




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
LICENCIATURA EN NUTRICIÓN**

**CENTRO DE ESTUDIOS ACADÉMICOS SOBRE
CONTAMINACIÓN AMBIENTAL-FAC. QUÍMICA** 

**EFFECTO INHIBITORIO DE *Spirulina* SOBRE LA
GENOTOXICIDAD INDUCIDA POR ALGUNOS ADITIVOS
COLORANTES SINTÉTICOS**

TESIS

Que para obtener el título de Licenciado en Nutrición

PRESENTA:

MA. GLORIA GOMEZ MARTINEZ

Santiago de Querétaro, marzo del 2000.



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO

FACULTAD DE CIENCIA NATURALES
LICENCIATURA EN NUTRICION

EFFECTO INHIBITORIO DE *Spirulina* SOBRE LA GENOTOXICIDAD INDUCIDA
POR ALGUNOS ADITIVOS COLORANTES SINTETICOS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
LIC. EN NUTRICION

PRESENTA

MA. GLORIA GOMEZ MARTINEZ

DIRIGIDO POR :

M. EN C. LOURDES ELVIA RUIZ FLORES

SINODALES

M. en C. Lourdes Elvia Ruiz Flores
Director

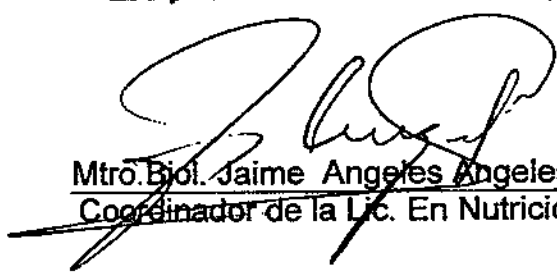
L. N. María Del Carmen Díaz Mejía
Sinodal

M. en C. Juana Isela Rojas Molina
Sinodal

M. en C. Rodolfo Gómez Ramírez
Sinodal

RODOLFO GÓMEZ R.


M.V.Z. José Rafael Moralez Cruz
Dir. de la Facultad de Ciencias Naturales


Mtro. Biol. Jaime Angeles Angeles
Coordinador de la Lic. En Nutrición

NDS 00013

TS

547.86

G 833e

E.2

A G R A D E C I M I E N T O S

A través de estas líneas me permito expresar mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que de alguna o de otra forma contribuyeron en la realización de esta tesis, cuya culminación me abre las puertas en otros ambitos de carácter académico, laboral, etc. y que sin la ayuda de alguien que nos quiere mucho no hubiera sido posible, si Señor gracias a ti, por regalarme la vida y la oportunidad de estudiar y por tantas cosas que no terminaría de contar, Bendito seas.

Un reconocimiento muy especial merecen Antonio y Celia mis padres a quienes agradezco infinitamente su apoyo moral y económico en el transcurso de mi preparación y más aún en este momento tan importante para mi y sin duda alguna para ellos que con su esfuerzo y dedicación lo he logrado.

Con respeto y admiración a la M. Elvia Ruíz por aceptarme como tesista, por su paciencia, su valioso tiempo al ser Directora de la tesis, por sus consejos, su ayuda en muchos aspectos, además de su amistad, mil gracias. A la M. Tolla quien me apoyo mucho durante el desarrollo de la tesis, por sus consejos su amistad, sinceramente le estoy muy agradecida. Con admiración a los Drs. Chamorro y Madrigal por su información enviada en sus artículos. Miguel R. en verdad muchas gracias por tu ayuda (programa estadístico, tu radio, consejos, etc.) pero sobre todo su sincera amistad, a Carmelita por ser tan amable y escanearme esas figuras. Al M. Jose Luis, le doy las gracias por su paciencia al asesorarme respecto al índice y otros datos de computación, por sus bromas y su amistad. M. Lupita Rodríguez por ser alguien que brinda su ayuda sin esperar nada a cambio, le agradezco mucho su confianza, sus consejos pero ante todo por su linda amistad. A la M. Chela por escucharme cuando era necesario. Al Dr. Francisco Prieto que aunque fue muy corta su estancia en el CEACA basto para darme cuenta que es una gran persona, en verdad muchas gracias por prestarme su computadora, por sus consejos, sus chistes, pero sobre todo esa gran amistad. A Lety M. por el teléfono, diskettes, hojas, etc. Al M. Poncho, M. Gustavo por permitirme hacer uso de las computadoras. A Don Jorge por sus servicios a los diferentes lugares donde se requería. A la M. Ivon por comprensiva, a Cheche por sus bromas,

Benjamín, M. Conchita, Toño Pérez, al M. Toño Aranda, M. Lupita Mtz., M. Lety, M. Bety, M. Maru, muchas gracias por su amistad.

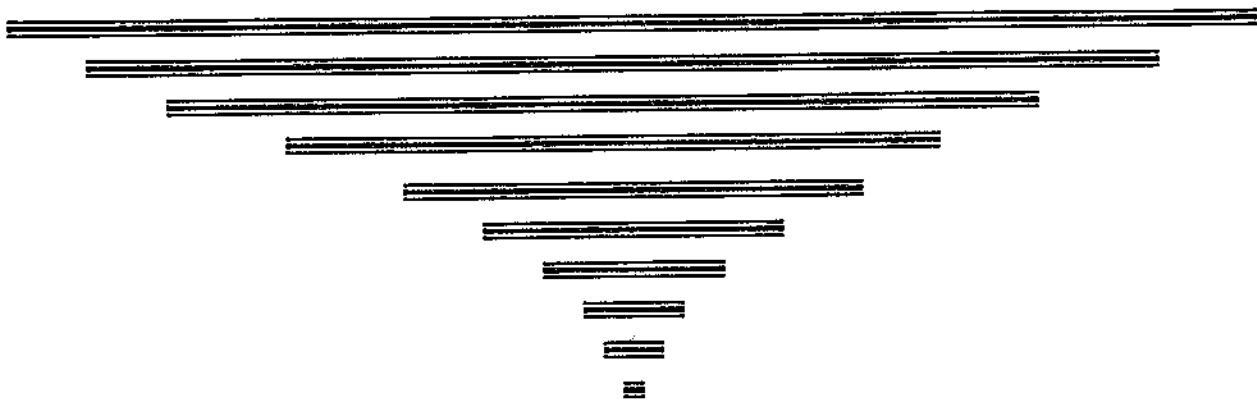
M. Isela, M. Mary Carmen y M. Rodolfo les agradezco sinceramente el formar parte en mi desarrollo profesional, por aceptar ser mis sinodales, así como revisar y asesorarme para hacer un trabajo de mejor calidad. De igual manera Mtro. Jaime, gracias por su apoyo al realizar los tramites necesarios para la titulación y por preocuparse en que sus egresados tengan una mejor preparación.

También quiero agradecer de la manera más atenta a Vanessa Paz por sus artículos de Spirulina y sus cuadernos, a Yadira y Claudia por la confianza al prestarme sus libros de estadística, a Pris por apoyarme con las preparaciones, a ustedes, al igual que a Gilberto, Mariana, Lili gracias por su agradable compañía en el laboratorio, a Julia y a Geli por su amistad y por prestarme sus artículos. A Lupita Guerrero y Lupita Juarez por sus asesorías y consejos. Monchis agradezco tu amabilidad y honestidad para conmigo, a ti Lulu por la atención y paciencia en escucharme, la sinceridad de tus palabras, tus consejos que me hacían reflexionar, la confianza que me ofreciste además de tu amistad.

En general quiero agradecer con mucho cariño a todos los que me brindaron ayuda, me regalaron una sonrisa, por su compañía en el trabajo, por escucharme, por su valiosa amistad, la cual llevare siempre en mis recuerdos como a ustedes mis queridos y estimados amigos, que Dios los llene de bendiciones y de mucha felicidad.

***Sí por alguna razón
a alguien no hice mención
disculpenme por favor
pues no fue mi intención.***

**LA PRESENTE INVESTIGACION SE REALIZO
EN EL DEPARTAMENTO DE MUTAGENESIS
AMBIENTAL DEL CENTRO DE ESTUDIOS
ACADEMICOS SOBRE CONTAMINACION
AMBIENTAL BAJO LA DIRECCION DE LA M.
EN C. LOURDES ELVIA RUIZ FLORES**



INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	i
INDICE DE TABLAS	iv
INDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	vii
I	1
INTRODUCCION	1
1. ADITIVOS ALIMENTARIOS	1
2. ADITIVOS COLORANTES	3
2.1 CARACTERISTICAS QUE DEBEN CUBRIR LOS ADITIVOS COLORANTES PARA SER UTILIZADOS EN ALIMENTOS	4
2.2 BENEFICIOS QUE APORTAN LOS COLORANTES EN EL ALIMENTO	5
2.3 CLASIFICACION DE LOS ADITIVOS COLORANTES	5
2.3.1 ADITIVOS COLORANTES NATURALES	5
2.3.2 ADITIVOS COLORANTES IDENTICOS A LOS NATURALES	5
2.3.3 ADITIVOS COLORANTES SINTETICOS	6
2.3.3.1 LACAS	6
2.3.3.2 TINTURAS	6
2.4 EVALUACION LEGISLATIVA DE LOS ADITIVOS COLORANTES ALIMENTARIOS	6
2.5 ESTUDIOS TOXICOLOGICOS RELACIONADOS CON ADITIVOS COLORANTES SINTETICOS	7
2.5.1 Amaranto	7
2.5.2 Eritrocina	7
2.5.3 Carmoisina	8
2.5.4 Rojo allura	8
2.5.6 Verde rápido	9
2.5.7 Indigotina	9
2.5.8 Amarillo Sunset	9
2.5.9 Tartrazina	10
2.5.10 Azul brillante	10
2.6 ESTUDIOS DE GENOTOXICIDAD REALIZADOS EN JUGOS, DULCES Y REFRESCOS	10
3. GENOTOXICIDAD	12
3.1 GENES Y CROMOSOMAS	12
3.2 MUTAGENESIS	13
3.2.1 TERATOGENESIS	14
3.2.2 CARCINOGENESIS	14
3.2.2.1 MECANISMOS DE CARCINOGENESIS QUIMICA	15
3.2.2.2 RELACION DE LOS HABITOS DIETETICOS CON EL DESARROLLO DEL CANCER	16
4. ANTIMUTAGENOS Y ANTICARCINOGENOS	18
4.1 ANTIOXIDANTES	21
4.1.1 PROPIEDADES DE ALGUNOS ANTIOXIDANTES NATURALES	22
4.1.1.1 CAROTENOIDES	22

4.1.1.2	VITAMINA E	22
4.1.1.3	VITAMINA C	22
4.1.2	IMPORTANCIA DE LOS ANTIOXIDANTES EN LA DIETA	23
4.1.3	MECANISMOS DE PROTECCION DE ALGUNOS ANTIOXIDANTES	24
4.1.3.1	CAROTENOIDES:	24
4.1.3.2	VITAMINA E:	24
4.1.3.3	VITAMINA C	25
4.1.4	MECANISMOS DE ACCION DE LOS ANTIOXIDANTES	25
4.1.5	ESTUDIOS CON ANTIOXIDANTES RELACIONADOS CON LA PREVENCIÓN DEL CÁNCER Y OTRAS PATOLOGÍAS	26
5.	CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MICROALGA <i>Spirulina maxima</i>	28
5.1	COMPOSICIÓN QUÍMICA DE <i>Spirulina maxima</i> .	30
5.2	ESTUDIOS RELACIONADOS CON EL VALOR NUTRICIO DE <i>Spirulina maxima</i> EN ANIMALES Y HUMANOS	31
5.3	CARACTERÍSTICAS TERAPÉUTICAS DE <i>Spirulina maxima</i>	36
5.3.1	Efectos sobre el metabolismo de lípidos	36
5.3.2	Estimulante del sistema inmune	36
5.3.3	Efecto anticancerígeno y antitumoral	37
5.3.4	Efecto protector a la radiación	37
5.3.5	Reducción de nefrotoxicidad debida a drogas y metales pesados	38
5.3.6	Actividad contra el virus del SIDA	38
5.3.7	Efectos farmacológicos y antitoxicológicos	38
6.	ENSAYOS BIOLÓGICOS PARA IDENTIFICAR GENOTÓXICOS	40
6.1	<i>Tradescantia</i>	42
II HIPÓTESIS Y OBJETIVOS		44
HIPÓTESIS		44
1.	OBJETIVO GENERAL	44
2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
III MATERIAL Y MÉTODOS		45
1	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO POLAR (ACUOSO) A PARTIR DEL PULVERIZADO DE <i>Spirulina maxima</i>	45
2	IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FICOCIANINA EN EL PULVERIZADO DE <i>Spirulina maxima</i>	47
2.1	ECUACIONES PARA EL CÁLCULO DEL CONTENIDO DE FICOCIANINA	47
3	ENSAYO BIOLÓGICO	48
3.1	PROPAGACIÓN Y CULTIVO DE <i>Tradescantia</i> CLONE 4430	48
3.2	ENSAYO GENOTÓXICO	48
3.3	ENSAYO ANTIGENOTÓXICO	49
4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51

