 10^7 sobrevivientes en las correspondientes gráficas, para tal fin se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{No. de revertantes real} = \frac{\text{(revertantes contados)}(\text{sobrevivientes})}{10^7 \text{ sobrevivientes}}$$

VIII. RESULTADOS Y DISCUSION

A. Contenido de fenoles en harina completa, en testa y en diferentes extractos de frijol.

En el Cuadro 6 se presentan los resultados del contenido de fenoles totales expresados como mg de catequina por gramo de producto.

Estos resultados se obtuvieron en base a la curva de calibración que se construyó con (+) catequina pura (Fig.6).

Los datos concuerdan satisfactoriamente con lo obtenido por otros autores para diferentes variedades de frijol (Gooycolea y col, 1991).

Con el método utilizado para la determinación de fenoles se encontró que el 100 % de estos se hayaron presentes en testa. El análisis de fenoles se efectuó en los diferentes extractos y se encontró que el metanólico presentó 813 mg equivalentes de catequina para cada gramo de extracto, éste contenido representa lo obtenido a partir de 4 g. de testa de frijol. 420 mg equivalentes de catequina están en 1 g de extracto metanol-agua al 50 % que se obtiene a partir de 5.87 g de testa. Para el caso de extracto acuoso 110 mg equivalentes de catequina representan 1 g de extracto el cual proviene de 4 g de testa.

La testa representó el 11 % en peso del grano entero y esto se reflejó en el contenido de fenoles en harina integral en comparación con la testa aislada de frijol.

Durante el proceso de cocción del frijol los fenoles interactuaron con proteínas por lo que no pueden ser cuantificados por el método de la vainillina.

CUADRO 6

CONTENIDO DE FENOLES EN HARINA, EN TESTA Y EN DIFERENTES EXTRACTOS DE TESTA DE FRIJOL.

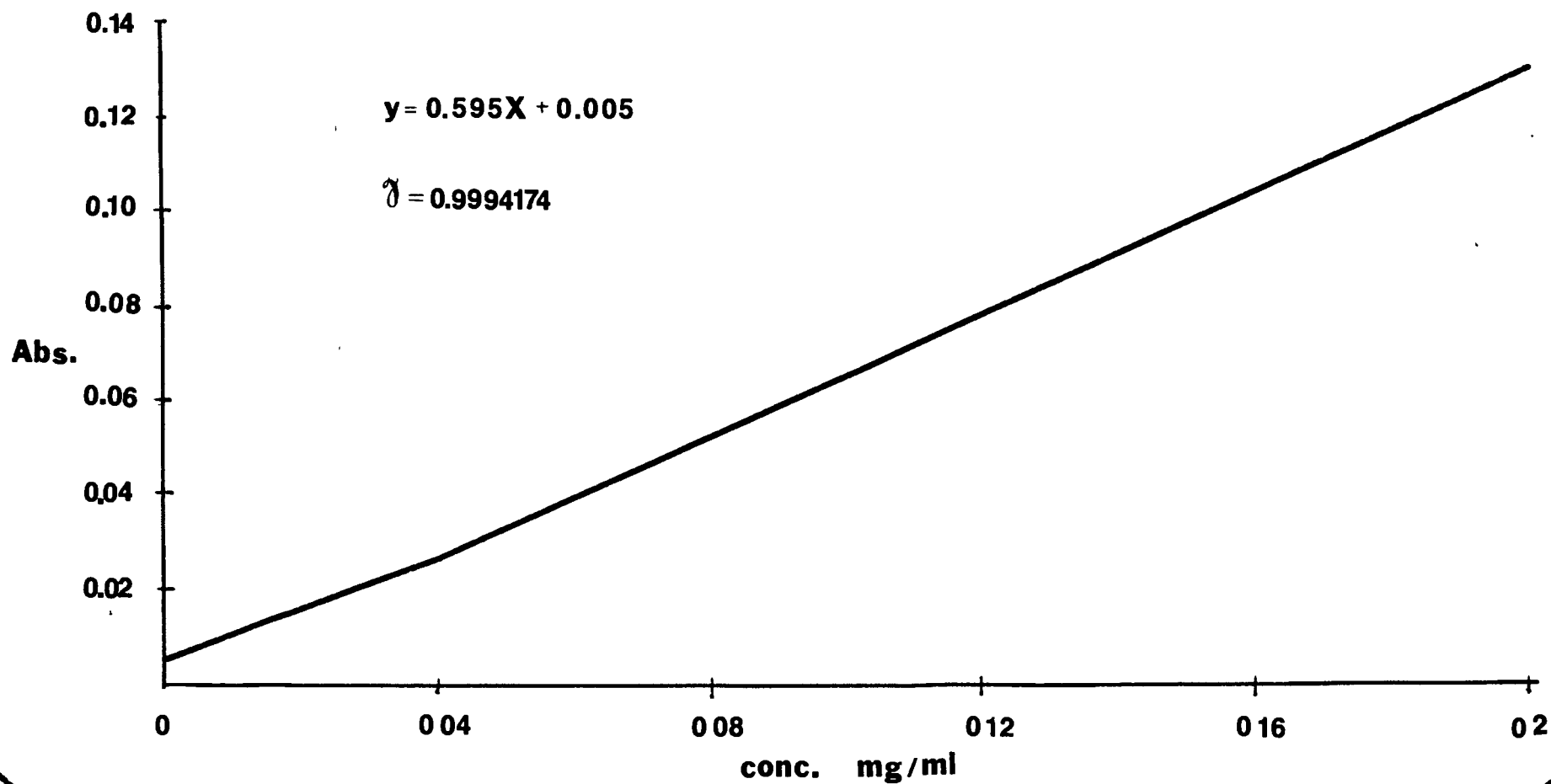
EXTRACTO	HARINA DE FRIJOL	TESTA	EXTRACTO DE TESTA
MG CATEQUINA/G			
ACUOSO	2.48	27.5	110.0 ±2 ^a
METANOL-AGUA	6.43	71.4	420.0 ± 3 ^b
METANOLICO	18.30	203.3	813.0 ± 2.64 ^c
FRIJOL COCIDO	ND	ND	ND

Los resultados son promedio de tres determinaciones.

Las letras indican diferencias no significativas a un nivel $p < 0.05$.

ND no se detecta.

Fig. 6 Curva de calibración obtenida con «+» catequina por el metodo de la vainillina para la cuantificación de fenoles.



El conocimiento del contenido de los fenoles, como catequina, en los diferentes extractos fue muy importante ya que con estos valores se calculó la cantidad necesaria que hubo de ser aplicada en los estudios sucesivos, de mutagenicidad y antimutagenicidad.

B Espectros UV-VIS e IR de fenoles puros y de extractos de frijol.

La (+) catequina pura presentó un pico de máxima absorción a 290 nm en el espectro UV-VIS, el ácido tánico puro también presentó un pico a 276 nm y el ácido elágico presentó dos picos de absorción uno de 271 nm y otro secundario a 365 nm; también se presentó un hombro de absorción a 310 nm. En lo que respecta a los picos de absorción de los extractos de frijol se observó que el extracto acuoso presentó un pico bien definido a 276 nm con un hombro a 330, el extracto metanol-agua al 50% presentó un pico de absorción bien definido a 281 nm y por último el metanólico, también presentó un pico bien definido a 290 nm. (Cuadro 7) Esto significa que dependiendo de la polaridad del solvente utilizado en la extracción hay una diferencia de 14 nm, al utilizar agua o metanol (Fig. 7 y 8).

En la Fig. 9 se presentan los espectros de absorción en la región infrarroja de (+)catequina, ácido elágico, ácido tánico y ácido galico; así como extractos metanólico, metanol-agua al 50% y acuoso Fig. 10. Aún cuando sí se registran las bandas principales de absorción de la catequina en los espectros de los extractos de frijol también se detectan otras bandas, lo que puede dar idea del grado de polimerización del compuesto (s). Los espectros obtenidos sugieren que se trata de compuestos aromáticos en conjugación con uno o más sustituyentes insaturados u otro anillo aromático y con uno o más grupos fenólicos. Se sugiere continuar con los estudios de espectrometría de masas para conocer la identidad química exacta de los compuestos.

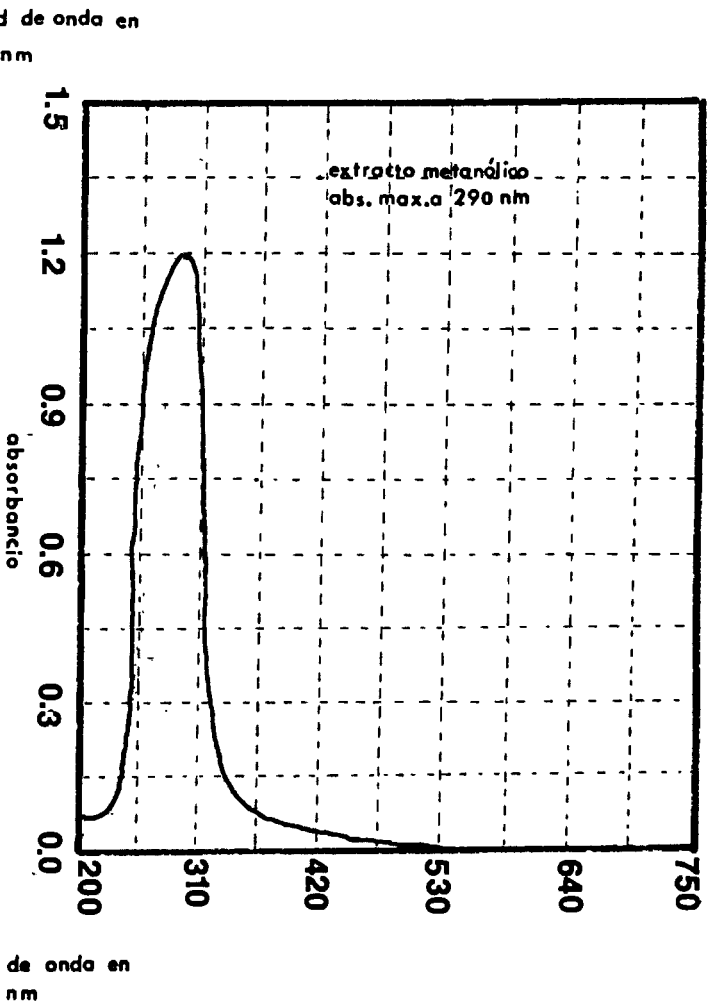
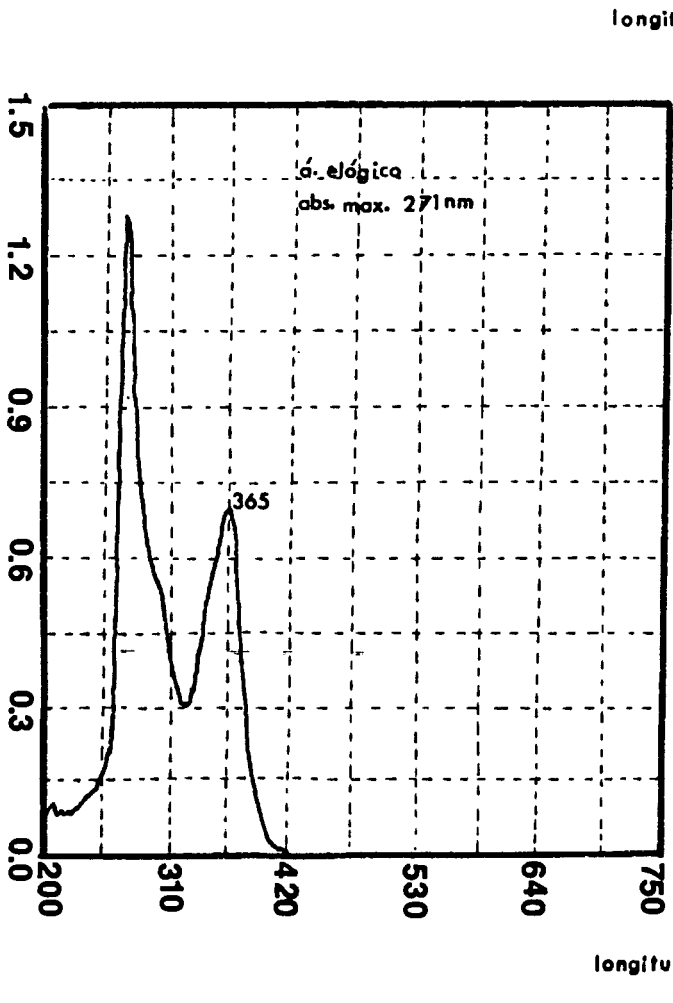
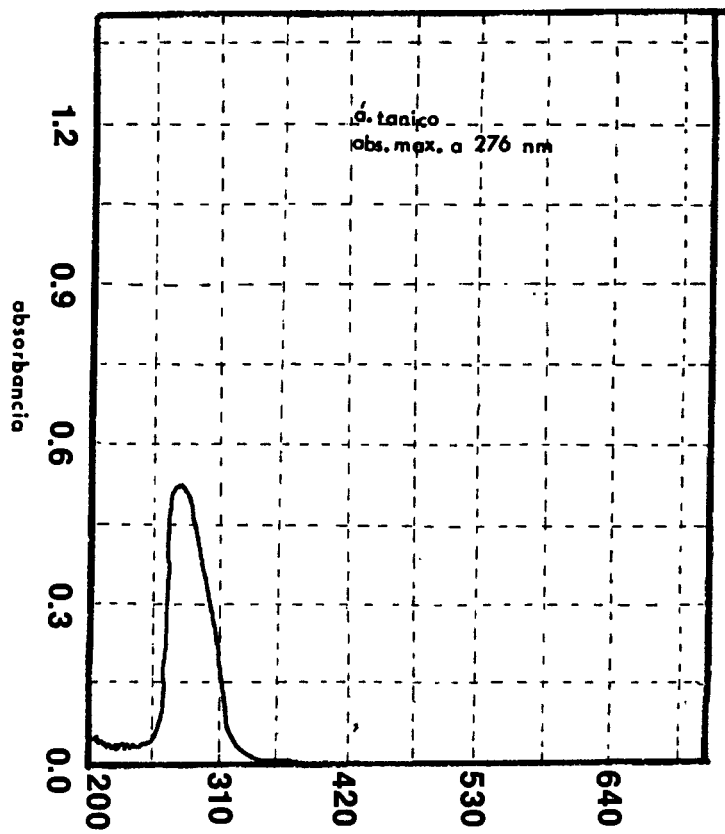
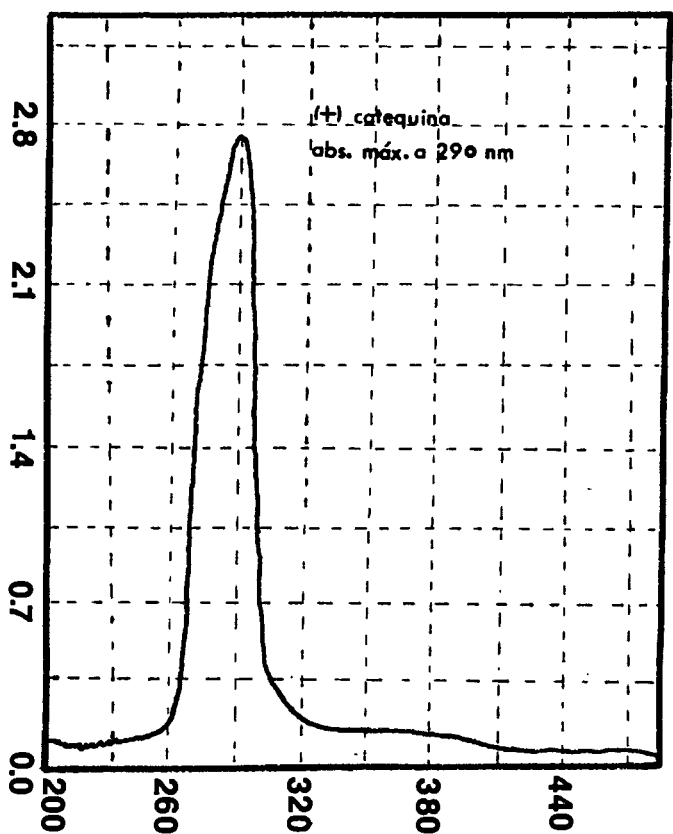