IV	RESULTADOS	52
1	CONTENIDO DE FICOCIANINA EN EL EXTRACTO ACUOSO Y EN EL PULVERIZADO DE <i>Spirulina maxima</i>.	52
2.	ENSAYOS BIOLÓGICOS CON EL ADITIVO COLORANTE SINTÉTICO TARTRAZINA.	55
2.1	GENOTOXICIDAD INDUCIDA CON TARTRAZINA	55
2.2	ANTIGENOTOXICIDAD CON EXTRACTO ACUOSO DE <i>Spirulina maxima</i> Y SUS PIGMENTOS: CLOROFILINA, β -CAROTENO Y FICOCIANINA EN FORMA INDEPENDIENTE Y EN SUS RESPECTIVAS MEZCLAS Y COMO GENOTOXICO TARTRAZINA.	57
3.	ENSAYO BIOLÓGICO CON EL ADITIVO COLORANTE SINTÉTICO AZUL BRILLANTE	62
3.1	GENOTOXICIDAD INDUCIDA CON AZUL BRILLANTE	62
3.2	ANTIGENOTOXICIDAD CON EXTRACTO ACUOSO DE <i>Spirulina maxima</i> Y SUS PIGMENTOS: CLOROFILINA, β -CAROTENO Y FICOCIANINA EN FORMA INDEPENDIENTE Y EN SUS RESPECTIVAS MEZCLAS Y COMO GENOTOXICO AZUL BRILLANTE.	64
V	DISCUSION	69

VII	REFERENCIAS	83
------------	--------------------	-----------

ANEXOS	104
ANEXO 1 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE ALGUNOS ADITIVOS COLORANTES SINTÉTICOS UTILIZADOS CON MAYOR FRECUENCIA EN JUGOS, DULCES Y REFRESCOS (TARTRAZINA Y AZUL BRILLANTE)	104
1.1 TARTRAZINA	104
1.2 AZUL BRILLANTE	104
ANEXO 2 ESTRUCTURA QUÍMICA DE ALGUNOS ADITIVOS COLORANTES SINTÉTICOS UTILIZADOS CON MAYOR FRECUENCIA EN JUGOS, DULCES Y REFRESCOS (TARTRAZINA Y AZUL BRILLANTE)	105
2.1 TARTRAZINA	105
2.2 AZUL BRILLANTE	106

INDICE DE TABLAS

TABLA I	REGISTRO NACIONAL DE TUMORES MALIGNOS, LUGAR QUE OCUPAN COMO CAUSA DE MUERTE SEGÚN SEXO Y EDAD	18
TABLA II	COMPONENTES ALIMENTICIOS CON ACTIVIDAD ANTIMUTAGENICA.	20
TABLA III	CLASIFICACION DE ANTIMUTAGENOS SEGÚN SU MECANISMO DE ACCION.	20
TABLA IV	FUENTES ALIMENTARIAS DE VITAMINAS ANTIOXIDANTES.	23
TABLA V	MECANISMOS DE ACCION DE LOS COMPUESTOS ANTIOXIDANTES.	25
TABLA VI	COMPOSICION QUIMICA DEL ALGA <i>Spirulina maxima</i> SECA.	30
TABLA VII	CONTENIDO DE AMINOACIDOS DE <i>Spirulina</i> SECA DE LOS LAGOS DE TEXCOCO Y CHAD (MG/ 100 MG PROTEÍNA).	34
TABLA VII	CONTENIDO DEL PÍGMENTO FICOCIANINA EN EL EXTRACTO ACUOSO DE ALGA <i>Spirulina maxima</i> ASI COMO EN SU PULVERIZADO.	52
TABLA IX	FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS (MCN) EN CELULAS MEIOTICAS DE <i>Tradescantia</i> CLONE 4430 INDUCIDA EN EL ENSAYO GENOTOXICO CON TARTRAZINA Y SU CONTROL NEGATIVO.	55
TABLA X	RELACION ESTADISTICA DE LA DIFERENCIA DE MEDIAS DE DUNETT PARA LA FRECUENCIA DE MCN EN CELULAS MEIOTICAS DE <i>Tradescantia</i> CLONE 4430 INDUCIDA POR TARTRAZINA COMPARADA CON SU CONTROL NEGATIVO (AGUA DESTILADA).	56
TABLA XI	FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS EN CELULAS MEIOTICAS DE <i>Tradescantia</i> CLONE 4430 INDUCIDA EN LOS ENSAYOS CON EXTRACTO ACUOSO DE <i>Spirulina maxima</i> Y SUS PIGMENTOS CLOROFILINA, β -CAROTENO, FICOCIANINA EN FORMA INDEPENDIENTE Y EN MEZCLAS, SUS RESPECTIVOS CONTROLES Y TARTRAZINA (0.0024mg/ml).	58
TABLA XII	RELACIONES ESTADISTICAS DE LA DIFERENCIA DE MEDIAS DE DUNETT PARA LA FRECUENCIA DE MCN EN CELULAS MEIOTICAS DE <i>Tradescantia</i> CLONE 4430 INDUCIDA CON EXTRACTO ACUOSO DE <i>Spirulina maxima</i> Y SUS PIGMENTOS CLOROFILINA, β -CAROTENO, FICOCIANINA INDEPENDIENTE Y EN MEZCLA, COMPARADOS CON UN CONTROL NEGATIVO (AGUA DESTILADA).	59
TABLA XIII	PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS EN CELULAS MEIOTICAS DE <i>Tradescantia</i> CLONE 4430 INDUCIDA POR TARTRAZINA (0.0024 mg/ml) EN LOS ENSAYOS ANTIGENOTOXICOS CON EL EXTRACTO ACUOSO DE <i>Spirulina maxima</i> Y SUS PIGMENTOS CLOROFILINA, β -CAROTENO, FICOCIANINA INDEPENDIENTE Y EN SUS RESPECTIVAS MEZCLAS.	60
TABLA XIV	FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS (MCN) EN CELULAS MEIOTICAS DE <i>Tradescantia</i> CLONE 4430 INDUCIDA EN EL ENSAYO GENOTOXICO CON AZUL BRILLANTE Y SU CONTROL NEGATIVO.	62
TABLA XV	RELACION ESTADISTICA DE LA DIFERENCIA DE MEDIAS DE DUNETT PARA LA FRECUENCIA DE MCN EN CELULAS MEIOTICAS DE <i>Tradescantia</i> CLONE 4430 INDUCIDA POR AZUL BRILLANTE COMPARADA CON SU CONTROL NEGATIVO (AGUA DESTILADA).	63
TABLA XVI	FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS EN CELULAS MEIOTICAS DE <i>Tradescantia</i> CLONE 4430 INDUCIDA EN LOS ENSAYOS CON EXTRACTO ACUOSO DE <i>Spirulina maxima</i> Y SUS PIGMENTOS CLOROFILINA, β -CAROTENO, FICOCIANINA EN FORMA INDEPENDIENTE Y EN MEZCLAS, SUS RESPECTIVOS CONTROLES Y AZUL BRILLANTE (0.014mg/ml).	65
TABLA XVII	RELACIONES ESTADISTICAS DE LA DIFERENCIA DE MEDIAS DE DUNETT PARA LA FRECUENCIA DE MCN EN CELULAS MEIOTICAS DE <i>Tradescantia</i> CLONE 4430 INDUCIDA CON EXTRACTO ACUOSO DE <i>Spirulina maxima</i> Y SUS PIGMENTOS CLOROFILINA, β -CAROTENO, FICOCIANINA INDEPENDIENTE Y EN MEZCLA, COMPARADOS CON UN CONTROL NEGATIVO (AGUA DESTILADA).	66

TABLA XVIII PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS EN CELULAS MEIOTICAS DE *Tradescantia* CLONE 4430 INDUCIDA POR AZUL BRILLANTE (0.014 mg/ml) EN LOS ENSAYOS ANTIGENOTOXICOS CON EL EXTRACTO ACUOSO DE *Spirulina maxima* Y SUS PIGMENTOS CLOROFILINA, β -CAROTENO, FICOCIANINA INDEPENDIENTE Y EN SUS RESPECTIVAS MEZCLAS.

67

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. <i>Tradescantia</i>	42
FIGURA 2 DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA OBTENCION DEL EXTRACTO POLAR (ACUOSO) A PARTIR DEL PULVERIZADO DE ALGA <i>Spirulina maxima</i>	46
FIGURA 3 DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL ENSAYO GENOTOXICO Y ANTIGENOTOXICO (SISTEMA DE MCN-TRAD) CLONE 4430.....	50
FIGURA 4 IDENTIFICACION ESPECTROFOTOMETRICA DEL PIGMENTO FICOCIANINA EN EL PULVERIZADO DE <i>Spirulina maxima</i>	53
FIGURA 5 ESPECTRO DE ABSORBANCIAS DEL PIGMENTO FICOCIANINA (Gantt y col., 1979).....	54
FIGURA 6 PORCIENTO DE INHIBICION DEL EXTRACTO ACUOSO DE <i>Spirulina maxima</i> Y SUS PIGMENTOS CLOROFILINA, β -CAROTENO Y FICOCIANINA Y SUS DIFERENTES MEZCLAS SOBRE LA FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS INDUCIDA POR EL ADITIVO COLORANTE SINTETICO TARTRAZINA.....	61
FIGURA 7 PORCIENTO DE INHIBICION DEL EXTRACTO ACUOSO DE <i>Spirulina maxima</i> Y SUS PIGMENTOS CLOROFILINA, β -CAROTENO Y FICOCIANINA Y SUS DIFERENTES MEZCLAS SOBRE LA FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS INDUCIDA POR EL ADITIVO COLORANTE SINTETICO AZUL BRILLANTE.....	68

RESUMEN

Los aditivos colorantes sintéticos son sustancias ampliamente utilizadas por la industria alimentaria, agregadas a los alimentos y bebidas con el fin de hacer más atractivo el producto y dar uniformidad en el color ya que este sirve como un indicador visual de calidad de los mismos, sin embargo a parte de sus ventajas tecnológicas su consumo también puede contribuir al desarrollo de enfermedades como el cáncer. Los aditivos colorantes sintéticos tartrazina y azul brillante han sido identificados con mayor frecuencia, en alimentos y bebidas de mayor consumo en la ciudad de Querétaro encontrando un efecto genotóxico para ambos aditivos colorantes en las células meióticas de *Tradescantia*.

Se ha descrito un efecto carcinogénico inducido por los colorantes del grupo azo y los relacionados con el grupo amino, los cuales al parecer se unen a la cadena del ADN alterando la información genética, dando lugar a células anormales. Cabe hacer notar que tartrazina pertenece a los colorantes del grupo azo y que azul brillante ha inducido la formación de tumores en riñón de rata, por lo que la presencia de dichos aditivos en los alimentos representa un riesgo para la salud.

Hay evidencias científicas de que mutaciones cromosómicas pueden conducir al desarrollo de un cáncer, pudiendo evitar esto, mediante la exposición a organismos que contengan compuestos quimioprotectores, como la microalga *Spirulina maxima* que posee un espectro favorable de aminoácidos, ácidos grasos, polisacáridos, vitaminas, nutrimentos inorgánicos y pigmentos (clorofilina, β -caroteno y ficocianina). Por esta razón, en base a la problemática que implica el consumo de estos aditivos y a las propiedades de esta microalga, fue objeto de estudio evaluar su potencial antigenotóxico sobre la genotoxicidad inducida por tartrazina y azul brillante, empleando el sistema de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia*.

Se realizaron estudios preliminares, con los aditivos colorantes sintéticos tartrazina y azul brillante, vía inflorescencia para determinar las concentraciones que presentaran un efecto genotóxico sobre las células meióticas de *Tradescantia*, tomando como referencia las cifras de Rojas, 1992 encontrando como óptimas las concentraciones de 0.0024 mg/ml y 0.014 mg/ml para cada aditivo colorante, respectivamente.

La capacidad antigenotóxica del extracto acuoso de *Spirulina maxima* y sus pigmentos clorofilina, β -caroteno y ficocianina aplicados tanto individual como en mezcla se determinó mediante la inhibición de la frecuencia de micronúcleos (indicador de daño al material genético) inducida por los aditivos colorantes sintéticos tartrazina y azul brillante.

Se obtuvo el extracto acuoso del pulverizado de *Spirulina maxima* a la concentración de 168 mg/ml, asimismo el pigmento ficocianina a partir del pulverizado de la microalga, mediante el método descrito por Gantt y col. (1979) a una concentración de 112761.02 mg/kg = 112.76 g/kg. Se emplearon estándares de clorofilina y β -caroteno de acuerdo a las concentraciones identificadas por Paz (1997) en el extracto acuoso de *Spirulina*. El tratamiento antigenotóxico fue vía inflorescencia depositando primeramente 15 μ l de la muestra de estudio (extracto acuoso, pigmentos clorofilina, β -caroteno y ficocianina solos y en mezcla) para lo cual se extrajeron 2 o 3 yemas apicales, para facilitar la aplicación de la muestra, una vez absorbida esta se agregaron 15 μ l de tartrazina o azul brillante considerándose a partir de esta aplicación el tratamiento de 30 h, continuando con la metodología descrita por Ma (1983) para la obtención de preparaciones y lectura de tétradas. Los datos sobre los ensayos genotóxicos y antigenotóxicos se conformaron por tres experimentos independientes con tres repeticiones cada uno, aplicando el análisis de varianza y la prueba de Dunnett comparando tratamientos con un control negativo (agua destilada) ($p < 0.05$).

Se obtuvo el % de inhibición del extracto acuoso y pigmentos de *S. maxima* sobre el daño genotóxico inducido por tartrazina y azul brillante. Los resultados obtenidos muestran que el extracto acuoso inhibió del daño genotóxico inducido por tartrazina en un 43.35% y en 40.88% con azul brillante y con los pigmentos, la clorofilina presentó el mayor efecto antigenotóxico en las células meióticas de *Tradescantia* para ambos aditivos colorantes y fue de 51.06% y 47.85% respectivamente. La mezcla clorofilina + β -caroteno dio la más alta protección al material genético en un 46.67% para tartrazina y de 43.11% con azul brillante. Al aplicar la mezcla de los tres pigmentos se redujo el % de inhibición sobre la frecuencia de micronúcleos hasta un 41.48% y un 36.59% para tartrazina y azul brillante respectivamente.

De acuerdo con estos resultados se puede concluir que la microalga *Spirulina maxima* puede ser utilizada como un alimento funcional por proteger al material genético del daño genotóxico inducido por sustancias presentes en la dieta como son los aditivos colorantes sintéticos, particularmente tartrazina y azul brillante, atribuyendo esto a sus compuestos quimioprotectores principalmente clorofilina y β -caroteno que pudieron haber actuado atrapando radicales libres por funcionar como antioxidantes y una ligera protección antigenotóxica del pigmento ficocianina, además de sus pigmentos con propiedades quimioprotectoras, su alta calidad nutricia (aminoácidos esenciales y no esenciales, ácidos grasos, vitaminas como tiamina, riboflavina, piridoxina, cianocobalamina, entre otras, nutrimentos inorgánicos entre ellos calcio, hierro zinc) y la ventaja de no presentar efectos tóxicos hacen a la microalga *Spirulina maxima* un recurso de origen natural muy atractivo como complemento alimenticio, entre otros usos.

I INTRODUCCION

1. ADITIVOS ALIMENTARIOS

Desde tiempos prehistóricos, se han utilizado los aditivos en alimentos con distintos fines. Los avances tecnológicos en el procesado de alimentos ha aumentado la variedad y el uso de estas sustancias lo cual ha conllevado a diversificar la cantidad de productos industrializados a la venta del consumidor (Branen, 1990).

La inocuidad de los alimentos que consumimos es una preocupación generalizada, el uso de aditivos en su formulación nos plantea interrogantes sobre el tipo y la cantidad de compuestos que se están utilizando, más aún si consideramos que este tipo de alimentos son ingeridos diariamente y a veces en cantidades considerables (Rosetta, 1990)

La necesidad de conservar los alimentos para poder cubrir los requerimientos de un mundo creciente presenta ventajas y desventajas, los diferentes métodos de conservación aumentan la vida útil de los alimentos pero en multiples ocasiones esto va aunado a un deterioro tanto nutricional como organoléptico de los mismos. La adición de aditivos puede contrarrestar parte de estos problemas (Valdés, 1991).

El uso de aditivos en la industria alimentaria es cada vez mayor. Sin embargo para la incorporación de estas sustancias, se deben tener en cuenta varias consideraciones de tipo toxicológico para evitar que en lugar de constituir una ventaja, se conviertan en un inconveniente ocasionando riesgo a la salud del consumidor.

La toxicología de los aditivos alimentarios surge como disciplina en 1960 en los Estados Unidos, con la publicación de las pruebas necesarias para una evaluación segura de los mismos ya que los niveles de exposición a tales agentes, para el humano varían ampliamente pudiendo ser ingeridos continuamente por largos períodos de tiempo y por lo tanto representar un peligro potencial a la salud (Haveland-Smith y Combes, 1980).

Un aditivo se define como una sustancia o mezcla de sustancias que normalmente no se consume como alimento por sí sola. Se agrega intencionalmente a los alimentos durante su producción, procesamiento, almacenamiento y empaque del mismo, con el propósito de mejorar su apariencia, textura, sabor y calidad nutricional (Concon, 1988; Branen, 1990).

Los aditivos utilizados por la industria alimentaria, pueden ser de diferentes tipos: conservadores, nutrimentales, colorantes, saborizantes, edulcorantes, texturizantes y miscelaneos (Rosetta, 1990).

Como consecuencia de la necesidad de contar con organizaciones que legislaran el uso de aditivos en alimentos, surgieron diversas agrupaciones que se han encargado de reglamentar la utilización de estos, encontrándose: La Secretaría de Salud: Laboratorio Nacional de Salud Pública, Dirección de Control Sanitario de Bienes y Servicios; Universidad Autónoma de México: Facultad de Química; Cámara Nacional de la Industria y la Transformación; Dectan, S.A; H.Konsthamm, S.A; Pyosa, S.A. de C.V.; Spectrum, S.A.; Warner Jenkinson, S.A. de C.V. y en México se cuenta con el Reglamento de la Ley General de la Salud en materia de control sanitario de actividades, establecimientos, productos y servicios (Diario Oficial de la Federación Mexicana, 1995).

La solicitud para el uso de algún aditivo se realiza mediante un documento que debe contener: datos generales del producto (nombre del aditivo), información científica en cuanto a composición, propiedades fisicoquímicas, proceso de obtención, métodos de análisis (criterios de identidad), sólo o en alimentos a que se adiciona, calidad microbiológica con sus respectivos resultados indicando el tipo de pruebas toxicológicas, incluyendo estudios patológicos y sus datos sobre consumo.

Entre los parámetros que se legislan en relación al uso de aditivos en alimentos se pueden mencionar: inocuidad, pureza y riesgo nutricio del aditivo.

Para asegurarse de que un aditivo es adecuado para su consumo en alimentos es necesario una evaluación toxicológica. En general las pruebas a las que son sometidos son las siguientes:

- *Pruebas de toxicidad aguda
- *Pruebas de toxicidad crónica
- *Pruebas de toxicidad a corto plazo
- *Pruebas de toxicidad a largo plazo
- *Absorción y digestión intestinal de los aditivos
- *Acción in utero

(Loomis, 1974; Valdés 1991).

Conforme a las pruebas de toxicidad aguda y crónica se establece la Ingesta Diaria Aceptada (IDA) la cual se calcula en relación al peso corporal e indica la concentración máxima que podría ser consumida diariamente sin representar riesgo alguno para la salud. El cálculo de la IDA se realiza como un factor de seguridad, el cual consiste en utilizar una concentración 100 veces menor que la dosis bajo la que no se detectaron efectos adversos en los estudios toxicológicos (Valdés, 1991).

El CODEX Alimentarius en la actualidad pretende fijar un nuevo nivel de ingesta máxima, la Dosis Diaria Potencial (DDP), la cual debe basarse en resultados reales y potenciales de consumo, calculada en base a la concentración empleada por la industria y en la ingesta potencial de los grupos expuestos, principalmente niños y mujeres embarazadas (Valdés, 1991).

Existe un grupo de sustancias con el nombre de GRAS (Generally Recognized As Safe) consideradas seguras para su uso en alimentos basándose en la decisión de científicos expertos en la evaluación de la seguridad de los compuestos químicos. Las diferencias que existen entre los aditivos de alimentos y sustancias GRAS son dos: 1. Las sustancias GRAS no requieren de pruebas adicionales para ser consideradas seguras. 2. Dichas sustancias no se incluyen en la cláusula Delaney.

Esta cláusula indica que ningún aditivo debe ser considerado como seguro si se encuentra que induce cáncer cuando es ingerido por el ser humano o animales o si al utilizar ensayos apropiados para la evaluación de la seguridad de aditivos alimentarios que puede conducir al cáncer en los mismos.

La cláusula Delaney no se aplica a los aditivos que inducen cáncer sólo a concentraciones altas y que a dosis bajas sean inocuas y además su uso sea en cantidades insignificantes (Smith, 1984).

La FDA y la Flavor and Extract Manufacturers' Association (FEMA) han considerado importante llevar a cabo una re-evaluación a intervalos regulares de tiempo completo de las sustancias previamente enlistadas como GRAS. Dichas re-evaluaciones se basan en el conocimiento de cambios en los niveles actuales de uso y patrones de consumo, datos toxicológicos reportados en la literatura científica y aún en resultados significativos de estudios no publicados (Senti, 1981; Kolbye y col., 1983; Oser y col., 1984; Smith, 1984).

2. ADITIVOS COLORANTES

Entre los aditivos más ampliamente utilizados por la industria alimentaria en la preparación de alimentos y bebidas se encuentran los colorantes, los cuales son adicionados con el propósito de presentar alimentos más atractivos a la vista del consumidor. Estos aditivos no deben ser empleados para disimular una alteración o para hacer creer la presencia de un constituyente de calidad (Valdés, 1991).

El color es tan común en nuestro medio ambiente como el aire que respiramos, es muy importante en los humanos como un medio de identificación. Es la primera cualidad sensitiva a través de la cual son juzgados los alimentos, presenta una estrecha relación con el sabor y la apariencia de calidad de los mismos, siendo los colorantes los principales encargados de realzar el atractivo estético de los alimentos (Rosetta, 1990).

El aspecto de un alimento es la primera clave de su identificación y con frecuencia predice el grado de satisfacción que se obtendrá al comerlo. Probablemente el color es el más importante de los factores visuales responsable de la aceptación o rechazo así como la primera apreciación de la calidad de un alimento por parte del consumidor (Desroisier, 1983; Marmion, 1984; Newsome, 1986).

El color que presentan los alimentos se debe en algunos casos a la presencia natural de pigmentos y en otros a sustancias intencionalmente añadidas como aditivos colorantes. La lista de los que en un momento u otro se han utilizado para pigmentar los alimentos es muy larga pero el número de los legalmente permitidos en la actualidad es muy pequeño.

En general las reglas que rigen el uso de los aditivos colorantes son complejas y cambian constantemente, por lo tanto colorantes considerados seguros en un país, pueden no ser considerados seguros en otras partes del mundo (Hart y Fisher, 1971; Valdés, 1991).

Un aditivo colorante de acuerdo con la Food and Drug Administration (FDA) es cualquier colorante, pigmento o sustancia obtenida por síntesis, extraída o aislada a partir de un vegetal, animal, mineral u otra fuente y que al ser adicionada a los alimentos, drogas, cosméticos por si misma (sola o a través de una reacción con otra sustancia) es capaz de impartir color (Hart y Fisher, 1971).

2.1 CARACTERISTICAS QUE DEBEN CUBRIR LOS ADITIVOS COLORANTES PARA SER UTILIZADOS EN ALIMENTOS

- Estar legalmente permitidos
 - Ser seguros a los niveles y bajo condiciones de uso, ser químicamente consistentes y libres de impurezas.
 - No impartir ninguna propiedad indeseable; deben ser insípidos, inodoros y compatibles con otros aditivos e ingredientes de los alimentos.
 - Ser estables bajo las condiciones normales de proceso, en particular resistentes a los efectos del calor, luz, oxidación y reducción.
 - Tener gran fuerza tintórea y estar disponibles en un amplio rango de tonos.
 - Ser barato, disponible y de fácil manejo
- (Valdés, 1991).