Fig. 7 Espectros UV-VIS de fenoles puros y extracto metanólico de cascarilla de frijol flor de mayo.

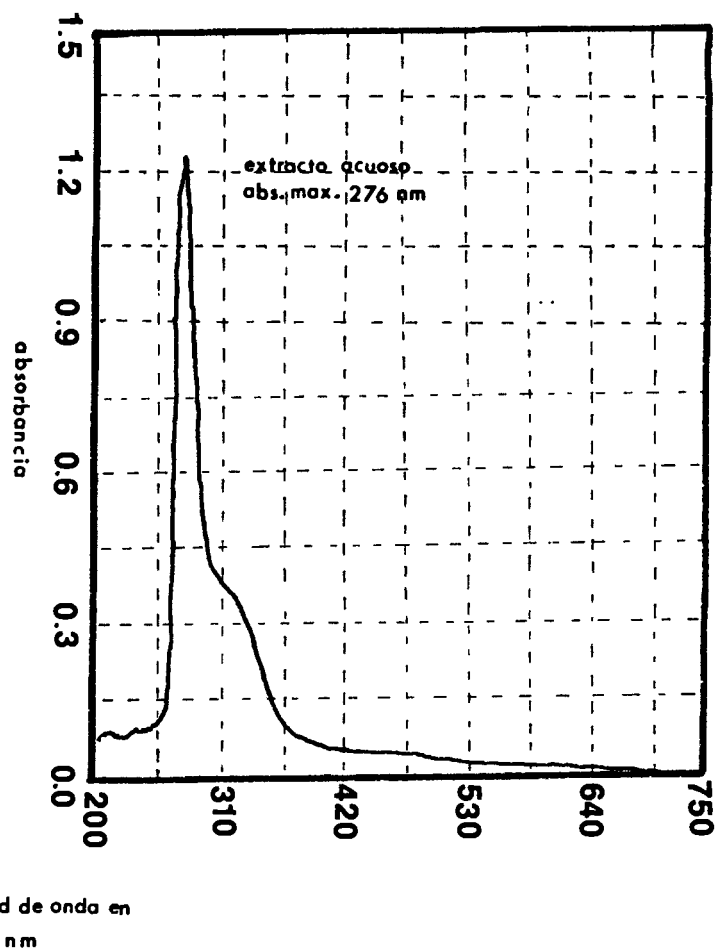
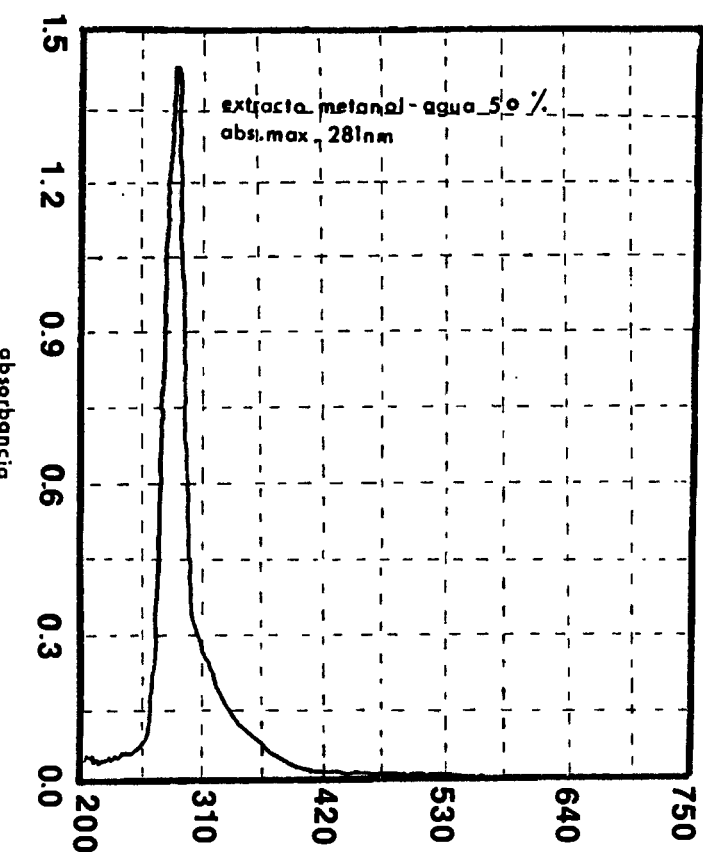
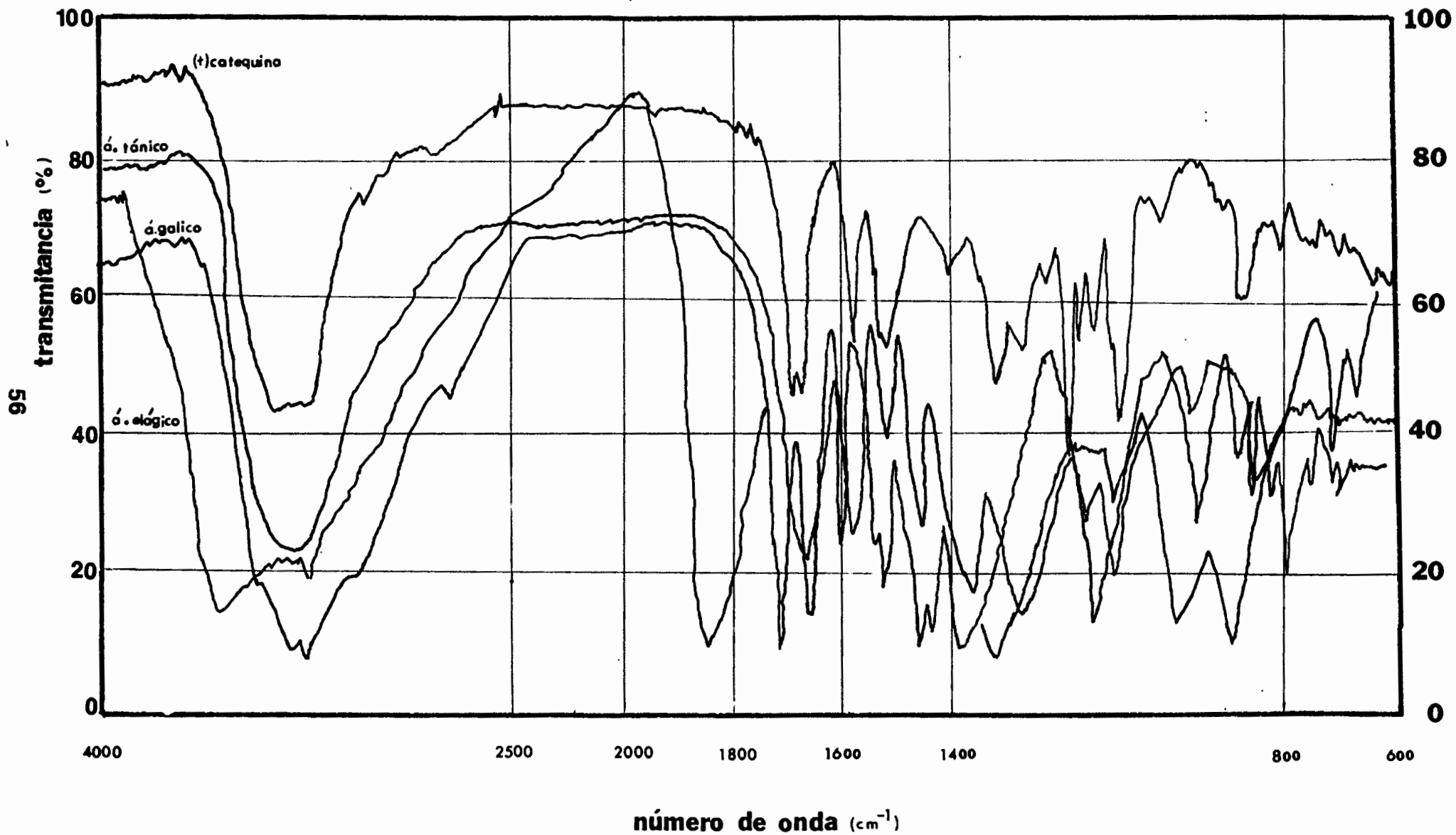
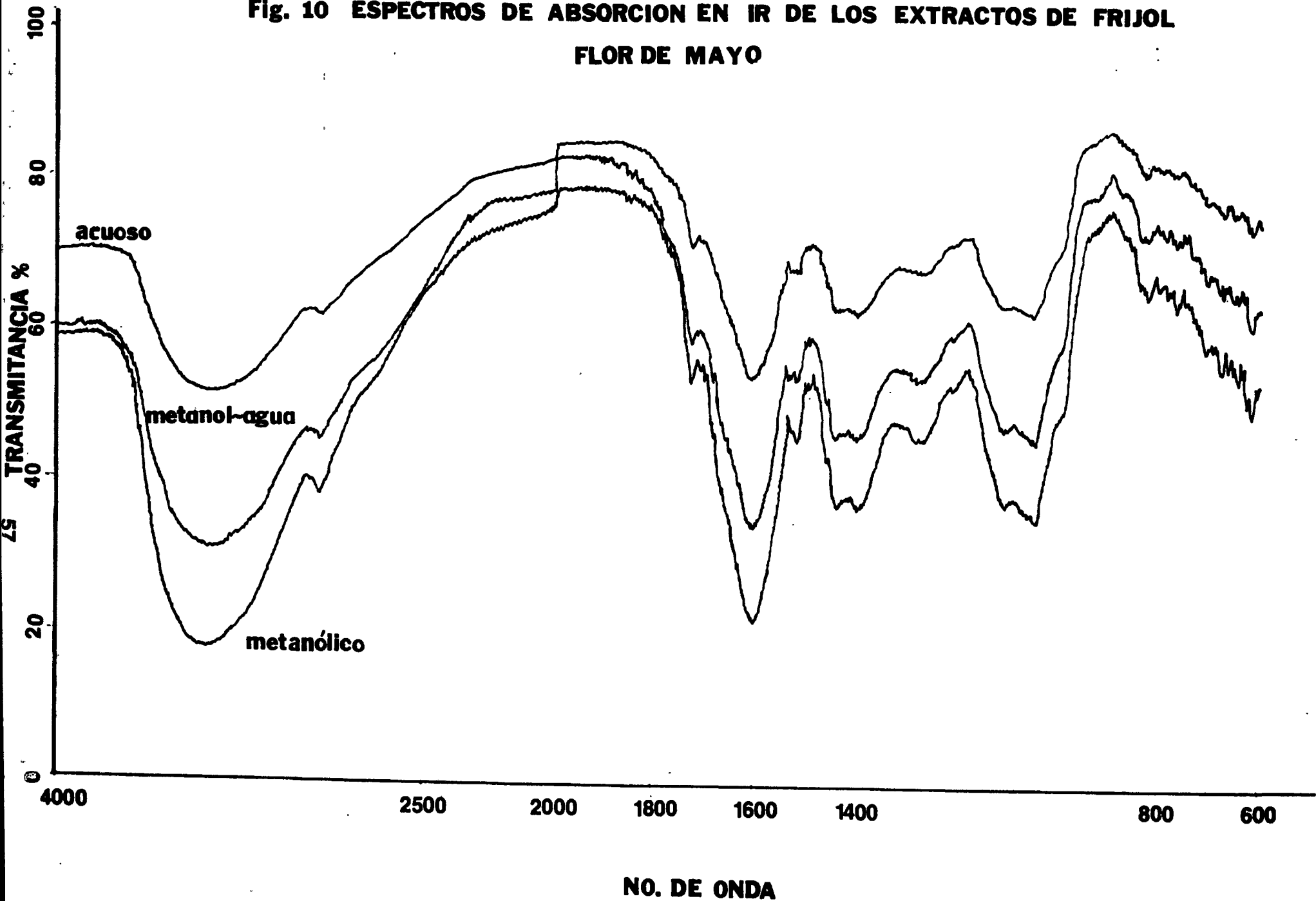


Fig. 8 UV-Vis de los extractos metanol-agua y acuoso.