2.2 BENEFICIOS QUE APORTAN LOS COLORANTES EN EL ALIMENTO

- Restablecen su apariencia original cuando los colorantes naturales han sido destruidos por el procesamiento con calor.
 - Garantizan la uniformidad en el color cuando se presentan variaciones naturales en la intensidad del color de los alimentos.
 - Intensifican el color natural presente en el alimento cuando este es más débil al que el consumidor asocia con un producto de cierto tipo o sabor.
 - Ayuda a proteger el sabor y las vitaminas sensibles a la luz durante el almacenamiento.
 - Le da apariencia atractiva a los alimentos que sin color pueden observarse inapetecibles.
 - Ayuda a preservar la identidad o las características por las cuales son reconocidos los alimentos.
 - Sirve como un indicador visual de la calidad.
- (Newsome, 1986; Branen, 1990; Valdés, 1991).

2.3 CLASIFICACION DE LOS ADITIVOS COLORANTES

Para clasificar a los colorantes hay diferentes criterios estos son: en base a su origen o procedencia, la naturaleza química o en su certificación por la FDA (Branen, 1990).

En base a su origen se dividen en naturales y sintéticos o artificiales, considerando su naturaleza química se agrupan en función de su solubilidad o de su reactividad por ejemplo, los colorantes azoicos, los derivados polifenólicos, las estructuras tetrapirrólicas, etc. De acuerdo a la FDA se dividen en dos grupos: los que no requieren certificación (incluye colorantes obtenidos de fuentes naturales y a los compuestos sintetizados con formulación idéntica a los de origen natural) y los colorantes sujetos a certificación (corresponden a los sintetizados químicamente, incluyen tinturas y lacas) (de Saint Blanquat, 1988; Rosetta, 1990).

2.3.1 ADITIVOS COLORANTES NATURALES

Los colorantes naturales son los obtenidos de fuentes animales, vegetales o minerales (Newsome, 1986; Branen, 1990). En la actualidad se utilizan cultivos de tejidos para la producción de pigmentos naturales (Ilker, 1987), también se pueden utilizar algas y microorganismos, se han usado las especies *Monascus anka* y *M. purpureus*, *Streptomyces echinoruber* y *Penicillium purpurogenum* los cuales producen pigmentos rojos (Francis, 1987). Los colorantes naturales incluyen antocianinas, carotenoides, xantófilas, clorofilas, betalainas, riboflavina, caramelo, especias, carmín de cochinilla, tumericó, paprika, crocetina (Newsome, 1986; de Saint Blanquat, 1988; Branen, 1990; Rosetta, 1990).

2.3.2 ADITIVOS COLORANTES IDENTICOS A LOS NATURALES

Los colorantes llamados idénticos a los naturales son compuestos de estructura similar a los naturales pero obtenidos por síntesis química, de tal manera que ya están disponibles comercialmente carotenoides puros, incluyendo cantaxantinas, apo-carotenal y β -caroteno. Todos han pasado pruebas toxicológicas y son permitidos por la FDA para su uso en alimentos (Newsome, 1986; Dziezak, 1987).

2.3.3. ADITIVOS COLORANTES SINTETICOS

Los aditivos colorantes sintéticos son compuestos que se sintetizan químicamente con un alto grado de pureza. Son los mas ampliamente usados por la industria alimentaria y corresponden a los que requieren de una certificación. En este grupo se incluyen: las lacas y las tinturas.

2.3.3.1 LACAS

Las lacas son sales de aluminio o calcio del pigmento correspondiente extendidas sobre una base insoluble, hidrato de aluminio, lo que las hace insolubles en la mayoría de los solventes incluyendo el agua, por lo tanto colorean por dispersión. Generalmente dan brillo, estabilidad química y térmica más que las tinturas.

2.3.3.2 TINTURAS

Las tinturas son compuestos solubles en agua que colorean por disolución, se pueden producir en forma de polvos, gránulos, líquidos, mezclas, pastas y dispersiones. Pertenecen a una de cuatro clases químicas: Azo (FD&C amarillo No. 5, FD&C amarillo No. 6, FD&C rojo No. 40, FD&C rojo cítrico No. 2 y naranja B); trifenilmetano (FD&C azul No.1, FD&C verde No. 3); indigoide (FD&C azul No. 2) y xanteno (FD&C rojo No. 3) (Meggos, 1984; Newsome, 1986; Dziezak, 1987; Branen, 1990; Rosetta, 1990).

2.4 EVALUACION LEGISLATIVA DE LOS ADITIVOS COLORANTES ALIMENTARIOS

En los E. U. de norteamérica la FDA (1976) estableció que un aditivo colorante debe ser estudiado escrupulosamente y determinar su potencialidad para inducir cáncer, efectos en la reproducción o en el feto, al igual que otros efectos tóxicos, antes de ser propuesto para su uso. En 1977 se estableció analizarse periódicamente realizando estudios dentro de los cuales se encuentran: estudios de dosis agudas y subcrónicas, generalmente en ratas o ratones incluyendo estudios in utero, estudios teratogénicos en ratas y de reproducción en diversas especies, además de otros tipos de estudios tales como pruebas metabólicas o de mutagenicidad (Fishbeing, 1979).

Existe una tendencia a examinar frecuentemente la toxicidad de los colorantes sintéticos utilizados como aditivos en alimentos. Como resultado de esto algunos colorantes salen de la legislación y otros se encuentran bajo control debido al riesgo potencial que representan para los consumidores. Los estudios en el hombre consisten en una cuidadosa observación de sujetos que han absorbido la sustancia de prueba, más que en la experimentación con dosis predeterminadas. Los toxicólogos están particularmente interesados en dos casos, el de los individuos expuestos profesionalmente a los aditivos o que han absorbido accidentalmente grandes dosis y el de las poblaciones consumidoras de grandes cantidades de un aditivo dado. (Newsome, 1986; de Saint Blanquat, 1988; Valdés, 1991).

2.5 ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS RELACIONADOS CON ADITIVOS COLORANTES SINTÉTICOS

Dentro de los estudios que se han realizado se encuentra el de Hueper y Conway (1964), Clayson y Garner (1976), quienes detectaron un efecto carcinogénico inducido por los colorantes del grupo azo y los relacionados con los grupos amino, los cuales al parecer se unen a la cadena del ácido desoxirribonucleico, alterando de esta manera la información genética y desarrollando por lo tanto células anormales (Fishbeing, 1979).

Se ha visto que algunos colorantes sintéticos pueden causar varios problemas de salud, a continuación se mencionarán algunos colorantes, sus usos y acciones toxicológicas.

2.5.1 Amaranto

Utilizado para colorear la cáscara de naranja y del cual hay reportes donde se sugiere que puede ser carcinogénico, por ejemplo se encontró que ratones hembra inyectados subcutáneamente con este colorante tenían un incremento de tumores malignos tales como adenocarcinomas de pulmones y linfosarcomas (Sharratt y col., 1966). También se ha observado incremento de tumores malignos en la vejiga de ratones después de la implantación de una pastilla del colorante (Clayson, 1968). Se ha encontrado actividad mutagénica con este a través de la prueba de Ames después de la reducción química del colorante (Combes y Haveland-Smith, 1981).

Es aprobado por la FDA y por la legislación mexicana solamente para colorear la cáscara de naranjas que no se van a procesar (Concon, 1988).

2.5.2 Eritrocina

Se han realizado varios estudios en diferentes especies animales y sólo en ratas macho que recibieron dosis altas de este colorante (4% ó 2462 mg/kg/día) se observaron efectos carcinogénicos presentando estas una alta incidencia de

tumores tiroideos. No se encontraron efectos adversos cuando se utilizaron dosis de 0.1, 0.5 y 1% (IRDC., 1992).

Los estudios subcrónicos indicaron que este colorante inhibe la conversión de tiroxina a triyodotironina y esto provoca un incremento en la secreción de tirotropina (Newsome, 1986).

La laca de este colorante fue excluida de la lista de colorantes permitidos por la FDA en enero de 1990 (Duxbury, 1990). La Legislación Mexicana no la contempla en la lista de los colorantes permitidos en alimentos (Diario Oficial de la Federación Mexicana, 1995).

2.5.3 Carmoisina

La Asociación de Manufactura de Colorantes Certificados (CCMA) en Estados Unidos a pedido la aprobación de este colorante, ya que es utilizado ampliamente en Centro y Sudamérica, también en Europa (Newsome, 1986).

Este colorante ha demostrado no ser mutagénico en varios sistemas bacterianos (Combes y Haveland-Smith, 1981). Presenta similitud y estabilidad al FD&C rojo No. 2 o amaranto en tintura. La Legislación Mexicana permite el uso de éste colorante en alimentos (Diario Oficial de la Federación Mexicana, 1995).

2.5.4 Rojo allura

La FDA aprobó el uso de este colorante basándose, en los datos obtenidos de un experimento que terminó a los 21 meses cuando las ratas en experimentación murieron de neumonía antes de concluir el experimento, a pesar de esto, la FDA consideró que los datos eran suficientes para aprobar su uso. Otros estudios revizados a partir de 1974, han sido favorables, sin embargo está prohibido en el Reino Unido, Suecia, Suiza y los países de la Comunidad Económica Europea (CEE) (Newsome, 1986).

No se encontró efecto mutagénico de este con la prueba de Ames con y sin activación metabólica (Chung y col., 1981; Prival y col., 1988).

En los Estados Unidos Mexicanos si se permite su uso en alimentos (Diario Oficial de la Federación Mexicana, 1995).

2.5.5 Naranja B

En un estudio realizado por la FDA en 1971, no se encontraron efectos adversos al ser administrado en concentraciones dietarias de 5% en ratas, 5% en ratón y 1% en perros. Estudios teratogénicos realizados en ratas y conejos, al igual que uno de reproducción en tres generaciones de ratas no presentaron efectos adversos en la reproducción a una concentración de 500mg/día, además no hubo

evidencia de teratogenicidad en ratas a niveles de 1500mg/kg/día y en conejos a 500mg/kg/día (Hatchcock, 1982).

La FDA permite que se utilice únicamente en la superficie y la envoltura de los embutidos, mientras que en la Legislación Mexicana no está permitido. (Newsome, 1986; Diario Oficial de la Federación Mexicana 1995).

2.5.6 Verde rápido

Estudios crónicos efectuados por la FDA en 1966 en ratas utilizando concentraciones dietarias de más del 5% demostraron que este colorante no tiene efecto genotóxico, además de no encontrarse efectos adversos con dosis de 2% en ratones y de 1% en perros, de donde se estableció una ingesta diaria aceptada de 2.5mg/kg de peso corporal y la DL50 oral en ratas es >2g/kg.

Esta permitido por la FDA y también en México para usarlo en alimentos (Hatchcock, 1982; Diario Oficial de la Federación Mexicana, 1995).

2.5.7 Indigotina

En 1966 la FDA estableció que este colorante a niveles de 1% en ratas no provocan efectos adversos y en 1968 recomendó una Ingesta Diaria Aceptada de 0.63 mg/kg de peso corporal. En un estudio sobre reproducción multigeneracional realizado en 1974 por la FDA no se encontraron efectos adversos al administrarse a ratas niveles de 250 mg/kg/día (Hatchcock, 1982).

Un estudio realizado también en ratas sobre toxicidad crónica, en el cual se incluyó acción in utero, se encontró que este colorante no presentó efectos carcinogénicos al administrarse en dosis dietarias de 0.5, 1 y 2 % (Borzelleca y col., 1985).

No se ha visto que tenga efecto mutagénico en células procariotas o eucariotas (Combes y Haveland-Smith, 1981).

Actualmente la FDA y la Legislación Mexicana permiten su uso en los alimentos. (Newsome, 1986; Diario Oficial de la Federación Mexicana, 1995).

2.5.8 Amarillo Sunset

La FDA realizó un estudio en ratas alimentandolas toda su vida con este colorante, el resultado fue un alto número de ratas hembra con lesión renal proliferativa cuando la administración del amarillo No. 6 fue en dosis altas. Sin embargo, se consideró que las dosis dietarias del colorante (5% o 3926 mg/kg/día) eran demasiado altas, al administrar concentraciones dietarias de 1.25-2.5% durante 4 meses no se encontró ningún efecto. En base a estos experimentos se ha concluido que no es carcinogénico (Newsome, 1986; Concon, 1988).

Es permitido por la FDA pero no por la Legislación Mexicana para usarlo en alimentos (Newsome, 1986; Diario Oficial de la Federación Mexicana, 1995).

2.5.9 Tartrazina

Este colorante a concentraciones mínimas de 0.15 mg puede provocar un ataque asmático agudo. Se han reportado varios tipos de reacciones alérgicas provocadas por este colorante, como el caso de pacientes que desarrollan urticaria después de la exposición a este. (Chaffe y Settipane, 1967).