Fig. 9 Espectros en IR de algunos fenoles.



**Fig. 10 ESPECTROS DE ABSORCION EN IR DE LOS EXTRACTOS DE FRIJOL
FLOR DE MAYO**



Cuadro 7 Principales longitudes de onda absorbidas por extractos y compuestos estandard.

Compuesto	Absorbancia máxima	Picos secundarios
(+)catequina	290 nm	-----
ácido elágico	271 nm	310 nm
ácido tánico	276 nm	-----
Extracto		
Metanólico	290 nm	-----
Metanol-agua	281 nm	-----
Acuoso	274 nm	330 nm

nm nanometros

C. Curvas dosis-respuesta de benzo(a)pireno y 1 nitropireno sobre S. typhimurium Y-G 1024.

Estos estudios permitieron definir las concentraciones óptimas de los dos mutágenos sobre el microorganismo de prueba que se usó bajo las condiciones prevalentes en el estudio. Las Figs 11 y 12 muestran la relación que existió entre el número de revertantes de S. typhimurium YG-1024 con respecto al aumento en la concentración de cada uno de los mutágenos. Para el caso del benzo(a)pireno, con activación metabólica, se requirieron 2.0 μg para obtener 500 células revertantes. El 1-nitropireno revirtió 840 células con 0.1 μg .

D. Toxicidad y mutagénesis de los extractos de frijol.

Antes de pasar al experimento de mutagenesis se probó la toxicidad y mutagenicidad de los extractos, los resultados obtenidos se resumen en las Fig 13 en las cuales se puede observar que ni aún en las concentraciones más altas del extracto se presentó una disminución marcada del número de bacterias en relación a la reversión espontánea. Esto indica, conjuntamente con las observaciones hechas en el microscopio sobre el fondo de la caja con medio mínimo de Vogel Bonner, que se presenta un desarrollo normal bacteriano y que no hubo muerte de bacterias por toxicidad, más aún para reforzar ésta afirmación las observaciones hechas sobre medio completo demostraron que la cuenta total bacteriana se mantuvo constante aún a la máxima concentración de cada extracto probado (10^7 bacterias por caja). También se observó en dichas figuras que en ningún caso los extractos tuvieron la capacidad de aumentar la reversión a más del doble de lo normal y siempre se mantuvieron en el

Fig. 11 Curva dosis respuesta benzo(a)pireno vs.
Salmonella typhimurium YG-1024

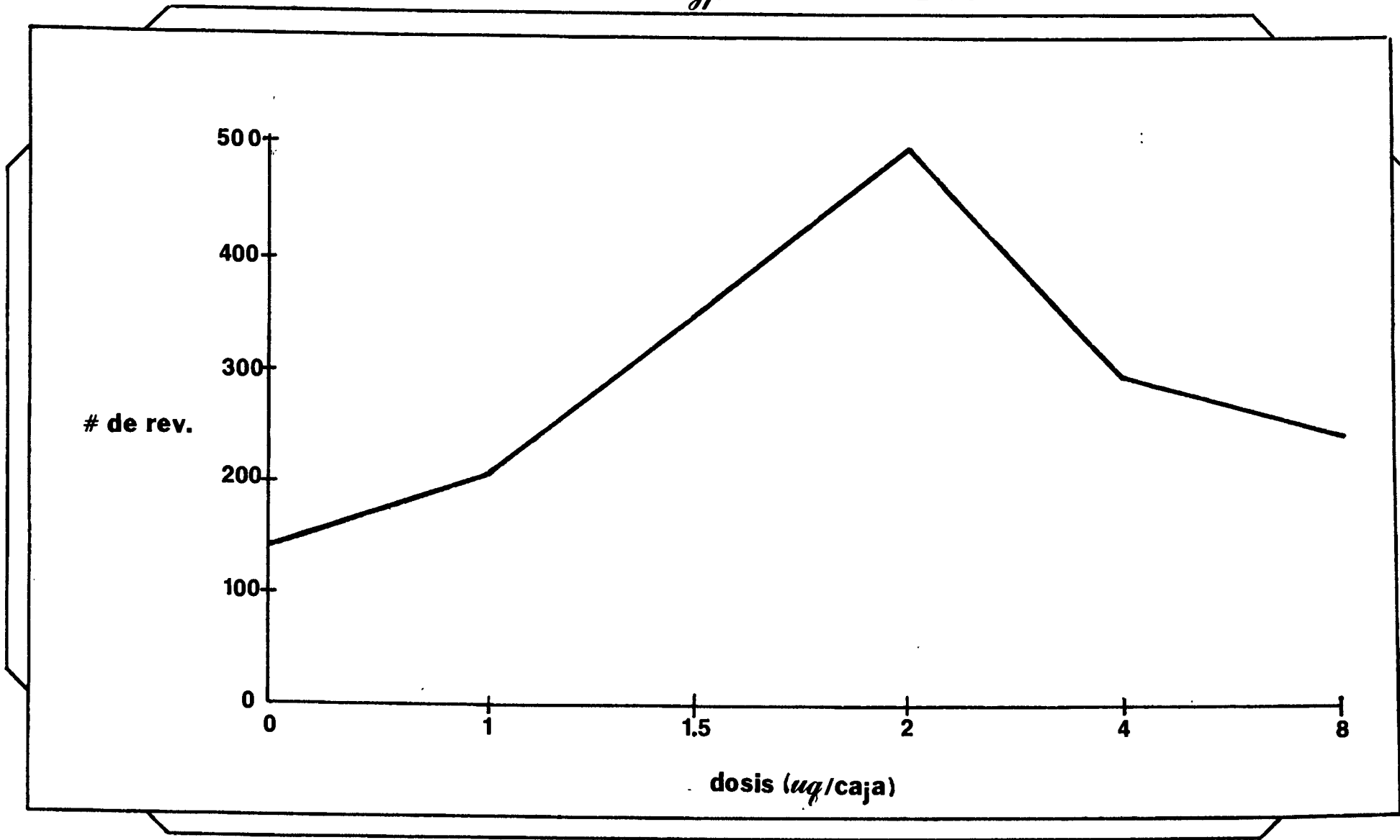


Fig.12 Curva dosis respuesta 1NP vs. *S. typhimurium* YG 1024

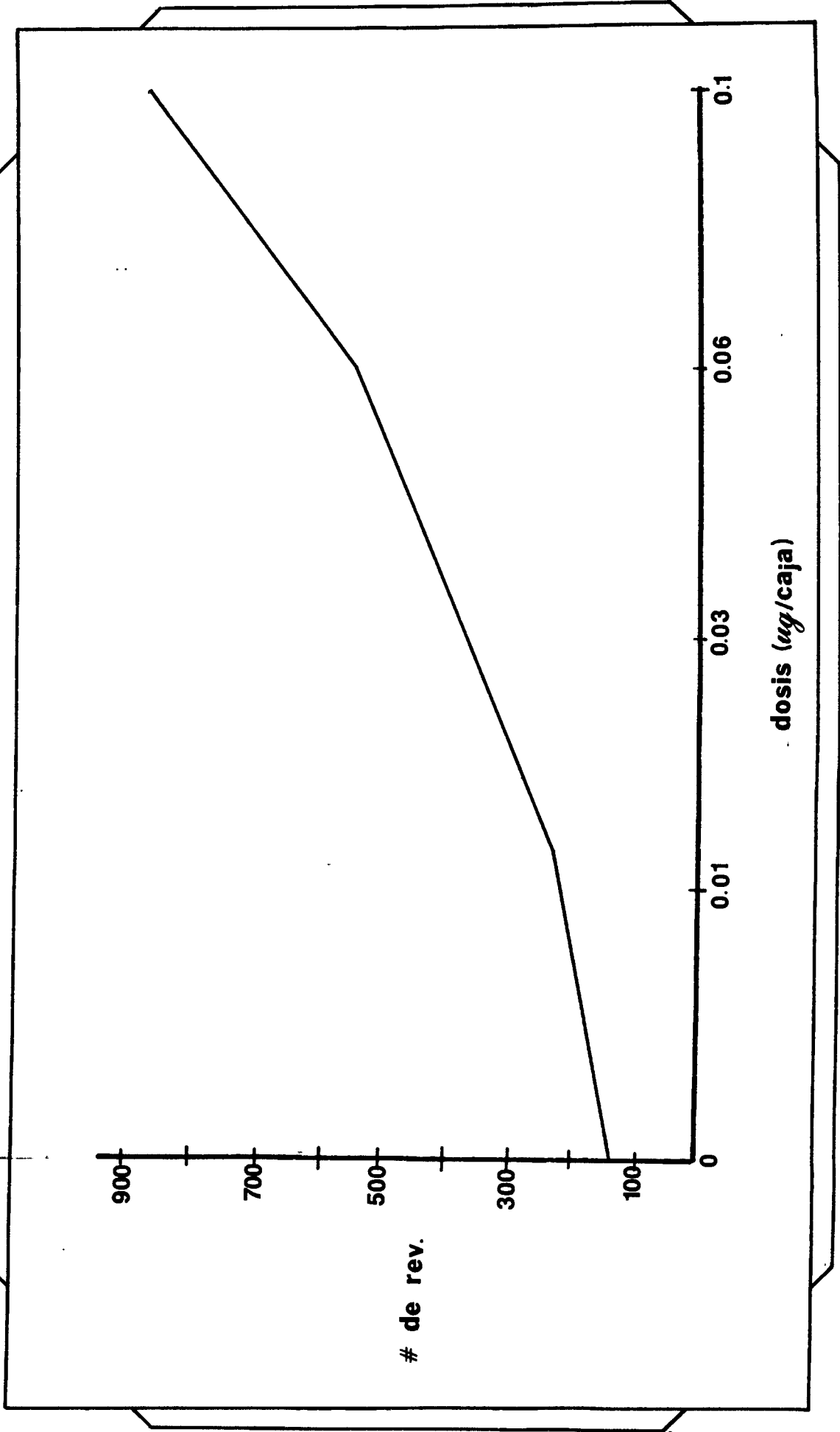
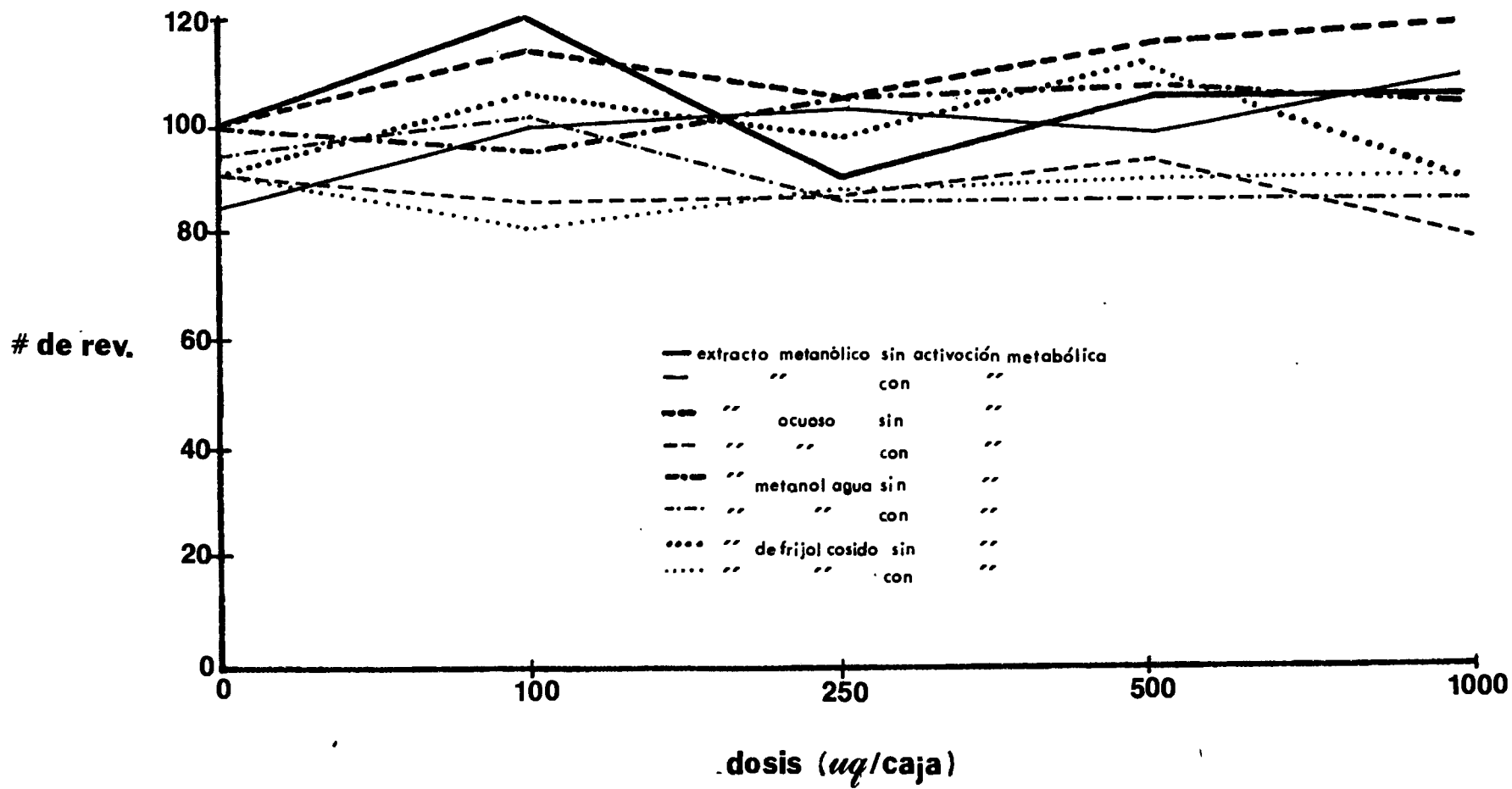


Fig.13 Mutagénesis de los extractos de frijol flor de mayo en *Salmonella typhimurium*



rango preestablecido (de 90-150 revertantes por caja) bajo las condiciones de trabajo imperantes; de lo cual se deduce que los extractos no son capaces de producir mutación sobre la bacteria a las concentraciones usadas. Cada experimento se realizó por triplicado para cada extracto de frijol utilizadas, probando también su capacidad mutagénica y toxicidad con y sin activación metabólica.

E. Sensibilidad a los antimutágenos (curvas dosis respuesta).

El comportamiento de las colonias revertantes producidas por los dos mutágenos ambientales benzo(a)pireno y 1-nitropireno se pone de manifiesto en las Figs 14 y 15 respectivamente al aumentar la concentración de ácido elágico, usado como control positivo de antimutagénesis. En dichas figuras se observó que al aplicar 300 μg por caja del ácido elágico se redujo en un 55% y en un 85% la producción de colonias revertantes para 1-nitropireno y benzo(a)pireno, respectivamente. Es importante hacer notar que cuando se utilizaron 500 μg de ácido elágico por caja, se observó toxicidad en el caso del benzo(a)pireno, no sucediendo lo mismo con el 1-nitropireno. Con esto se probó la sensibilidad de la cepa YG-1024 de *S. typhimurium* para las pruebas finales de antimutagénesis.

F. Antimutagénesis de los extractos metanólico, metanol-agua 50%, acuoso y de cocido de frijol.

Antes de presentar los resultados obtenidos es importante resaltar la importancia de las pruebas preliminares ya que al ensayar la no mutagenicidad y la no toxicidad de los extractos así como la sensibilidad a los mutágenos y antimutágenos se asegura

Fig.14 Efecto antimutagénico del ácido elálgico vs 2 μ g. de benzo(a)pireno en *S.*
tymphimurium YG 1024

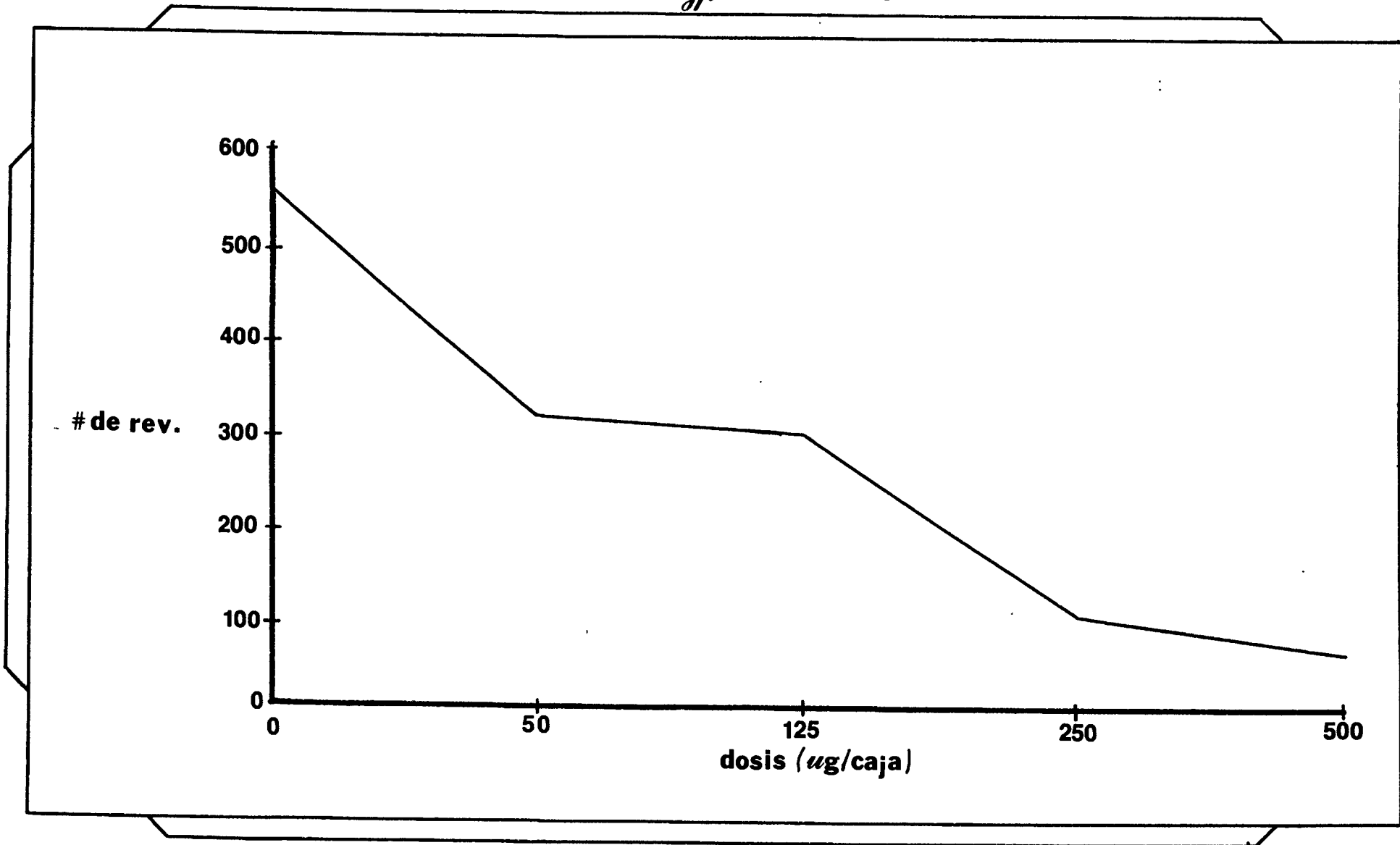
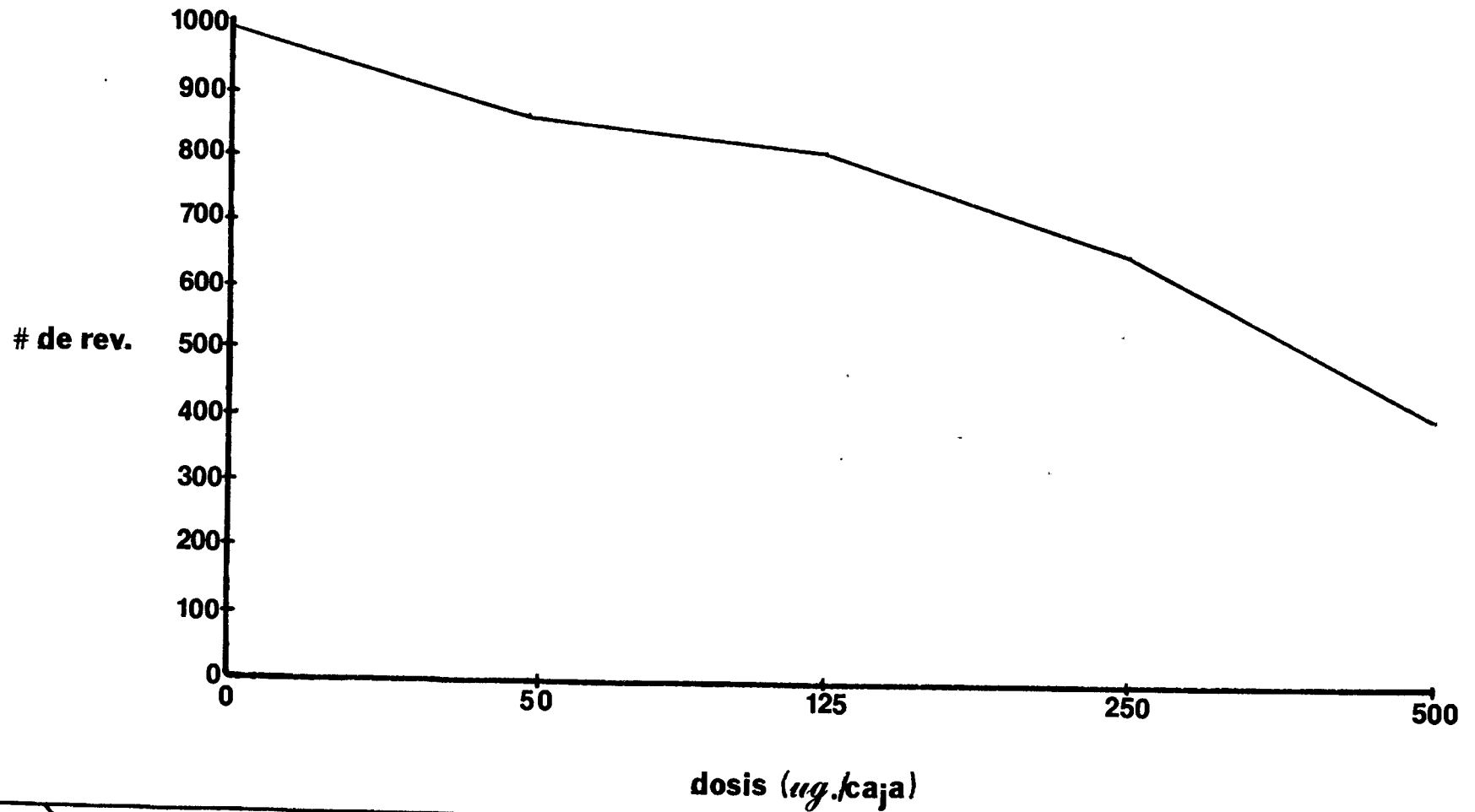


Fig.15 Efecto antimutagénico del ácido elàgico vs 0.1 μ g de 1-Nitropireno



que dichos resultados sean confiables.

Los Cuadros 8 y 9 presentan el comportamiento antimutagénico de los diferentes extractos y las cantidades que se probaron de los mismos. La reversión espontánea sin adicionar ningún compuesto fue de 90 a 150 revertantes. En el caso del B(a)P se requirió adicionar la fracción S-9 para lograr activar el sistema metabólico. Para todos los extractos se ensayó la concentración máxima utilizada con el fin de observar el efecto sobre la reversión espontánea. Se vió que ningún extracto produjo toxicidad a la máxima concentración usada, cabe hacer notar que se experimentaron diferentes concentraciones del extracto en base a su contenido en mg-equivalentes de catequina.

En los mismos cuadros se indica el número de bacterias sobrevivientes cuando no se agregó extracto de frijol; es importante notar que aún cuando se incrementó la cantidad de cada extracto, en ningún caso existió muerte, manteniéndose sin diferencia significativa el número de bacterias presentes.

Es obvio en el caso de los extractos metanólico, metanol-agua y acuoso que el número de bacterias revertantes disminuyó al incrementarse la cantidad del extracto y manteniendo constante la concentración del mutágeno B(a)P. Por otro lado no existió inhibición de la mutagénesis con el extracto de frijol cocido.

En los Cuadros 10 y 11 se ve el mismo comportamiento de disminución en la actividad mutagénica de una concentración constante del 1-nitropireno para los extractos metanólico y para el frijol cocido únicamente.

CUADRO 8. COMPORTAMIENTO ANTIMUTAGENICO DE LOS EXTRACTOS DEL FRIJOL
CON EL BENZO(A)PIRENO' (Metanólico y metanol-agua).

METANOLICO

extracto/equivalente en catequina (μ g)	revertantes x	sobrevivientes x	inhibición x (%)
0 / 0	618	110	0
307 /250	326	143	60
615 /500	266	131	72
920 /750	235	152	78
1076 /875	108	150	103
á.elágico	112	117	102

En este caso la reversion espontanea promedio fue de 89 hac/caja

METANOL-AGUA al 50%

0 / 0	542	433	0
150 /63	428	480	22
300 /125	415	496	24
600 /250	156	452	82
1200 /500	104	486	93
á. elágico	144	556	84

1 Se utilizo una concentracion de B(a)P de 2 ug por caja.

Durante este ensayo la reversion espontanea promedio fue 89 hac/caja.

CUADRO 9 COMPORTAMIENTO ANTIMUTAGENICO DE LOS EXTRACTOS DE FRIJOL CON BENZO(A)PIRENO (Acuoso y frijol cocido)

ACUOSO				
extracto/equivalente en catequina μg	revertantes x	sobrevivientes x	inhibición x (%)	
0 / 0	439	98	0	
460 / 50	367	120	11	
920 /125	178	106	70	
2300/250	91	108	97	
4600/500	64	108	106	
á. elágico	73	100	103	

la reversion espontanea fue de 90 bacterias/caja

Extracto(μg)	FRJOL COCIDO			
0	644	94	0	
1000	633	102	0	
2500	580	97	0	
5000	690	96	0	
7500	673	92	0	
á. elágico	83	98	100	

la reversion espontanea fue de 95 bacterias/caja

CUADRO 10 COMPORTAMIENTO ANTIMUTAGENICO DE LOS EXTRACTOS DE FRIJOL
 CON I-NITROPIRENO' (Extractos metanólico y metanol-agua).

METANOLICO

extracto/equivalente en catequina µg	revertantes x	sobrevivientes x	inhibición x (%)
0 / 0	844	251	0
500 / 406	780	249	7
750 / 609	643	265	23
1000/812	590	262	30
1125/914	550	270	35
á. elágico	140	249	83

La reversión espontánea fue de 120 bacterias/caja

METANOL-AGUA

0 / 0	1072	418	0
120 / 63	1382	335	0
300 / 125	1310	382	0
600 / 250	1180	388	0
1200/ 500	1393	310	0
á. elágico	150	416	86

Se usó una concentración de 0.1 µg de I-NP.

CUADRO.11 COMPORTAMIENTO ANTIMUTAGENICO DE LOS EXTRACTOS DE FRIJOL
CON 1- NITROPIRENO' (Acuoso y frijol cocido).