Se ha demostrado una reacción de sensibilidad cruzada entre la aspirina y la tartrazina, aunque no se presenta en todos los casos (Samter y Beers, 1967). Existen reportes de síntomas tales como: alergia, asma y rinitis en individuos sensibles. Tales síntomas aparecen más frecuentemente en individuos asmáticos, alérgicos o intolerantes a la aspirina (Miller, 1982). Algunas sugerencias indican que las impurezas del colorante son las responsables de las reacciones mencionadas, más que la tartrazina por sí misma, sin embargo, esto no ha sido comprobado (Simon, 1984). También se ha reportado como entre colorantes azo y otros componentes químicos de los alimentos (Samter y Beers, 1967).

En la actualidad, la Legislación Mexicana permite su uso en alimentos (Diario Oficial de la Federación Mexicana, 1995).

2.5.10 Azul brillante

Este aditivo colorante sintético se ha evaluado frecuentemente. Estudios realizados en 1966 por la FDA demostraron que a concentraciones dietarias del 5% en ratas y 2% en perros no se presentaron efectos adversos, de aquí que la FDA estableció una Ingesta Diaria Aceptada (IDA) de 5mg/kg de peso corporal. Basándose en resultados de estudios teratogénicos y de reproducción multigeneracional se concluyó que no presenta efectos adversos (Hatchcock, 1982).

Actualmente este colorante es permitido por la Legislación Mexicana para su uso en alimentos (Diario Oficial de la Federación Mexicana, 1995).

2.6 ESTUDIOS DE GENOTOXICIDAD REALIZADOS EN JUGOS, DULCES Y REFRESCOS

La Legislación Mexicana con respecto a los aditivos y a los colorantes sintéticos en particular, es muy variada y no existen estudios sistemáticos en lo que a nivel y tipo de colorantes en alimentos se refiere en la Ciudad de Querétaro. Por lo que en el Departamento de Mutagénesis Ambiental del CEACA-UAQ se emprendió un programa para identificar y cuantificar colorantes sintéticos en bebidas no carbonatadas, no alcohólicas (jugos) (Rojas, 1992), dulces (Gómez,

1994) y bebidas carbonatadas no alcohólicas (refrescos) (Martínez y Velázquez, 1995) y evaluar su posible actividad genotóxica en el sistema de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* (MCN-TRAD).

Los resultados obtenidos muestran la presencia de varios colorantes sintéticos siendo los más frecuentes en los productos estudiados tartrazina y azul brillante, colorantes sintéticos permitidos por la FDA (Newsome, 1986) y por la Legislación Mexicana (Diario Oficial de la Federación Mexicana, 1995). Sin embargo, en lo que respecta a estudios genotóxicos realizados con aditivos colorantes sintéticos utilizados en alimentos, fármacos y cosméticos, es difícil explicar las discrepancias entre los diferentes ensayos de mutagenicidad. Por ejemplo en el caso de tartrazina resultó negativa en el ensayo de Ames (Combes y Haveland-Smith, 1982; Ishidate y col., 1984), pero contrastan con los efectos clastogénicos en células de mamíferos y en células fibroblásticas de hámster (Cameron y col., 1987). El azul brillante desde 1969 no ha sido enlistado en forma permanente para su uso, en un reporte final expedido por la FDA en 1981 (Newsome, 1986) basado en reportes recibidos sobre estudios teratológicos y de reproducción multigeneracionales emitió que no se encontraron efectos adversos; en Canadá se revisaron los estudios desarrollados por la FDA y concluyen que no hay evidencias razonables para establecer la no carcinogenicidad hasta 100ppm (Hatchcock, 1984). Otros autores han descrito que induce la formación de tumores en riñón de ratas por lo que los estudios más profundos y extensos *in vivo* podrían demostrar el probable potencial carcinogénico de este colorante (Cameron y col., 1987).

Los estudios preliminares realizados con el bioensayo de MCN-TRAD con tartrazina y azul brillante indican un efecto genotóxico vía inflorescencia a la concentración de 0.0024mg/ml y 0.014mg/ml respectivamente. Se ha comprobado que éste sistema resulta ser adecuado para evaluar el efecto genotóxico de bebidas no carbonatadas, no alcohólicas; dulces; y bebidas carbonatadas no alcohólicas así como de otros agentes químicos y físicos (Ma y col., 1983; Rojas, 1992; Gómez, 1994; Martínez y Velázquez, 1995), además de ser económico y sencillo de manejar, que proporciona información disponible sobre el riesgo potencial que pudieran tener los agentes evaluados sobre el hombre.

En los anexos 1 y 2 se presentan las características físicas y químicas (Igoe, 1983) así como la estructura química (de Saint Blanquat, 1988; Furia, 1990) de estos aditivos colorantes sintéticos identificados con mayor frecuencia en jugos, dulces, y refrescos respectivamente (Rojas, 1992; Gómez, 1994; Martínez y Velázquez, 1995).

3 GENOTOXICIDAD

El término "genotóxicidad" ha sido utilizado algunas veces como sinónimo de mutagenicidad, sin embargo, existen sustancias no mutagénicas que pueden causar metilaciones aberrantes en el ADN (Kolbye y col., 1983).

3.1 GENES Y CROMOSOMAS

Los genes son unidades de ADN que tienen la capacidad de producir réplicas exactas de ellas mismas (autoreproducción), se organizan en secuencias lineales en los cromosomas. Por lo general los cromosomas son unidades independientes en las células de la reproducción (óvulo y espermatozoide) (Gardner, 1980).

El ADN es una macromolécula constituida de subunidades denominadas nucleótidos. A su vez cada nucleótido se forma de tres partes: un grupo ortofosfato unido a un anillo de desoxirribosa, uniéndose ésta a una base nitrogenada. El ortofosfato y la desoxirribosa tienen una estructura única, la base nitrogenada puede ser de cuatro tipos distintos: puede estar formada por un anillo hexagonal unido a un anillo pentagonal, en cuyo caso se denomina base púrica, con dos tipos principales la guanina y la adenina o bien puede estar constituida de un sólo anillo hexagonal llamándose base pirimídica con las otras dos: timina y citosina. Una vez que se demostró que el ADN era la molécula responsable de la conservación y transmisión de la información hereditaria de los seres vivos se hizo evidente que no sólo su constitución química era importante, sino también la estructura espacial de los componentes de la misma (Levine, 1974).

En 1953, Watson y Crick publicaron un artículo en el cual daban a conocer una estructura para el ácido desoxirribonucleico. Sostenían que el ADN era una molécula con un arreglo tridimensional de doble hélice complementaria, de tal manera que las bases de una cadena se enfrentan con las complementarias de su homóloga formando así su estructura estereoquímica (Freeland, 1981).

De acuerdo con Watson y Crick las dos cadenas se encuentran entrelazadas entre sí a modo de escalera de caracol, o sea, de dos hélices enrolladas una sobre la otra. El esqueleto de cada una de las dos cadenas está formado por las moléculas de ortofosfato y desoxirribosa alternadas. Los peldaños de la escalera están constituidos por las bases nitrogenadas, púricas y pirimídicas, de una y otra cadena enfrentadas entre sí unidas mediante un tipo especial de enlace químico denominado enlace por puente de hidrógeno. La estructura de las bases nitrogenadas es tal que frente a la adenina, (púrica) sólo puede colocarse normalmente la timina, (pirimídica) (Levine, 1974).

La entidad puede ser una proteína, una molécula de ARNt (ARN de transferencia), una enzima o un cierto ARN que finalmente llegue a formar parte de un ribosoma. Sea cual fuere el componente, en la molécula helicoidal del ADN

estará el gen correspondiente. La organización de todas las entidades dan lugar a la formación de un organismo con todas sus características (Hofstadter, 1982).

Los cromosomas son estructuras celulares constituidos por los genes, son corpúsculos presentes en el núcleo celular, que durante la mitosis adquieren forma de bastoncillos, esfera o de V (uve). El número de cromosomas es constante para cada especie, el material genético en el humano consta de 46 cromosomas, de estos 44 se denominan autosomas y 2 son cromosomas sexuales; la mujer tiene 2 cromosomas X y el hombre un cromosoma X y un Y. Los autosomas o cromosomas homólogos poseen características idénticas y en los cromosomas sexuales o heterocromosomas son diferentes.

3.2 MUTAGENESIS

Un mutágeno es un agente ambiental, ya sea físico o químico capaz de inducir cambio en el ADN de un organismo.

Se considera como mutación una modificación en la secuencia de las bases nitrogenadas que constituyen el material genético (ADN) este cambio puede ocurrir en los genes (unidades de información) o en los agrupamientos de genes (cromosomas) (Cortinas y col., 1980).

La mutagénesis, incluye la inducción de daño al ADN y toda clase de alteraciones genéticas, clasificadas desde cambios en uno o varios pares de bases del ADN (mutación genética), gruesos cambios en la estructura de cromosomas (aberración cromosómica) o cambio en el número cromosómico, de este modo cualquier agente capaz de producir esta alteración es considerado mutágeno (Casarett-Doull, 1991).

El daño producido por diversos factores al material genético, a través de la mutagénesis, es uno de los riesgos toxicológicos que no se han valorado suficientemente, a pesar de su repercusión en la salud de los individuos afectados y sus descendientes. Algunos estudios sugieren una relación causal entre la mutagénesis y la transformación maligna de las células (carcinogénesis) y ciertas alteraciones del desarrollo (teratogénesis) (Kalfer, 1971; Trosko y Chang, 1978).

El término "clastogénesis" (producción de un rompimiento) complementa al de mutagenesis para designar el proceso de cambios genéticos el cual aparece microscópicamente como una adición, delección o rearreglo de partes de cromosomas en especies de eucariotes.

Las mutaciones se pueden manifestar clínicamente como padecimientos congénitos (teratogénesis) y carcinogénesis (Infante y col., 1976; Corbett, 1976).

Actualmente existen más de 2000 enfermedades hereditarias. Aproximadamente el 3% de todos los recién nacidos son portadores de anomalías

congénitas que requieren atención médica y cerca del 60% de los abortos que ocurren en 3er. trimestre del embarazo, son consecuencia de aberraciones cromosómicas. Esto pone de manifiesto la contribución de las alteraciones genéticas a la patología humana (Shepard y col., 1975; Ramel, 1978; Fabricant y col., 1978).

Recientemente se ha propuesto que el peligro en la salud por eventos mutacionales que involucra tejidos somáticos y germinales, puede conducir a varios desórdenes somáticos, efectos teratogénicos y padecimientos hereditarios. Además la evidencia directa del origen mutacional de enfermedades somáticas en humanos es limitada, pero inferencias realizadas de resultados experimentales en otros organismos soportan la idea de que algunas enfermedades tienen su origen en mutaciones, esto es particularmente cierto por la relación entre mutaciones somáticas y cáncer, ya que en años recientes los análisis de la activación oncogénica indican fuertemente que las alteraciones específicas del ADN y cromosomas están íntimamente involucrados con el proceso carcinogénico. Basandose en lo anterior se concluye que datos experimentales en mutagénesis y carcinogénesis indican que los factores mutagénicos son importantes en el proceso carcinogénico.

Hay evidencia considerable de que mutaciones cromosómicas y genéticas son factores importantes en carcinogénesis, y que ciertos cánceres humanos pueden ser prevenidos por la identificación de agentes mutagénicos en el medio (Ames, 1979; Ramel y col., 1986), por lo tanto la incidencia de cáncer puede ser reducida al proteger al humano de la exposición a tales agentes (Ames, 1979).

3.2.1 TERATOGENESIS

Se refiere a las alteraciones estructurales y funcionales del desarrollo, desde la formación de los gametos hasta el adulto, y por ende, un teratógeno es un factor endógeno (gene mutante) o exógeno (biológico, físico o químico) que impide el desarrollo armónico del individuo (Leonard, 1975).

La teratogénesis en casos extremos, puede conducir a la muerte embrionaria total, aunque no todas estas muertes son atribuidas al mismo proceso. Además existen factores cuya acción no se considera teratogénica, ya que únicamente producen una reducción en el crecimiento (tóxicidad embrionaria o fetal) o lesiones reparables en el sentido patológico usual (fetopatógenos), sin distorsionar el desarrollo (Zimmerman, 1975).

3.2.2 CARCINOGENESIS

El cáncer o transformación maligna de las células les confiere la capacidad de crecer indefinidamente, provocando la formación de grandes poblaciones que pueden invadir otros tejidos distintos del origen (Cortinas y col., 1980).