ACUOSO			
Extracto/Equivalente en catequina	revertantes x	sobrevivientes x	inhibición x
0 / 0	1800	115	0
460 / 50	2041	89	0
920 / 100	1810	81	0
2300/ 250	2252	103	0
4600/ 500	2221	96	0
á. elágico	449	116	75

Se uso una concentracion de 0.1 ug de 1- NP

Extracto(μ g)	FRIJOL COCIDO		
0	858	292	0
1000	710	300	17
2500	660	306	23
5000	586	293	31
7500	491	310	45
á. elágico	308	290	66

1. Se uso una concentracion de 0.1ug de 1-nitropireno

Los extractos obtenidos con el metanol, metanol-agua y acuoso mostraron tener actividad antimutagénica en contra del mutágeno y carcinógeno benzo(a)pireno (Figs. 16 a 18.) Los tres extractos fueron capaces de inhibir hasta en un 90-100 % el efecto ocasionado por este compuesto (Fig. 20). La mayor inhibición fue lograda por el extracto metanólico, seguido por el metanol-agua y por último el acuoso. El primero provocó una inhibición del 100% con 1075 microgramos de extracto mientras que los restantes requirieron de 1200 y 4600 microgramos respectivamente (Fig.20).

El extracto de frijol cocido, por su parte, no tuvo ningún efecto detectable bajo las condiciones en que se realizaron los experimentos para inhibir la mutagenicidad del benzo(a)pireno (19 y 20). Los datos que se presentan en estas figuras corresponden a las concentraciones en μg de extracto en los cuales se observa que provocaron un efecto antimutagénico más grande. Estos resultados sugieren que los factores antimutagénicos presentes en el frijol Flor de Mayo, son fenoles condensados de peso molecular relativamente bajo y fácilmente extraíbles, con metanol, así como fenoles hidrolizables de bajo peso molecular presentes en el extracto acuoso.

Con respecto a la modulación de la mutagenicidad del 1-nitropireno, los resultados al aplicar los extractos, se presentan en las Figs 21 a 24. En general, la capacidad, de los extractos para inhibir la acción de este mutágeno fue menor comparada con la capacidad de inhibición de la genotoxicidad del benzo(a)pireno. El extracto de frijol cocido mostró una inhibición del 45 % a la máxima concentración usada (Fig.25) seguido por un 35 % de inhibición

Fig.16 Comportamiento antimutagénico del extracto metanólico de frijol flor de mayo ante B(a)P

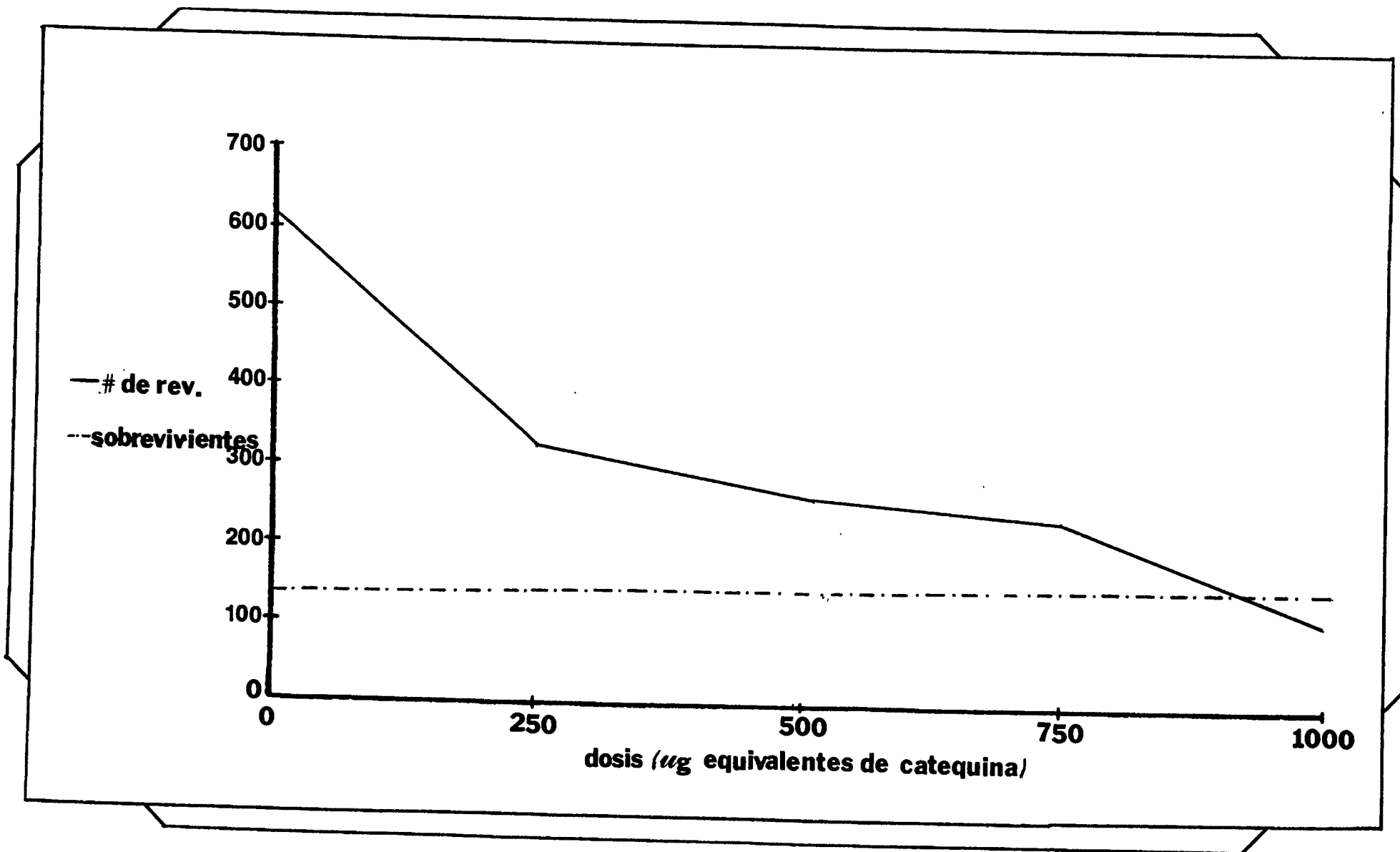


Fig.17 Comportamiento antimutagénico del extracto metanol-agua de frijol flor de mayo ante B(a)P

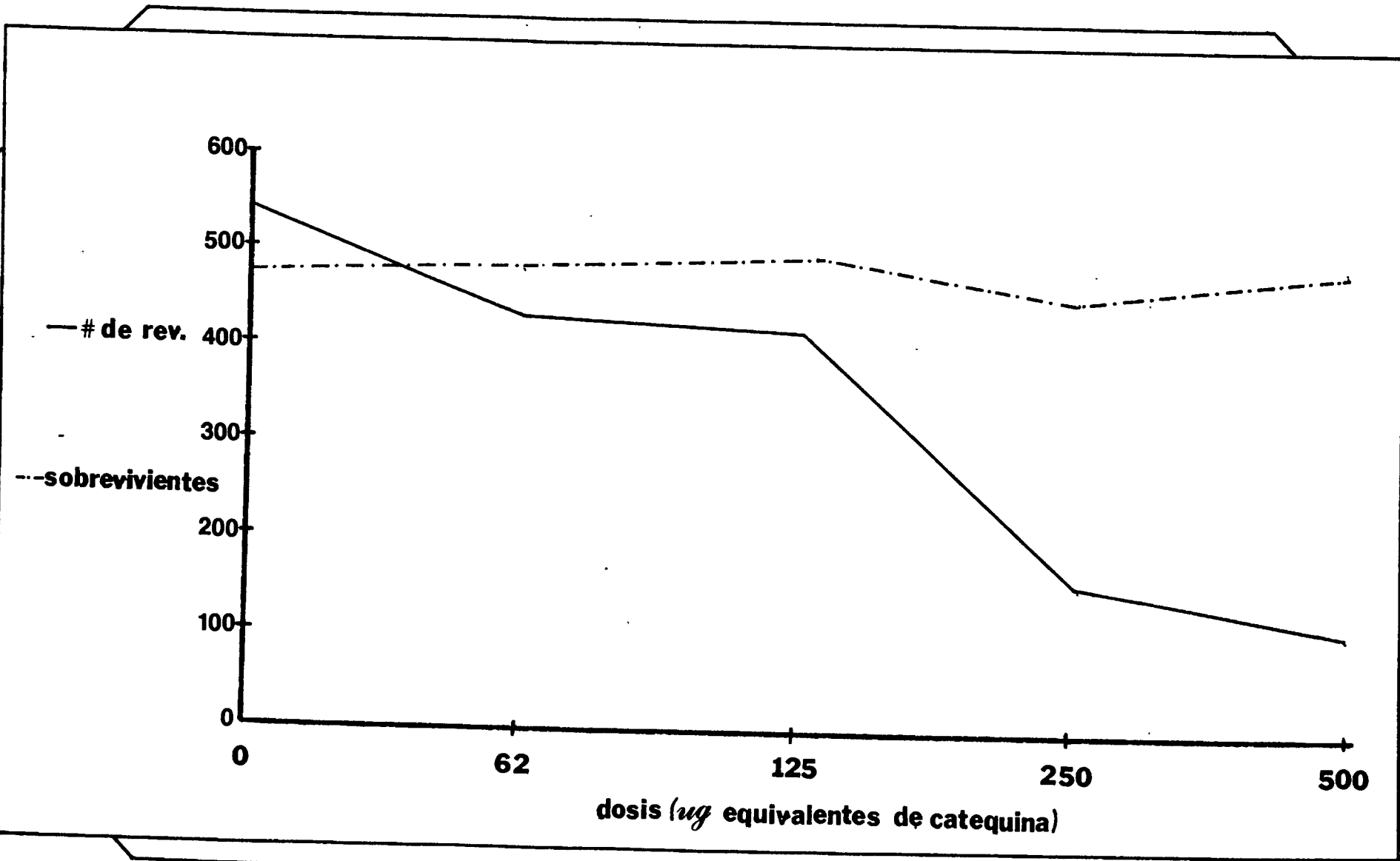


Fig.18 Comportamiento antimutagénico del extracto acuoso del frijol flor de mayo ante B(a)P

74

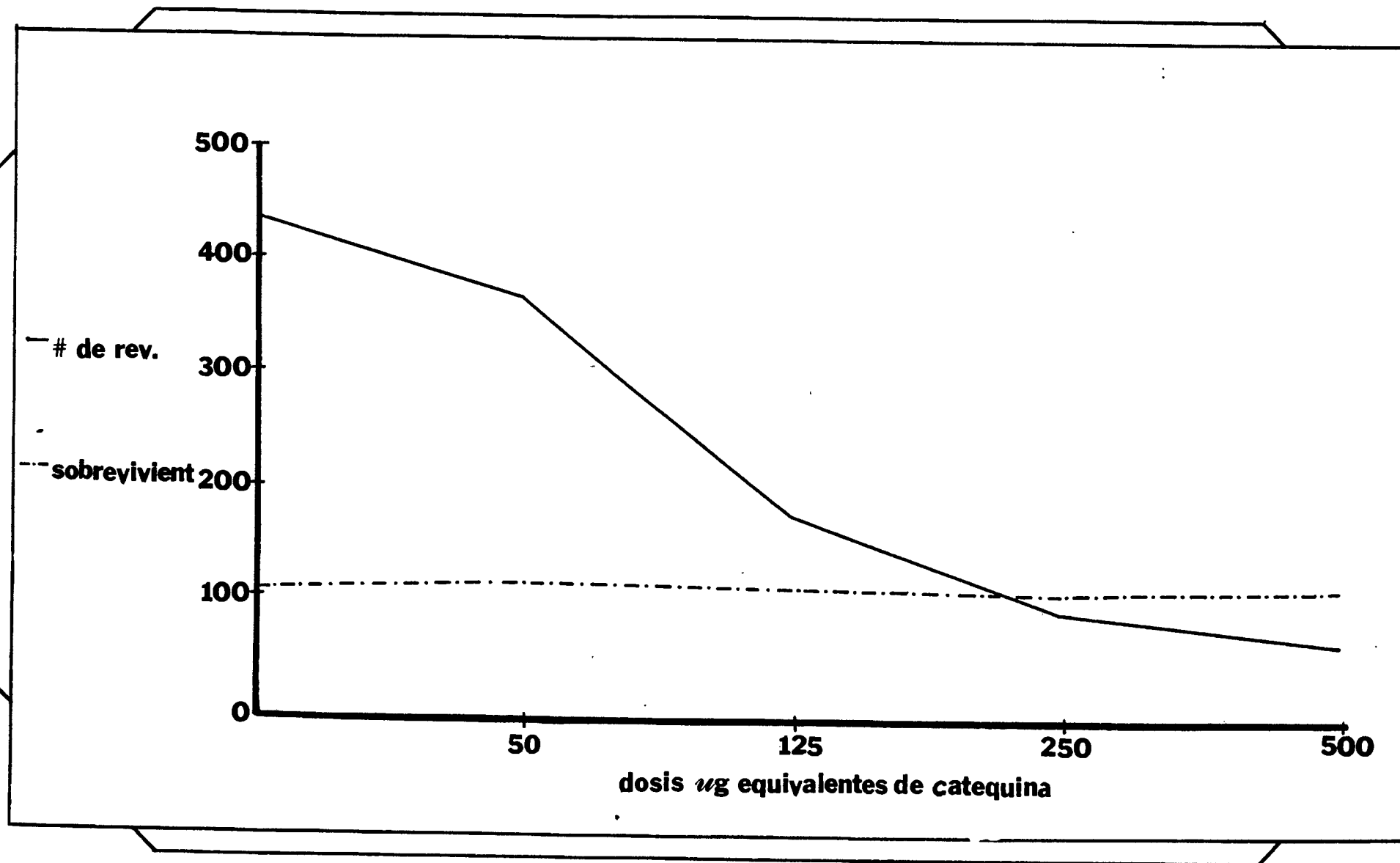


Fig.19 Comportamiento antimutagenico del extracto de frijol cocido flor de mayo ante B(a)P

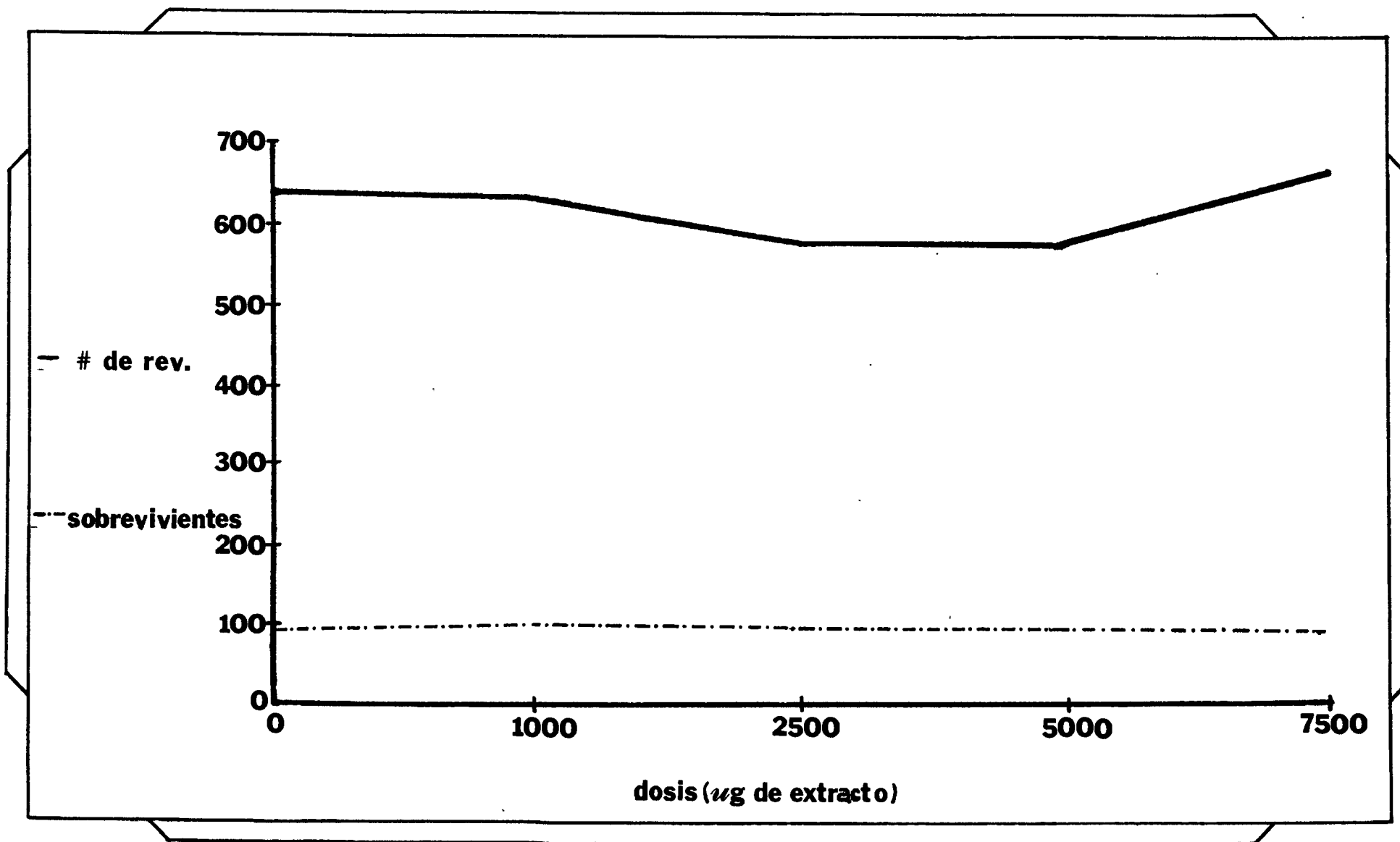


Fig.20 Inhibición de la mutagénesis del B(a)p por los extractos de frijol Flor de mayo

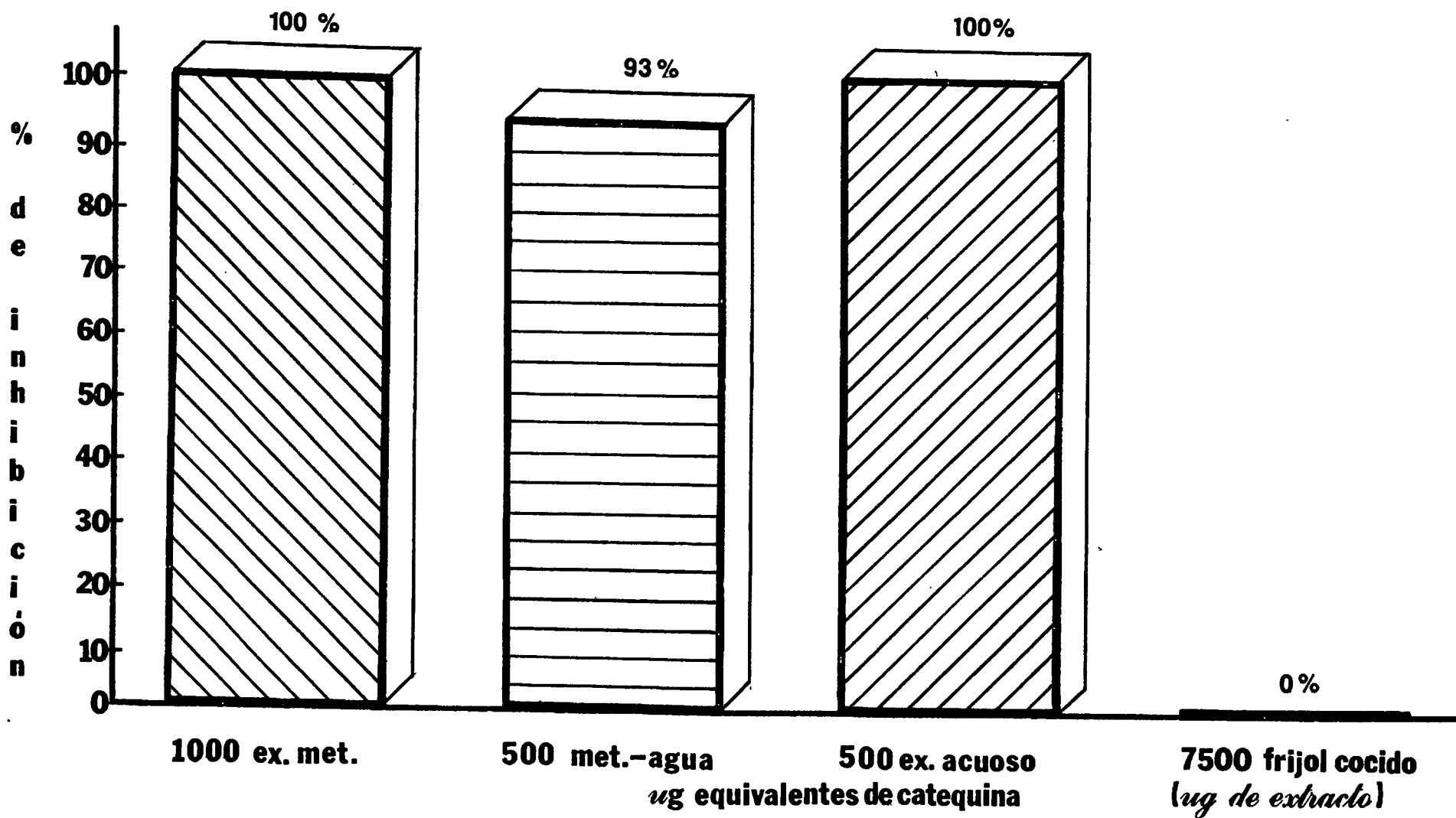


Fig.21 Comportamiento antimutagénico del extracto metanólico de frijol flor de mayo ante 1-NP

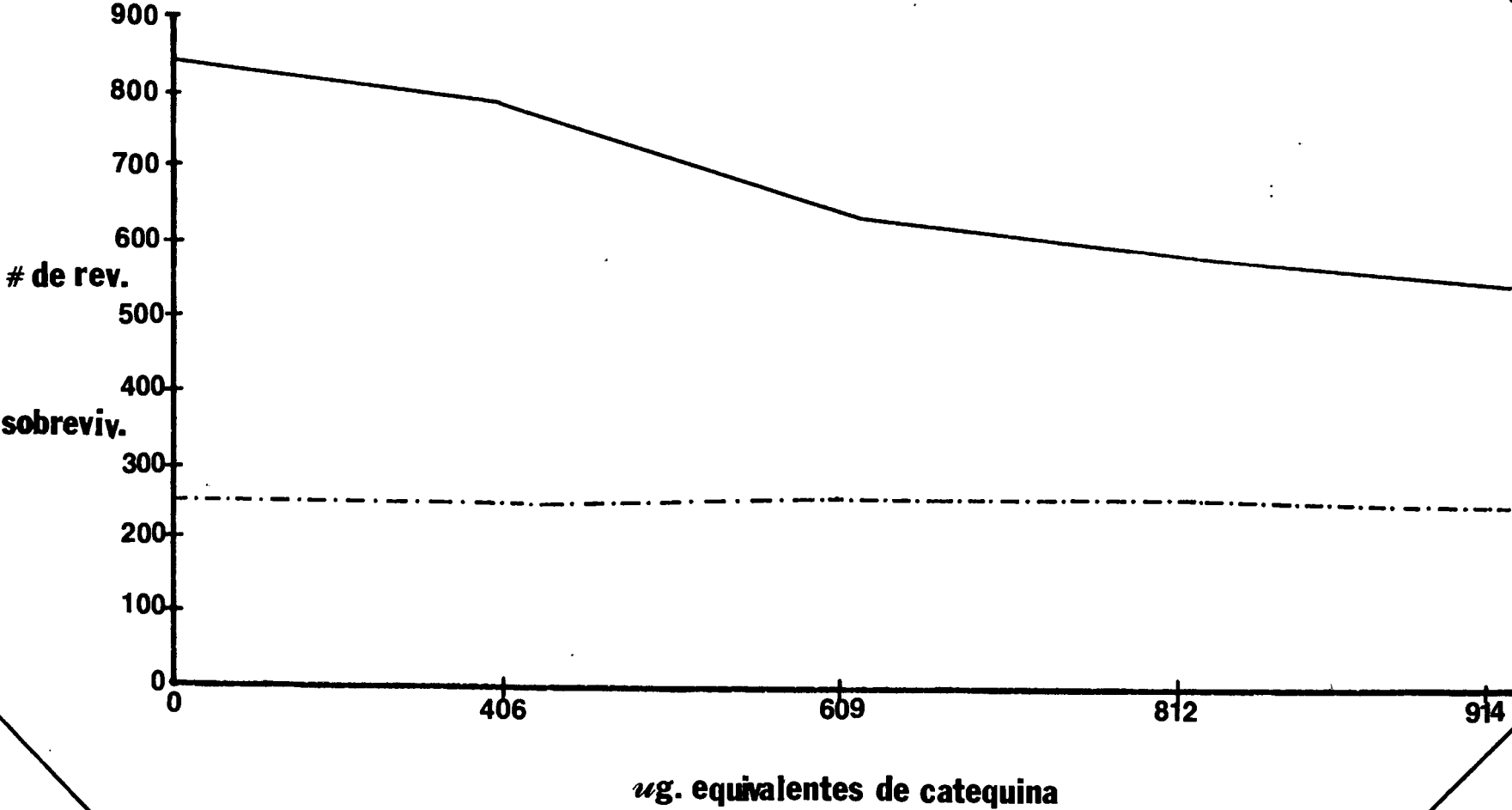


Fig.22 Comportamiento del extracto metanol-agua de frijol flor de mayo ante 1-Np

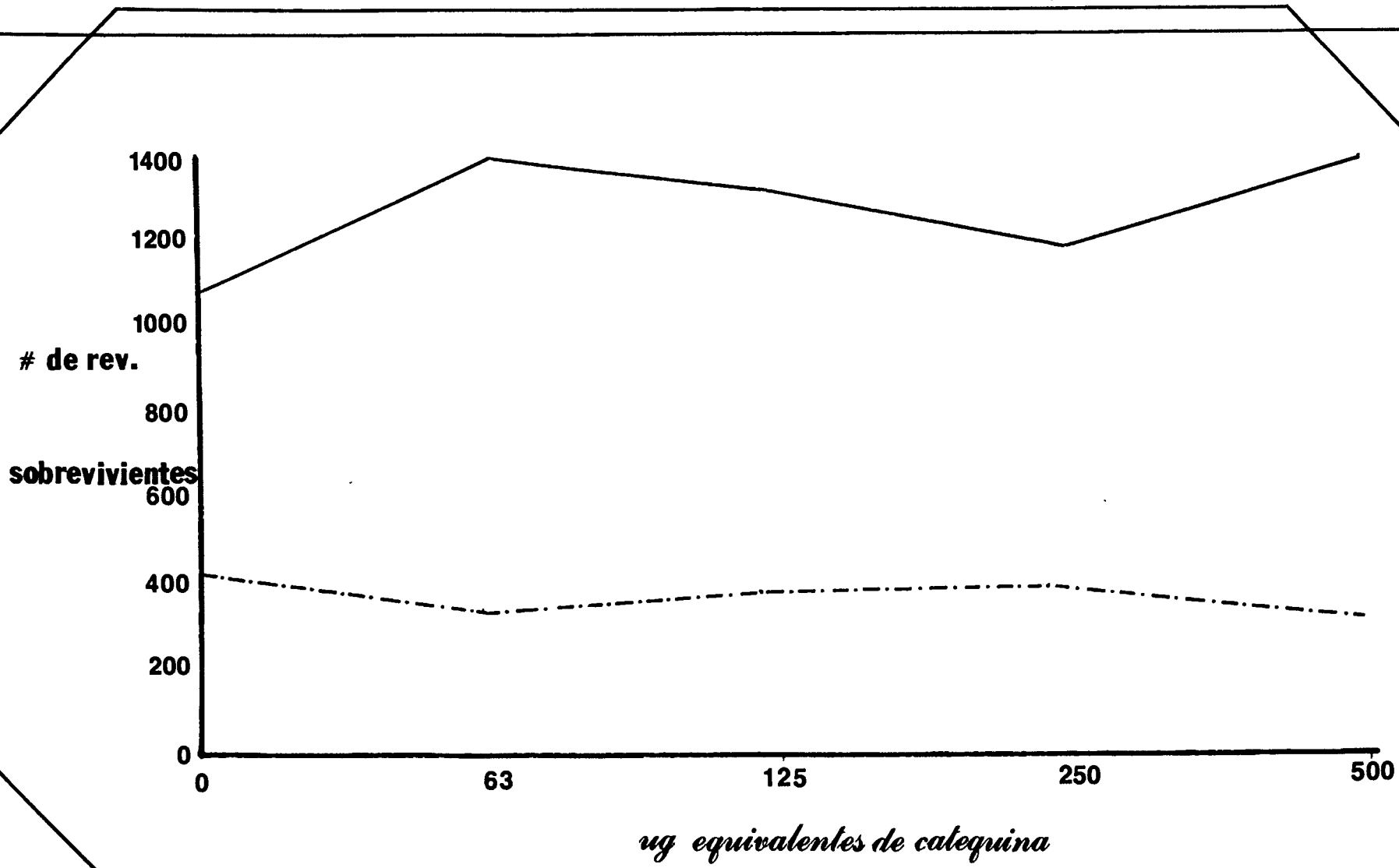


Fig.23 Comportamiento antimutagenico del extracto acuoso de frijol flor de mayo ante 1-Np