Se han propuesto dos tipos de hipótesis sobre el origen de este padecimiento: el primero señala como factor causal a las alteraciones genéticas, basado particularmente en los casos de predisposición hereditaria al cáncer y en la observación de que la mayoría de los agentes carcinogénicos producen mutaciones, el segundo propone mecanismos epigenéticos apoyados en la evidencia de reversiones tumorales y en la incapacidad de algunos carcinógenos para producir mutaciones (Trosko y Chang, 1978).

Los diversos cánceres en el ser humano son padecimientos que se originan a partir de la alteración de una de las muchas células del cuerpo, la cual empieza a dividirse en forma autónoma dando lugar a millones de células como ella capaces de autorreplicarse e invadir el organismo. De acuerdo con el lugar en el que se producen las células, las diversas variedades de cáncer se agrupan en: carcinomas, sarcomas, leucemias y linfomas. Los primeros son los predominantes, ya que representan alrededor del 90% de los casos de cáncer.

Existen evidencias clínicas que señalan que la mayoría de los cánceres en el ser humano muestran algún tipo de alteración relacionada con la diferenciación celular y en muchos de ellos se ha descrito que el proceso de carcinogénesis se inicia con alteraciones pre-neoplásicas, como metaplasias, displasias o papilomas, en las que la célula muestra anomalías en la diferenciación (Fay, 1978).

3.2.2.1 MECANISMOS DE CARCINOGENESIS QUIMICA

En 1940 se propuso que el proceso de carcinogénesis estaba formado de dos etapas: INICIACION y PROMOCION. En la primera, la administración de lo que se conoce como un iniciador da lugar a un cambio que predispone a la célula a la transformación maligna, que se lleva a cabo hasta que la célula se ve expuesta repetidamente a una cantidad suficiente de un agente o una sustancia promotora (Doll y Peto, 1981). Además de la iniciación y promoción, se considera que hay una tercera etapa en el proceso de carcinogénesis denominada PROGRESION. Los patólogos han reconocido una gran heterogeneidad en la morfología tumoral, asociándose a la progresión de los tumores con cambios irreversibles e independientes de una célula a otra, que dan lugar a la multiplicidad de tipos celulares.

La dinámica de la progresión tumoral incluye entre otros, una amplia variedad de alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales en diversos tumores, así como una heterogeneidad en los patrones de metilación del ADN, lo que trae consigo cambios en la expresión génica. Consecuentemente en las fases terminales del cáncer se observan diferencias en la capacidad invasiva de las células cancerosas, en su transplantabilidad y en la sensibilidad a hormonas y fármacos. También se observan cambios en la fosforilación de proteínas, lo que se asocia con la cantidad de sus enzimas, a la vez que se detectan cambios en sus antígenos de superficie (Fugita y col., 1985).

Algunos compuestos químicos pueden participar en las etapas de iniciación y progresión del proceso de carcinogénesis al ocasionar alteraciones en el material genético de las células debido a su capacidad mutagénica, es decir, existe la posibilidad de que un compuesto mutagénico sea también carcinogénico. Incluso, aún cuando este, por sí sólo no provoque alteraciones en el ADN, al asociarse a otros compuestos o bien al sufrir transformaciones dentro del organismo, se puede convertir en mutagénico (Miller y Skinner, 1983; Ames y col., 1987; Leon y col., 1988).

3.2.2.2 RELACION DE LOS HABITOS DIETETICOS CON EL DESARROLLO DEL CANCER

El cáncer, que en su etiología multicausal, incluye a la alimentación, mediante procesos de genotoxicidad, deficiencia inmunitaria y participación de radicales libres entre otros, también puede ser un indicador de las consecuencias de la ingestión de alimentos en forma no adecuada, por ejemplo, hoy en día los hábitos dietéticos se caracterizan por el exceso de calorías aportadas por grasa saturada, colesterol y azúcares, las frutas y verduras en lugar de frescas se consumen enlatadas o previamente cocidas, por lo cual el contenido de fibra disminuye (Lowering, 1985; Connor y Connor, 1989; Sabaté, 1995).

Por lo general el consumo de productos industrializados es alto, la población rural ha tenido progresivamente mayor disponibilidad de productos con más sabor y de fácil preparación, sobre todo los de trigo, arroz y las grasas y azúcares. En poblaciones urbanas ha disminuido la demanda de varios alimentos de origen vegetal y por esta razón se ha incrementado la de alimentos de origen animal y el de productos industrializados incluyendo a los refrescos y a todos los productos del tipo "chatarra" (Chavéz y col., 1993a) que a parte de ser ricos en sal, azúcar y grasa, contienen aditivos colorantes sintéticos que en la mayoría de los alimentos no se menciona el tipo y concentración de estos y en ocasiones la concentración para algunos alimentos puede ser mayor a la recomendada (Vargas y col., 1996).

El número total de calorías consumidas puede alterar el grado de división celular en cualquier órgano en el cual las células están sufriendo mitosis. La grasa total de la dieta influye el riesgo de ciertos tipos de cáncer: mama, próstata y colon. La grasa saturada y el colesterol han estado ligados con las enfermedades cardiovasculares. Una ingestión excesiva de alimentos, pero especialmente de aquellos ricos en calorías y en grasa produce obesidad, la cual da origen a otros padecimientos como la diabetes, hipertensión, hiperlipidemias y aterosclerosis (Flores y Nicola, 1993; Sabaté, 1995).

Estudios epidemiológicos indican una interrelación de diversos factores de la dieta en el desarrollo de cáncer de la mucosa gástrica (Howson y col., 1986; Weisberger, 1986). Las pruebas disponibles sugieren que la mucosa se daña por una dieta rica en sal, lo que aumenta la vulnerabilidad a un carcinógeno derivado de una dieta alta en nitratos y nitritos (aditivos empleados en el proceso de curado).

Al parecer la iniciación y progresión de la enfermedad puede inhibirse si se consumen frutas y verduras frescas, en especial las que contienen vitamina C, que se ha demostrado que inhibe la formación de nitrosamina. La reacción de N-nitrosación también se inhibe con el tocoferol (Mirvish, 1986).

Hay suficiente evidencia para aceptar que el consumo de nitritos, presentes principalmente en las carnes ahumadas y procesadas (jamón, salchicha, etc.) es un factor de riesgo para desarrollar cáncer gástrico. Así como se ha observado que el consumo de sal es más frecuente entre pacientes con este tipo de cáncer comparados con sujetos sanos (López, 1995).

Se sugiere que no es un único nutrimento o una sola clase de alimento, lo que significativamente representa un riesgo para la mayoría de las neoplasias, sino que más bien es el patrón dietético o la mezcla de un variado número de compuestos que se encuentran presentes en muy baja concentración en el aire, agua y alimentos que se consumen diariamente, en estos casos la presencia de sustancias tóxicas se debe principalmente a la contaminación microbiana, residuos de plaguicidas y aditivos de alimentos (Ames y col., 1987; Pariza, 1989; Flores y Nicola, 1993).

La tendencia de consumir en general, alimentos refinados o procesados, disminuye la ingestión de vitaminas, ciertos nutrimentos inorgánicos, así como de fibra que contienen los alimentos en su estado más natural (Lowering, 1985; Connor y Connor, 1989; Sabaté, 1995).

Por tal razón es importante tomar en cuenta los hábitos de alimentación de la población en general, considerando el alto consumo de productos industrializados, sin olvidar que el uso de aditivos colorantes sintéticos, además de nitratos y nitritos pueden llegar a desarrollar un cáncer por su capacidad de alterar el ADN de las células.

Los tumores malignos han aumentado considerablemente en nuestro país, ocupando el primer lugar como causa de muerte en gran parte de la población femenina ya que abarca las edades desde 25-64 años (cuello uterino, traquea, bronquios, pulmón y mama), el segundo lugar en personas de 65 años y mayores (cuello uterino, estómago, traquea, bronquios, pulmón y próstata) así como en mujeres de 15-24 años (leucemia) y en personas de 15-14 años (leucemia), el tercer lugar corresponde a hombres de 45-64 años (traquea, bronquios, pulmón y estómago), el cuarto lugar a hombres de 15-24 años (leucemia), el quinto a hombres de 25-34 años (leucemia y estómago), el sexto es para hombres de 35-44 años (estómago, leucemia, traquea, bronquios y pulmón) y en personas de 1-4 años (leucemia) (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, INEGI, 1999) (Tabla I).

Tabla I. REGISTRO NACIONAL DE TUMORES MALIGNOS, LUGAR QUE OCUPAN COMO CAUSA DE MUERTE SEGÚN SEXO Y EDAD.

TUMORES MALIGNOS	LUGAR SEGÚN SEXO Y EDAD (AÑOS)		
Cuello uterino, estómago, traquea, bronquios y pulmón	2º	F	65 y >
Próstata, traquea, bronquios y pulmón	2º	M	65 y >
Cuello uterino, traquea, bronquios, pulmón y mama	1º	F	45-64
Traquea, bronquios, pulmón, estómago	3º	M	45-64
Cuello uterino	1º	F	35-44
Estómago, leucemia, traquea, bronquios y pulmón	6º	M	35-44
Cuello uterino y mama	1º	F	25-34
Leucemia y estómago	5º	M	25-34
Leucemia	2º	F	15-24
Leucemia	4º	M	15-24
Leucemia	2º	F y M	5-14
Leucemia	6º	F y M	1-4
Tumores malignos	18º	F y M	< 1

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, 1999.

Las comparaciones internacionales de los datos de incidencia y mortalidad, los estudios de caso-control, han apoyado la hipótesis de que algunos tumores se relacionan con la dieta. En México es prevalente el cáncer gástrico, principalmente en sujetos que no consumen frutas ni verduras frescas. El cáncer de vesícula y vías biliares es más frecuente en mujeres obesas, diabéticas o con antecedentes de coleditiasis. La dieta rica en grasas saturadas y baja en fibras dietéticas, se ha asociado con el cáncer de colon, endometrio y vesícula biliar (Carrada, 1992).

Aproximadamente el 90% de todos los cánceres, se correlacionan con los factores ambientales, incluyendo los hábitos alimentarios (Armstrong y Doll, 1975; Wynder y Gori, 1977; Doll, 1992; Potter, 1992). Aunque datos publicados sugieren que el 60% de los cánceres en mujeres y más del 40% en hombres, se relaciona con los hábitos dietéticos (Doll y Peto, 1981), y el porcentaje actual probablemente depende de un número de factores, incluyendo el tipo de tumor examinado y la ingestión relativa de nutrimentos esenciales y no esenciales. Estimaciones más recientes de estudios epidemiológicos describen que aproximadamente el 35% de todas las muertes por cáncer pueden relacionarse con la dieta (Eddy, 1986).

4. ANTIMUTAGENOS Y ANTICARCINOGENOS

Se denominan antimutágenos, a ciertos químicos con propiedades que directa o indirectamente reducen o eliminan la actividad mutágena de otros químicos. De hecho este término fue usado para describir aquellos agentes que

reducen la frecuencia o velocidad de mutación espontánea o inducida, independientemente del mecanismo involucrado (Novick y Szilard, 1952).

La investigación de antimutágenos y anticarcinógenos se encuentra en pleno desarrollo y ha aportado evidencia de la existencia de una gran variedad de sustancias, naturales o sintéticas, que pueden antagonizar la acción de iniciadores o promotores. Dichas sustancias han sido clasificadas, de acuerdo con la etapa del proceso de carcinogénesis en el que ejercen su acción, en agentes que:

- * Inhiben la formación de carcinógenos a partir de sus precursores, como el ácido ascórbico que impide la reacción de nitritos y aminas, evitando la formación de nitrosaminas (Piper y col., 1985).

- * Bloquean el acceso de los agentes cancerígenos a los órganos blanco donde actúan, ya sea impidiendo su activación metabólica (disulfirán), aumentando la actividad de enzimas detoxificadoras (antioxidantes) o la de conjugación de los compuestos, o bien eliminando la forma reactiva de los carcinógenos (glutathione) (Reddy y Lafwuani, 1983).

- * Suprimen la expresión de genes que condicionan la transformación de células iniciadas (retinoides, inhibidores de proteasas, etc.) (Hooper y col., 1987).