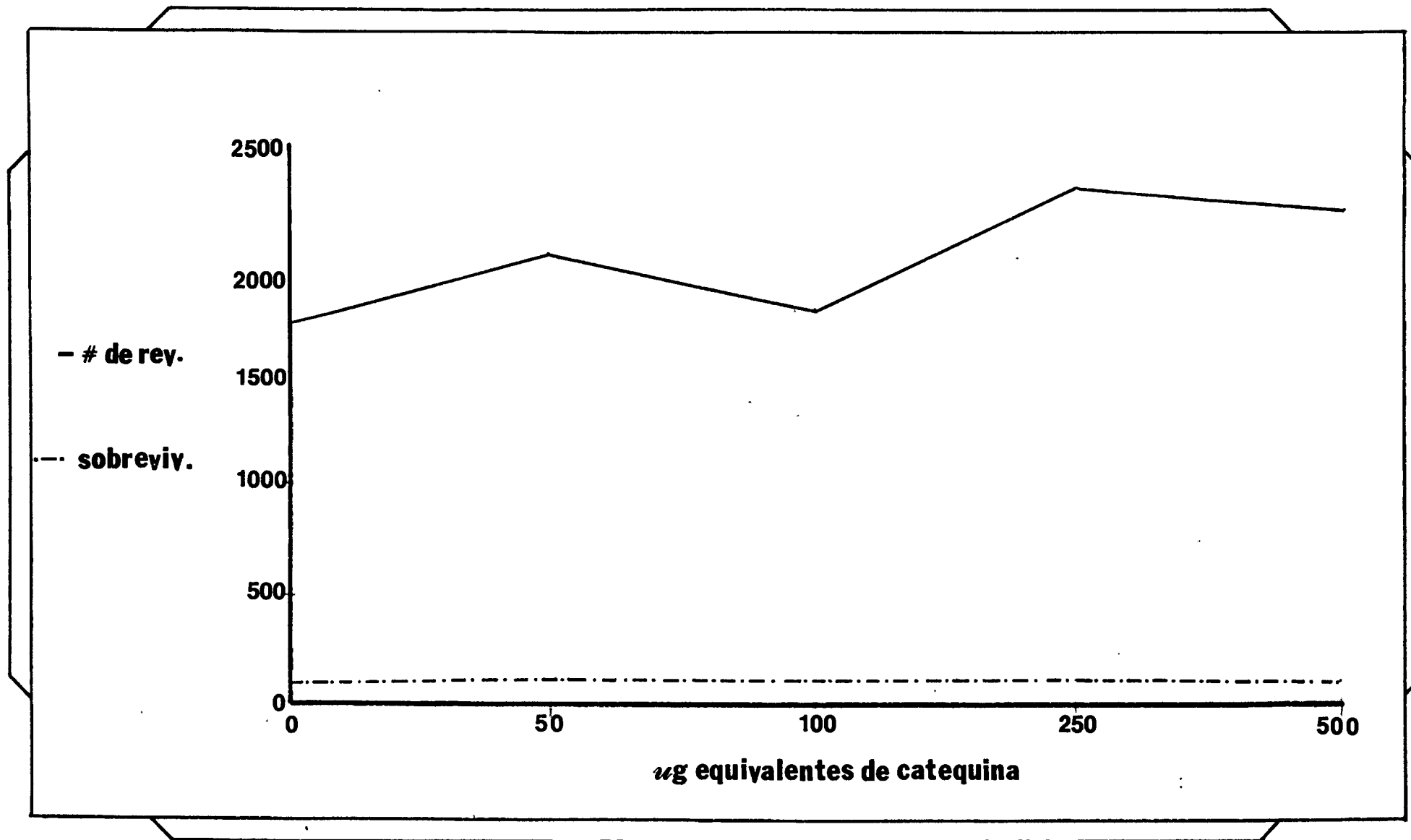


Fig.24 Comportamiento antimutagénico del extracto de frijol cocido flor de mayo ante 1-Np

80

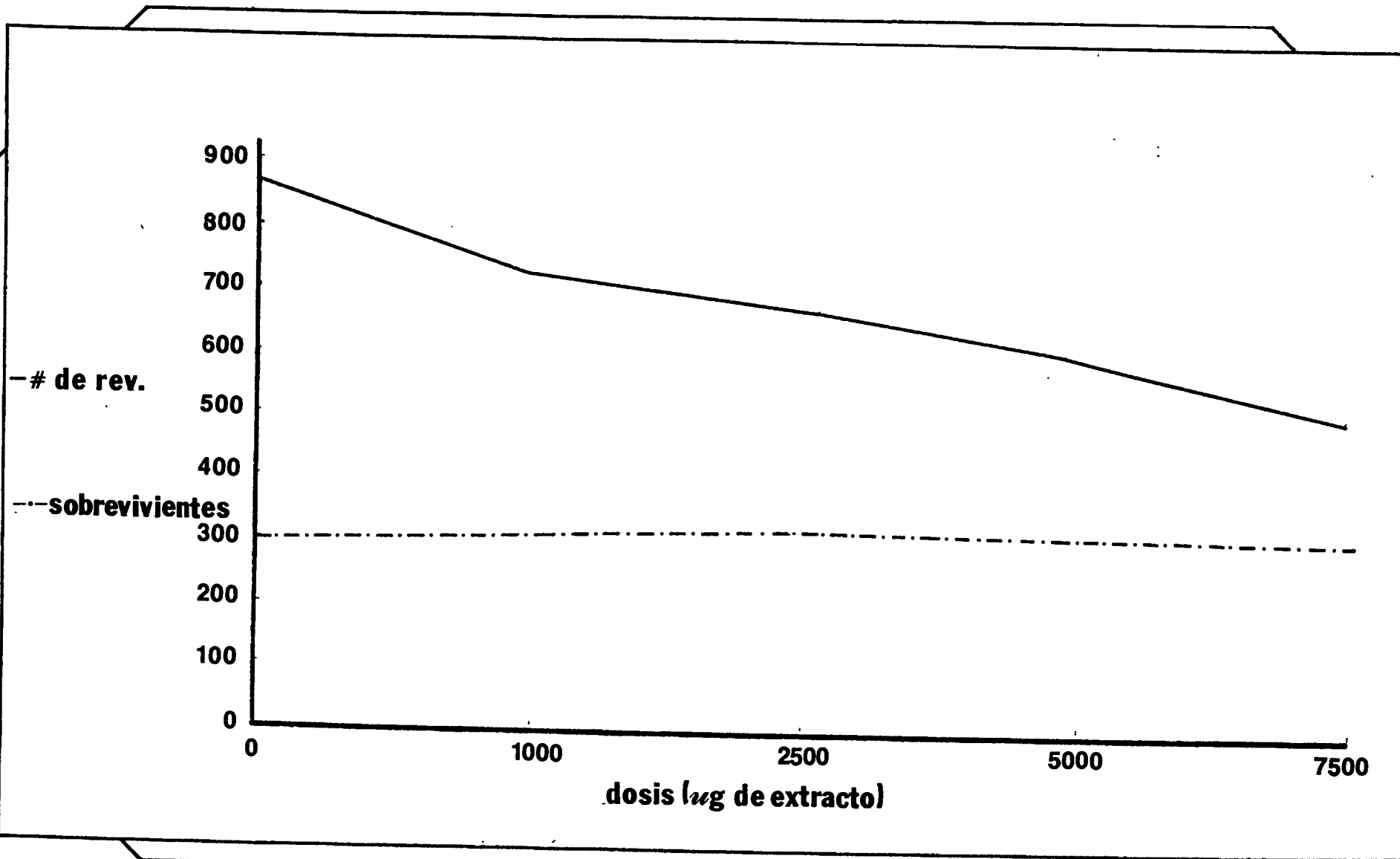
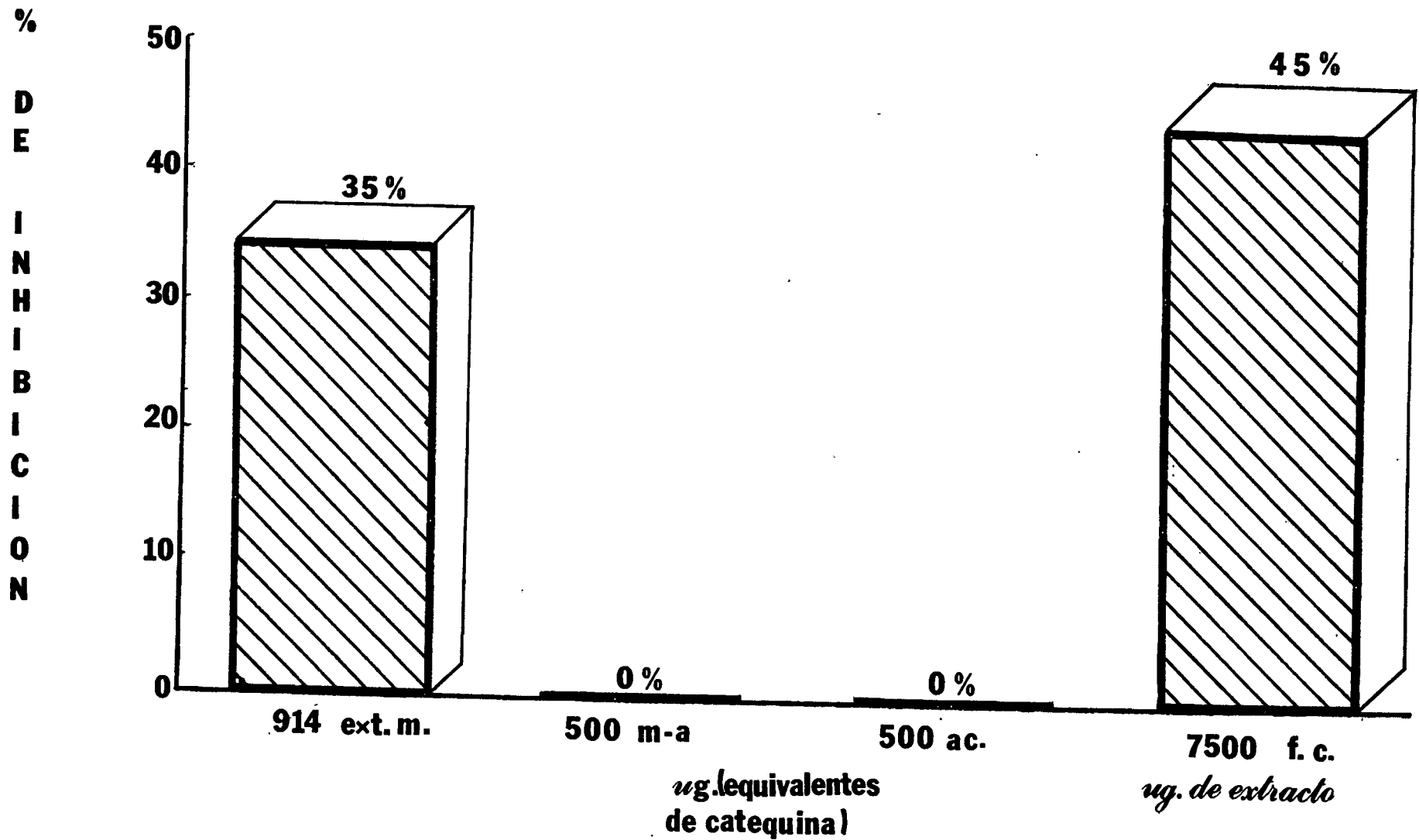


Fig.25 Inhibición de la mutagénesis del 1-Np por los extractos de frijol variedad flor de mayo



provocada por el extracto metanólico. Es importante mencionar que en el frijol cocido se encuentran proteínas, fibra, carbohidratos, a los cuales pudiera atribuírseles el efecto inhibitorio contra 1-nitopireno. Los extractos acuoso y metanol-agua no tuvieron efecto alguno sobre la inhibición del 1-nitropireno.

En el Cuadro 12 se presenta un resumen de la potencia antimutagénica de los extractos obtenidos en base a 500 μg de catequina equivalente para los extractos en los que se detectaron fenoles libres, en el caso del extracto de frijol cocido se hace la observación de que la potencia es en base a la cantidad de extracto empleada. El extracto que presentó mayor potencia antimutagénica fue el de metanol-agua seguido por el acuoso y el metanólico, se tuvieron valores de 0.8760, 0.7411 y 0.5829 revertantes/ μg de catequina equivalente respectivamente ante el benzo(a)pireno, el frijol cocido por su parte no presentó un potencial antimutagénico. Para la inhibición del 1-nitropireno el extracto de frijol cocido tuvo una potencia de inhibición de 0.0489 revertantes/ μg de extracto y el extracto metanólico volvió a figurar con 0.3214 revertantes/ μg de catequina equivalente.