Recientemente muchos compuestos provenientes de la dieta normal han mostrado inhibir el daño mutagénico y se refieren a ellos como antimutágenos. Componentes de nuestros alimentos tales como vitaminas, ácidos grasos, fenoles, fibras, elementos trazas, productos de fermentación y porfirinas han manifestado tener actividad antimutagénica en diferentes ensayos *in vitro* (Tabla II)

Los compuestos antimutagénicos pueden ser clasificados de acuerdo a la etapa durante la cual exhiben sus efectos protectivos, y se pueden apreciar en la tabla III, recordando que Waters y col., en 1990 hacen hincapié en la importancia de distinguir entre los agentes antimutágenos que actúan fuera de la célula, llamados desmutágenos y que causan una modificación química o bioquímica del mutágeno antes de que el ADN se dañe; y aquellos agentes que ejercen su función dentro de la célula se llaman bioantimutágenos y reducen la frecuencia de mutaciones que interfieren con el proceso celular.

Los agentes que actúan fuera de la célula (extracelular) reciben el nombre de desmutágenos y causan una modificación química o bioquímica del mutágeno antes de que el ADN sea dañado. Por otra parte los que actúan dentro de la célula (intracelular) se llaman biomutágenos y su función es reducir la frecuencia de mutaciones que interfieran con el proceso celular (Waters y col., 1990).

Solo una parte de los componentes alimenticios poseen propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas y esta doble actividad se le atribuye a las vitaminas antioxidantes y a la fibra (Sugimura, 1986).

Tabla II. COMPONENTES ALIMENTICIOS CON ACTIVIDAD ANTIMUTAGENICA

VITAMINAS	β -caroteno, α -tocoferol, ácido ascórbico
ACIDOS GRASOS	Acido linoleico
FENOLES	Acido clorogénico, cafeico, elagico,
FIBRAS:	Flavonoides Celulosa, salvado
MINERALES:	Selenito de sodio, calcio
PROTEINAS	Caseína, inhibidores de tripsina
AMINAS BIOGENICAS	Triptamina, tiramina
PORFILINAS:	Clorofilina, hemina
PRODUCTOS DE FERMENTACION:	Fragmentos de la pared celular de lactobacilos y estreptococos
PRODUCTOS DE REACCION:	Melanoidinas, dicarbonilos

Aeschbacher, 1989.

Tabla III. CLASIFICACION DE ANTIMUTAGENOS SEGUN SU MECANISMO DE ACCION

<p>A. EXTRACELULAR</p> <ul style="list-style-type: none"> * Inhibidores de la formación endógena de mutágenos * Inhibidores de la absorción de mutágenos * Inactivación de promutágenos o mutágenos
<p>B. INTRACELULAR</p> <ul style="list-style-type: none"> * Agentes bloqueadores: impiden a los mutágenos reaccionar con sitios blancos <ul style="list-style-type: none"> - Inhiben la conversión al carcinógeno final - Incrementan la actividad de enzimas detoxificantes - Reaccionan directamente con electrófilos * Atrapadores de radicales * Agentes supresores que previenen la expresión neoplásica de células iniciales * Agentes moduladores que afectan el sistema de reparación del ADN

Ramel y col., (1986), Waters y col., (1990).

4.1 ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son compuestos o sustancias que se encuentran naturalmente en los alimentos o los hay en forma sintética, evitan o reducen la intensidad de las reacciones de oxidación (adhesión de oxígeno a una molécula) (Uri, 1961; Mahan y col., 1995)

Los radicales libres: son átomos o moléculas reactivas inestables porque tienen electrones no apareados en sus órbitas y tienden a formar enlaces con las moléculas que se encuentran alrededor (Diplock, 1992; Tejero, 1994).

Tipos de radicales libres: Radical hidróxilo (OH), radical superóxido (O_2), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno molecular, radical tiol, hipoclorito, triclorometil oxido nítrico (Wahle y col., 1990; Diplock, 1992; Tejero, 1994).

Se cree que el mayor efecto potencialmente dañino del oxígeno, debe ser la formación y la actividad de las especies reactivas de oxígeno, que actúan como oxidantes, esto es, componentes con tendencia a donar oxígeno a otras sustancias. Las especies reactivas de oxígeno son producidas continuamente en el cuerpo humano, como consecuencia el proceso metabólico normal. Si los radicales libres no son inactivados, su reactividad química puede dañar todos los tipos de macromoléculas, incluyendo, proteínas, hidratos de carbono, lípidos y ácidos nucleicos. Varios de los daños provocados por estas moléculas reactivas están implicados en la causalidad de enfermedades degenerativas. Por ejemplo, los efectos destructivos de las proteínas, puede jugar un papel en el desarrollo de cataratas, el daño en el ADN, esta involucrado en proceso de cáncer y los efectos en los lípidos contribuyen aparentemente a la aterosclerosis (Hennekens y Gaziano, 1993).

Los antioxidantes naturales son aquellas sustancias que están normalmente presentes en los sistemas biológicos y previenen el daño oxidativo. Estos pueden ser:

- * Enzimas: Superóxido dismutasa, glutathion peroxidasa y catalasa.
- * Nutrientes: β -caroteno, tocoferoles, ácido ascórbico, selenio, etc.
- * Metabolitos: Glutathion, ácido úrico.

Los antioxidantes sintéticos pueden ser: Aditivos y medicamentos (Diplock, 1992; Packer, 1994).

Las funciones antioxidantes están asociadas con la disminución del daño al ADN, reducción de la peroxidación lipídica, además epidemiológicamente se relacionan con la disminución de la incidencia de ciertos tipos de cáncer y enfermedades degenerativas, como las enfermedades isquémicas y las cataratas (Marshall y Van Elswyk, 1995).

4.1.1 PROPIEDADES DE ALGUNOS ANTIOXIDANTES NATURALES

Los antioxidantes juegan un importante papel en el sistema de defensa *in vivo* en contra del estres inducido por los radicales libres y por algunas especies de oxígeno. El β -caroteno, la vitamina E y la C son conocidos por su particular importancia en el mantenimiento de la salud y la prevención de enfermedades (Nili y col., 1995).

4.1.1.1 CAROTENOIDES

Los carotenoides son un grupo de pigmentos (rojos, naranjas y amarillos) que se encuentran en los alimentos de origen vegetal, particularmente en frutas y verduras y en los tejidos de animales que se alimentan de plantas. Algunos carotenoides pueden actuar como precursores de la vitamina A y otros no. Esta propiedad no se relaciona con su actividad antioxidante. Importantes carotenos dietarios incluyen: β -caroteno, licopeno, leutina, zeaxantina y β -criptoxantina. El caroteno beta no es tóxico y puede proteger por un mecanismo independiente de su acción como precursor de la vitamina A como antioxidante protector, es capaz de atrapar radicales orgánicos libres tóxicos y moléculas de oxígeno único. Datos limitados en animales sugieren que sus suplementos reducen la frecuencia de tumores inducidos químicamente (Temple y Basu, 1987).

4.1.1.2 VITAMINA E

El término "vitamina E" es un nombre colectivo de numerosos y diferentes tocoferoles y tocotrienoles, los cuales comparten la misma actividad biológica. Esta vitamina es una sustancia liposoluble. Es el mayor antioxidante de las membranas celulares y es un protector de los ácidos grasos poliinsaturados en contra de la oxidación. Se ha dado atención a ésta vitamina porque su función como antioxidante intracelular puede proteger contra el daño cromosómico inducido por carcinógenos. Datos epidemiológicos muestran una relación inversa entre los valores séricos de vitamina E y el desarrollo subsecuente de cáncer (Knekt, 1988).

4.1.1.3 VITAMINA C

La vitamina C (ácido ascórbico) es una sustancia soluble en agua. Se piensa que es el más importante de los antioxidantes en los fluidos extracelulares y también en la actividad intracelular. Las propiedades antioxidantes del ácido ascórbico también pueden influir en la tumorigénesis. En modelos animales este ha mostrado inhibir la formación de nitrosaminas carcinogénas. Estudios epidemiológicos refieren que un aumento en la ingestión de frutas y verduras ricas en ácido ascórbico protege contra el cáncer, en particular de estómago y esófago (Glatthaar y col., 1986).

La Tabla IV muestra las fuentes de alimentos donde podemos encontrar las vitaminas antioxidantes (carotenoides, vitamina E y vitamina C).

Tabla IV. FUENTES ALIMENTARIAS DE VITAMINAS ANTIOXIDANTES

VITAMINA A (Retinol, carotenos: alfa, beta y gamma)	Hígado, riñón, grasa de la leche, yema de huevo, verduras amarillas y verde oscuro, albaricoques, melón, duraznos.
VITAMINA E (Tocoferoles y tocotrienoles)	Germen de trigo, aceites vegetales, verduras de hoja verde, grasa de la leche, yema de huevo, nueces.
VITAMINA C (Acido ascórbico)	Fruta cítrica, tomate, melón, pimientos, col cruda, guayaba, fresas, piña, patata.

Mahan y col., 1995.

4.1.2 IMPORTANCIA DE LOS ANTIOXIDANTES EN LA DIETA

Los antioxidantes son esenciales en la salud humana, en general, sus funciones están asociadas con la disminución del daño al ADN, reducción de la peroxidación lipídica, además están asociados epidemiológicamente con la disminución de la incidencia de ciertos tipos de cáncer y enfermedades degenerativas como las de tipo isquémico y las cataratas. Protegen atrapando los radicales libres reaccionando con ellos antes de que puedan reaccionar con moléculas lipídicas (Marshall y Van Elswyk, 1995).

Los antioxidantes juegan un papel importante en el sistema de defensa *in vivo* en contra del estres oxidativo inducido por los radicales libres o por algunas especies de oxígeno (Nili y col., 1995).

4.1.3 MECANISMOS DE PROTECCION DE ALGUNOS ANTIOXIDANTES

Las vitaminas antioxidantes desempeñan funciones interesantes de protección al organismo contra ciertas patologías, a continuación se mencionan las principales funciones de estas:

4.1.3.1 CAROTENOIDES:

- Relación inversa entre la concentración de caroteno en plasma y el riesgo de padecer cáncer de pulmón, vesícula, estómago y enfermedades vasculares
- Desactiva el O₂---anuladores o extinguidores físicos
- Protección a membranas contra la peroxidación lipídica
- Disminuye la susceptibilidad de las lipoproteínas y otras moléculas vulnerables a sufrir daño
- Fotoprotección a células----disminución en el % de mutaciones y formación de células precancerosas
- Incrementa la comunicación celular
- Previene el crecimiento autónomo del daño celular
(Tejero, 1994; Ensminger y col., 1995)

El β -caroteno es la fuente más importante de la provitamina A y puede servir como antioxidante del cuerpo, es además un colorante natural muy utilizado (Temple y Basu, 1987; Schuep y Schierle, 1997).

4.1.3.2 VITAMINA E:

- Primera línea de defensa contra la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados de fosfolípidos de membranas plasmáticas y subcelulares
- Retarda la rancidez de grasas en los alimentos y tracto digestivo
- Más efectiva en la neutralización de radicales libres en la membrana dando estabilidad y con esto la interrupción de la cadena
- Evita la destrucción de ácidos grasos insaturados y vitamina A en el tracto intestinal y en los tejidos aumentando la actividad de esta
- Protege a las membranas de las sustancias tóxicas formadas cuando existe oxidación de los ácidos grasos insaturados
- Protege a las células del pulmón del daño que puedan causar los componentes del smog, ozono, bióxido de nitrógeno
- Regulador de la síntesis de ADN
- Suplementación de Vitamina E----Disminuye 50% el riesgo de cáncer oral
(Ensminger y col., 1995).

La vitamina E es un antioxidante que debe consumirse regularmente como parte de la dieta humana, por sus innumerables funciones de protección al cuerpo humano.

4.1.3.3 VITAMINA C

- Actúa en el metabolismo como coenzima o cofactor
- Aumenta la absorción del hierro
- Participa en la síntesis de colágeno
- Reduce el riesgo de infecciones
- Es esencial para la oxidación de fenilalanina y tirosina
- Participa en la hidroxilación de ciertos esteroides
- Interviene en la conversión de triptófano a 5-hidroxitriptófano

4.1.4 MECANISMOS DE ACCION DE LOS ANTIOXIDANTES

A pesar de la complejidad de interacciones y del laberinto de posibles mecanismos por los cuales los compuestos naturales pueden ejercer un efecto conjuntamente para proteger al hombre del cáncer, además la gran mayoría de los compuestos discutidos en la Tabla II poseen propiedades antioxidantes naturales, que pueden actuar por diferentes mecanismos y a distintos niveles del organismo (Tabla V) para dar la máxima protección contra el daño mutagénico-carcinogénico (Bartsch y col., 1982; Gichner y Veleminsky, 1988).