Se eligieron al 1-nitopireno y al benzo(a)pireno como controles positivos de mutagénesis debido a que ambos son mutágenos que se encuentran presentes en el medio y que tienen una interacción constante con poblaciones humanas. El primero es producto de la combustión de gasolina, diesel, la madera y otras materias de origen orgánico. Además, se puede formar durante los procesos de elaboración de alimentos como son por ejemplo el cocinado de los productos carnicos en general, ya sea a fuego directo o por freído.

Cuadro 12 POTENCIA ANTIMUTAGENICA DE LOS EXTRACTOS DE FRIJOL
 (NO REVERTANTES /ug DE CATEQUINA)

EXTRACTO	B(a)P	1-Np
METANOLICO	0.5829	0.3214
METANOL AGUA	0.8760	0
ACUOSO	0.7411	0
COCIDO	--	0.0489 ¹

¹ No. de revertantes/ug de extracto.

Las vías de exposición a este tipo de tóxicos son varias entre las que se tiene la oral, la dérmica, por inhalación, etc. por lo que representan un riesgo constante para las poblaciones expuestas.

Los nitropirenos, cuyo representante de mayor abundancia en la atmósfera es el 1-nitropireno, son también productos resultantes de la combustión de los fósiles de la materia orgánica. Se encuentran presentes en casi todas las atmósferas urbanas analizadas así como en varios tipos de alimentos.

No existe evidencia de que los fenoles causen cancer en humanos los fenoles como los catecoles a través de diferentes procesos de biotransformación generan O_2^- , H_2O_2 en función de la dosis. Estos procesos dan lugar a mutagenicidad en procarióticos pero no en células de mamíferos. Además los fenoles actúan como eficientes atrapadores de compuestos nitrosos como se pudo observar en la presente investigación.

Fenoles y polifenoles:

- a) Inducen detoxificación por sistemas enzimáticos.
- b) Actúan como atrapadores de electrófilos.
- c) Terminan con las reacciones en cadena de radicales y así disminuyen su efecto genotóxico.

En el presente estudio se observan estos efectos para en caso de ácido elálgico lo cual se reflejó como una disminución en la mutagenicidad del benzo(a)pireno y 1-nitropireno.

En el medio ambiente se encuentran compuestos fenólicos que presentan diversas estructuras químicas. Estos compuestos son metabolizados por sistemas enzimáticos presentes en mamíferos, que dan lugar a conjugados como ésteres o derivados del ácido glucurónico. En términos generales se puede decir que los fenoles no

causan efectos adversos a la células de mamíferos ya que cuentan con mecanismos de defensa que los detoxifican, únicamente en el caso de utilizar niveles excesivos de estos compuestos pueden dar lugar a quinonas las cuales reaccionan con proteínas y dan lugar a toxicidad. Por otro lado los fenoles más complejos como los que están presentes en vegetales tienen efecto inhibitorio de procesos carcinogénicos específicos. En el contexto de la salud humana los fenoles son un grupo de compuestos presentes en alimentos que actúan como antioxidantes y en esta forma ejercen su efecto protector.

Por lo antes expuesto, fue importante estudiar posibles quimioprotectores que antagonizan los efectos de tóxicos presentes en alimentos, sustancias como las aquí estudiadas que están presentes en la dieta de la mayor parte de la población mexicana.

Aún cuando las concentraciones de los compuestos antimutagénicos de origen natural se encuentran en concentraciones bajas, en el caso particular de la dieta básica, como el frijol, el maíz, el chile etc. los componentes que aportan son en forma crónica, es decir, pequeñas cantidades diariamente. Por ejemplo, se conoce ampliamente la capacidad antimutagénica de la clorofila y los carotenoides, dos moléculas abundantes en frutas y verduras; sin embargo se ha demostrado en animales experimentales que la cantidad efectiva que se requiere en una sola ingesta representa una cantidad muy alta en el consumo diario de estos alimentos. Además, el proceso de elaboración de los alimentos, puede inactivar a los antimutágenos, como se vio en el caso del frijol cocido que muestra una actividad parcial y solamente en contra de 1-nitropireno.

Una estrategia que podría usarse en el caso de identificar compuestos antimutagénicos en alimentos, sería el aislamiento de los principios activos en forma pura y poderlos ofrecer a la población

como un complemento dietario.

Los ensayos *in vitro*, como el utilizado en el presente trabajo, puede ser de gran ayuda para la identificación primaria de moléculas con capacidad protectora así como para su aislamiento de mezclas complejas constituídas por los alimentos de consumo diario.

Los resultados de la presente investigación demostraron que el ácido elágico es un potente antagonista de los efectos biológicos adversos de dos mutágenos comunes en el ambiente y sugiere que estos fenoles, presentes en forma natural en alimentos de origen vegetal de alto consumo en la dieta de humanos puede inhibir su efecto toxicológico.

Se requiere efectuar más estudios para conocer sobre el efecto anticarcinogénico de estos compuestos en células humanas.

El presente proyecto de investigación es el inicio del establecimiento de un programa para la detección de antimutágenos en alimentos de elevado consumo en el estado de Querétaro.

IX CONCLUSIONES

- Se estableció claramente la mutagenicidad del benzo(a)pireno y 1-nitropireno en Salmonella typhimurium YG-1024.
- Se demostró la capacidad antimutagénica del ácido elágico, los extractos acuoso, metanólico y metanol-agua de la testa de frijol Flor de Mayo sobre el benzo(a)pireno.
- Se demostró la capacidad antimutagénica del ácido elágico, de los extractos de frijol cocido y del extracto metanólico sobre 1-nitropireno.
- Los fenoles vegetales son activos contra mutágenos y aromáticos que se encuentran como contaminantes ambientales.
- Ciertos fenoles vegetales, como los que se encuentran en la testa del frijol, con anillos aromático, con uno o más sustituyentes insaturados u otro anillo aromático y con uno o más grupos fenólicos, pueden actuar como eficientes inhibidores de mutágenos químicos.

X BIBLIOGRAFIA

- Ames, B. N. J. Mc Cann y E. Yamasaki (1975). Methods for detecting carcinogenes and mutagens whit the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat.res.* 31: 347-364.
- Ames, B. N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens: Oxigen radidicals and degenerative diseases. *Science* 221:1256-1264.
- Au, X. (1992) Inhibition of tobacco-specific-nitrosamine-induced lung tumorgenesis in A/J mice by green tea and its major polyphenol as antioxidants. *Cancer Res.* 52:3875-3879.
- Barroga C. F., A. C. ,Laviera, y E. N. Mendoza (1985 Poliphenols in mung bean vigna radiata). Determination and removal. *J. Agric. Food Chem.* 36: 1577.
- Bhattacharya, R. K. (1989). Modulation of mutagenicity by plant flavonoids. *Environ. Mol. Mutagen* 14 (suppl 15):21.
- Birt, D. F. y A. Bresnick (1988). Chemoprevention by non nutrient vegetables and fruits. In: *Human Nutritions: A comprehensive treatise*; Alfin- states, and Knotchevsky, Eds. Plenum Press, New York.
- Bronzetti, G (1990) Antimutagenic effects of clorophyllin. In *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II*, ed Y Kuroda, D.

M Shankel and M.d Waters, pp 463-468. Plenum Press, N.Y.

Clarke, C. H. y Shankel, D. M. (1988). Antimutagens againts spontaneius and induced reversion of lac 2 Frameshift mutation in E. coli K-12 strain ND-160. Mutat. res.202:19-23.

De Flora y C. Ramel (1988). Mechanims of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Cassification and overview. Mutat. Res. 202(2):285-306.

Desphande, S. S. y M Cheryan (1987). Determination of Phenolic compounds of dry beans using vainillin redox and precipitations assays. J. Food Sci. 52:332.

Ferguson, L. R. P. Van Zijil, W. D. Holloway y W. T. Jones (1985). Condensed tannins induced micronuclei in cultured V79 Chinese hamster. Mutat. Res. 158: 89-95.

Guevara, A. P. Limm-Sylianco, C. Dayrit, F. y Finch, P. (1990). Antimutagens from momordica charantia. Mutat. Res. 230:121:126.

Graham, S. W. Shotz y P. Martino (1972). Cancer. 30:927

Hartman, P. E. y D. M. O Shankel (1990) Antimutagens and Anticarcinogens: A survey of putative interceptor molecules. Env. Mol. Mutagen 15:145-182.

Henderson, B. E. (1990). Summary report of the sixth symposium on Cancer Registries and Epidemiology in the Pacific Basin. J. Natl. Cancer Inst. 82:1186-1190.

- Hirayama, T. (1977). Changing patterns of cancer in Japan with special reference to the decrease in stomach cancer mortality. p 55-75. In: H. H. Hiatt, J. D. Watson y Jaá Winsten Eds. Origins of human cancer. Cold Spring Habor Laboratory Cold Spring N. Y.
- Huang, M. T., R. L. Chang, A. W. Wood, H. I. Newmark, J. M. Sayer, H. Yagi, D. M. Gerina y A.H. Conney (1986) Carcinogenesis 4:1631-1637.
- Itoh, S. Fuji, M. y Murayama, H. B. (1983). Antimutagenic Chalcones: Antagonizing the mutagenicity of Benzo(a)pyrene on Salmonella typhimurium. Bioch. and Biophys. Res. Communications 112: 833-842.
- Kada, T., K. Kenji, M. Satoshi, M., Tacko, y H Yukihiro. (1985). Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens. Acase of the green tea factor. Mutat. REs. !50: 127-132.
- Kada, T., T. Ivone, T. ohta y Shirasu *1986). In: D. M. Shankel, P. H. Hartman, T. Kada y A. Hollander (Eds.) Antimutagenesis and anticarcinogenesis. Mechanims. Plenum Press, New York, pp. 181-196.
- Kinsella, J. E. (1993) Possible Mechanism for the Protective Role of Antioxidants in Wine and Plant Foods. Food Technology. 47-4:85-89.
- Kumar, R. y Takao, T. (1986) Fractionation, characterization and precipitation capacity of condensed tannins from Robina pseudo acacia. L. Leaves. J. Agric. Food Chem. 34:487.

- Malkinson, A. M. (1983) Review: Putative mutagens and carcinogens
env. mut. 5:353-362.
- Modan, B. T. Barrel, F. Lubin, M. Modan, R. A. Greenberg y S.
Graham(1975). J. Nat. Canc. Inst. 55:15.
- Mukhtar, H.,D. Mukul, W. Wang, Z. Bik, D Bickers y R. Davis. (1988).
exceptional activity of tannic acid in protecting against 7,12
dimethylbenzo(a)antraceno induced skin tumorigenesis in mice. Cancer
Res. 48: 2361-2365.
- McLeod, M. N. (1974). Tanins-Their role in forage quality. Nutri.
Abstr. Rev. 11:803-815.
- McPhee, D. G. y Hafner, L. M. (1988) Antimutagenic effects of
Chemicals on mutagenesis resulting from excision of a trasposon in
S.typhimurium. Mutat. Res. 207:99-106.
- Namaki, (1990). Antioxidants/Antimutagens in Food. Food science and
Nutrition. 29:273-300.
- Newmark, H. L. (1987) Plant Phenolics as inhibitors of mutational and
precarcinogenic events. Can J. Physiol. Pharmacol 65: 461-466.
- Osawa, T.(1990). Antimutagenic heat stable antioxidants. Mutagens and
Carcinogens in the Diet. 223-238.
- Person, D. L. Y Shankel, D. M. (1983 Effects of antimutagens on

prophage induction in *E. coli* Lysogenic for lambda. *Environ. Health* 5:59-71.

Powri, W. D. Wu, C. H. y Molund V. P. (1986). Browning reaction systems as sources of mutagens and antimutagens. *Environm. Health Perspectives*. 67: 47-54.

Price, M. L. y Butler, L. G. (1987). Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *J. Agric Foo Chem*. 6:268.

Ramel, C., V. K. Alekperov, B. N. Ames, T. Kada y L. W. Wattenberg (1986). Inhibition of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis. *Mutat. Res*. 168: 47-65.

Renner, H. W. (1990). In vivo effects of single combined dietary antimutagens on mutagens-induced chromosomal aberrations. *Mutat. Res*. 244: 185-188.

Renner, H. W. (1985) Anticlastogenic effect of β -carotene in chinese hamsters. Times and dose response studies white different mutagens. *Mutat. Res* 144: 252-256.

Shankel, D. M. hartman, P. E. Kada, T. y Hollander, (1987) Synopsis of the first International Conference on antimutagenesis: Mechanisms. *Environm. Mutagenesis* 9: 87-103.

Stule, C. M., M. Lallies y C Ionides (1985). Inhibition of the

mutagenicity of aromatic amines by the plant flavonoid (+) Catechin. Cancer Res. 45: 3573-3577.

Termer, L. y V. Hoeven (1985). Antimutagenic activity of some naturally occurring compounds towards cigarette-smoke condensate and benzo(a)pyrene in the salmonella/microsome assay. Mutat. Res. 152:1-4.

Toridge, T., M Arisawa, S. Otoh, M. Fujin y H. B. Murayama. (1983). Biochem. Biophys Res. Commun. 112:833-842.

Williams, R., Sparcino C., Petensent, B. Y Bungarner, J. (1986). Comparative Characterization of organic emissions from diesel particles, coke oven mains, roofing tar vapors an cigarette smoke condensate. Intern. J. Environm. Anal. Chem. 26:27-49.

Wood, A. W., J. M. Sayer, H. L. Newmark, H. Yahi, D. P. Michaud, D. M. Jerina y A. H. Conney (1982). Mechanims of the inhibition of mutagenicity of benzo(a)pyrene. Proc. Nat. Sci 79:5122-5126.

Yen, G. C. (1991) Antimutagenic effect of Maillard Browning products obtained from amino acids and sugars. Fd. Chem. Toxic. 30-2: 127-132.

Wang, Zhi Y, (1991) Antimutagenic and Antitumorigenic activities of nordihydroguaiaretic acid. Mutat. res. 261:153-162.