Tabla V. MECANISMOS DE ACCION DE LOS COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

<p>1. INHIBICION DE FORMACION DE NITROSAMINAS</p> <p>Competición con reacción electrofílica de nitrito con aminas secundarias</p>
<p>2. COLECTOR DE MOLECULAS REACTIVAS</p> <p>Atrapa metabolitos electrofílicos cargados positivamente o colector e radicales oxígeno</p>
<p>3. MODULACION DE MONOOXIGENASA/SISTEMA ENZIMATICO "DEFENSA RADICAL"</p> <p>Alteración de electrones de NADPH</p>
<p>4. ANTIPROMOCION</p> <p>Radicales libres involucrados en la promoción del tumor</p>

Aeschbacher, (1989).

4.1.5 ESTUDIOS CON ANTIOXIDANTES RELACIONADOS CON LA PREVENCIÓN DEL CÁNCER Y OTRAS PATOLOGÍAS

Se ha comprobado que personas con una alta ingesta de vitamina E, tienen un menor riesgo de enfermedades coronarias. La suplementación con esta vitamina 100 UI por dos o más años fueron asociadas con una disminución del 37% del riesgo al ataque cardíaco en hombres y del 48% en mujeres (Stampfer y col., 1993; Rimm y col., 1993).

Algunos investigadores han presentado evidencia de que la vitamina E y otros antioxidantes fenólicos retardan el envejecimiento y previenen el desarrollo de cáncer (Sortwell, 1995).

Otros estudios han demostrado que la vitamina A (ácido retinoico y retinoides), al igual que la vitamina E (tocoferol) y la vitamina C (ácido ascórbico) desarrollan un importante papel como factor regulador e influye en el crecimiento, diferenciación y regresión de células cancerígenas, aún más, puede revertir las células cancerosas normales en varios tipos fenotípicos tanto *in vivo* como *in vitro* (Lupescu, 1993).

La vitamina A, β -carotenos (provitamina A), E y C, reducen y detienen de manera significativa la incidencia de cáncer en piel, colon, estómago, esófago, glándula mamaria, vejiga y pulmón (Lupescu, 1993).

Los carotenoides, especialmente los β -carotenos poseen un efecto antitumoral en muchos tipos de cáncer en animales y humanos, de lo cual se deduce que el poder quimiopreventivo no está relacionado a su conversión a vitamina A (Lupescu, 1993).

Resultados de numerosos estudios epidemiológicos y de laboratorio sugieren que los carotenoides pueden ser importantes en la prevención de varios tipos de cáncer (Krinsky, 1993; Gerster, 1993; Van, 1993) y el consumo de una dieta rica en carotenoides y después un diagnóstico de cáncer ha sido asociada con un pronóstico más favorable (Ingram, 1994; Jain y Miller, 1994).

En Lixian, China la administración de 15 mg de β -caroteno sintético, 50 mg de selenio y 30 mg de α -tocoferol por día durante 5 a 6 años redujo la incidencia de cáncer del tracto gastrointestinal alto, comparado con otras combinaciones de vitaminas y nutrimentos inorgánicos en una gran población de adultos desnutridos (Blot y col., 1993).

Investigaciones de laboratorio han mostrado que la oxidación de lípidos puede promover aterogénesis y que los antioxidantes pueden retardar este proceso (Steinberg y col., 1984). Estudios prospectivos han sugerido que los individuos con

altas ingestiones de β -caroteno y vitamina E tienen más bajo riesgo de enfermedad coronaria y ataque cardíaco (Gaziano y col., 1994).

Estudios en los cuales se utilizaron conejos como animales de experimentación mencionan que los efectos antihipercolesterolemicos de β -caroteno y los efectos antioxidantes del alfa-tocoferol pueden beneficiar a estos animales alimentados con una dieta aterogénica, por la inhibición del desarrollo de lesiones ateroscleróticas (Jidong y col., 1997).

Otro estudio indica que el β -caroteno en la dieta disminuye significativamente las lesiones ateroscleróticas aórticas en conejos hipercolesterolemicos (Shaish y col., 1995).

La importancia de la vitamina E en la inhibición de las lesiones ateroscleróticas ha sido reportada por varios investigadores (Prasad y Kalra, 1993; Lafont y col., 1995; Kazdova y col., 1995).

Smith y col., en 1994 demostraron que la inyección intravenosa de β -caroteno disminuye la progresión de aterosclerosis, observando una menor área de placa aterosclerótica en la aorta torácica de cerdos alimentados con este antioxidante (Ziemiński y Panczenko-Kresowska, 1994).

De acuerdo a estos estudios mencionados se puede observar que no sólo existen sustancias dañinas en la dieta (aditivos colorantes sintéticos) sino que los alimentos también poseen componentes que contrarrestan cierto tipo de patologías. Estudios experimentales y epidemiológicos han demostrado que el alto consumo de una dieta rica en frutas, verduras, cereales y nueces ha sido asociada como factor de protección contra efectos carcinogénicos y relacionados con mutágenos y actividad clastogénica de agentes genotóxicos (Bjelke, 1974; Graham y col., 1978; Shu y col., 1989), debido al contenido de vitaminas, entre ellas A, E y C que pueden actuar como alimentos antioxidantes preventivos contra el cáncer y aterogénesis. Estudios realizados por Abbey y col., en 1995, demostraron que una dieta suplementada con β -carotenos y vitamina C proveniente de frutas y verduras presentó un efecto protector sobre la oxidación de las LDL-colesterol. En estudios longitudinales la vitamina E ha mostrado una asociación inversa con la enfermedad cardiovascular (Ishidate y col., 1984). La cantidad requerida para evitar la oxidación de las LDL-colesterol es difícil de alcanzar sin un aumento en el consumo de grasa en la dieta; por lo tanto algunos autores recomiendan que la incorporación sea por medio de complementos alimenticios (Combes y Haveland-Smith, 1982; Martínez y Velázquez, 1995).

Es de suma importancia seguir investigando sobre compuestos naturales que permitan disminuir la incidencia de diversas patologías, entre ellas el cáncer. Tal es el caso de algunas microalgas como *Chorella spp.*, *Dunatiella spp.*, *Scenedesmus spp.*, *Aphanizomenon flos-aguae* y *Spirulina* como fuente de alimento

para humanos, es una opción que han considerado los países sobrepoblados, y se han estudiado extensivamente para ser utilizadas como alimento.

La microalga del género *Spirulina*, en especial las especies *S. maxima* y la *S. platensis*, han sido investigadas (Clement y col., 1967; Devi y col., 1979; Santillan, 1982; Becker, 1988; Lacaz-Ruiz y Mos, 1990; Dillon y Phan, 1993) como alimento y como fuente de ciertos tipos de compuestos debido a que representan un potencial de uso muy amplio como complemento alimenticio.

Existen reportes en los cuales se manifiesta el uso de *S. maxima* y *S. platensis* como alimento, los datos más antiguos son de hace 1000 años, y eran precisamente los Aztecas quienes la consumían ordinariamente (Díaz del Castillo, 1928), datos más recientes del consumo de *Spirulina* son los obtenidos en 1940 en Chad, Africa (Bourges y col., 1971).

Este trabajo se enfocará a estudiar el género *Spirulina*, especie *maxima*, con el fin de corroborar su inocuidad para las células de *Tradescantia* y de proponer este recurso de origen natural como un alimento funcional, los cuales se definen como aquellos que intervienen en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades y que al ser ingeridos regulan los procesos corporales, aumentando los mecanismos inmunológicos, participan en prevención de enfermedades específicas como el cáncer, retardan los procesos de envejecimiento, entre otros (Milner, 1994) y como complemento alimenticio, siendo una fuente alternativa de vitaminas antioxidantes como β -caroteno y tocoferol, cuyas funciones en el organismo son necesarias para prevenir cierto tipo de patologías, entre ellas el cáncer. Además contiene otros nutrimentos como aminoácidos esenciales y no esenciales, ácidos grasos esenciales, por mencionar algunos.

5. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA MICROALGA *Spirulina maxima*

El término alga se aplica a la mayoría de las plantas con clorofila, con excepción de aquellas en las que el cigoto normalmente comienza su crecimiento y desarrollo como un parásito de la planta progenitora (Cronquist, 1986).

Las algas verde-azuladas se definen como procariotas, que de ordinario tienen clorofila y pigmentos de ficobilina liberando oxígeno como resultado de la fotosíntesis. Su estructura protoplasmática procariótica las distingue de todas las otras algas y el sistema fotosintético que poseen las diferencia de las bacterias. Dichas algas se encuentran en todo el mundo, tanto en aguas dulces como saladas, como en habitats subaéreos húmedos, son más abundantes cerca de la superficie que en las profundidades de más de unos cuantos metros (Cronquist, 1986).

Spirulina maxima es una microalga perteneciente a la familia *Oscillatoriaceae*, la cual se caracteriza por cadenas de células en forma espiral, parece ser la propiedad más distintiva que permite separar los géneros

pertenecientes a *Oscillatoriaceae*. Del género *Spirulina* se conocen diversas especies, siendo las más estudiadas *Spirulina maxima* y *Spirulina platensis* (Ciferri y Tiboni, 1985).

La clasificación propuesta por Trainor en 1978 es la siguiente:

Reino: Monera
División: Cyanophyta
Familia: Oscillatoriaceae
Género: *Spirulina*
Especie: *maxima*

El alga *Spirulina maxima* es una cianobacteria Gram (-), fotoautótrofa, pluricelular, esporulada que tiene un habitat acuoso con alta salinidad y alcalinidad, por cultivarse en soluciones fuertemente alcalinas no se contamina fácilmente con organismos patógenos o saprófitos. Pueden obtenerse cultivos en masa a nivel de laboratorio (Gallegos, 1993; Lemoine y col., 1993; Tredici, 1993).

Las algas verde-azules comunmente almacenan alimento en forma de pequeños gránulos de carbohidrato en combinación química con proteínas. La fracción de carbohidrato de estos gránulos se conoce como almidón cianoficeo, el cual se ha comparado con frecuencia con el glicógeno proveniente de los animales y es un poliglucano ramificado, que frecuentemente contiene cantidades pequeñas de pentosas y otros azúcares hexósicos (Weisz, 1972; Cronquist, 1986).

Existen dos métodos muy conocidos para cultivar el género *Spirulina* particularmente *S. maxima* y *S. platensis*: uno de ellos es artificial y otro seminatural, éste último fue desarrollado por la compañía Mexicana Sosa Texcoco y consiste en aprovechar la alcalinidad natural de los estanques del Lago de Texcoco, a los cuales se les agrega fertilizante para aumentar la producción; este método arrojó buenos resultados durante los años 1973-1982 logrando obtener aproximadamente 3000 toneladas durante este período, es decir, una producción de casi 2.7 kg/m² por año (Santillan, 1982).

Este microorganismo puede crecer en medios que normalmente no se emplearían para fines agrícolas, incluyendo áreas desérticas, áreas con aguas que contienen pH altos (Trainor, 1978; Ciferri y Tiboni, 1985) y zonas acuosas con altas concentraciones de sal; el cultivo de microalgas no contribuye a la erosión del suelo, en ocasiones requiere de pequeñas cantidades de pesticidas o herbicidas o puede prescindir de estos, además necesita una mínima energía para cultivarla y procesarla; puede secarse al sol, por calor o por congelación. De tal manera que esta microalga puede crecer y desarrollarse en cualquier país usando materiales simples y sin tecnología sofisticada.

5.1 COMPOSICION QUIMICA DE *Spirulina maxima*.

En la Tabla VI se muestra la composición química del alga *Spirulina maxima* seca.

Tabla VI. COMPOSICION QUIMICA DEL ALGA *Spirulina maxima* SECA

PROTEINA	70.00%
AMINOACIDOS ESENCIALES	
Isoleucina	4.13%
Leucina	5.80%
Lisina	4.00%
Metionina	2.17%
Fenilalanina	3.95%
Treonina	4.17%
Triptófano	1.13%
Valina	6.00%
AMINOACIDOS NO ESENCIALES	
Alanina	5.82%
Arginina	5.98%
Acido aspártico	6.43%
Cistina	0.67%
Acido glutámico	8.94%
Histidina	1.08%
Prolina	2.97%
Serina	3.18%
LISINA DISPONIBLE	85.00%
LIPIDOS	7.00%
ACIDOS GRASOS	
Laúrico	229mg/kg
Míristico	644mg/kg
Palmitico	21,141mg/kg
Palmitoleico	2,035mg/kg
Heptadecanoico	142mg/kg
Esteárico	353mg/kg
Oleico	3,009mg/kg
Linoleico	13,784mg/kg
α -Linolénico	11,970mg/kg
γ -Linolénico	427mg/kg
Otros	699mg/kg
CENIZAS	9.00%
Calcio	1,315mg/kg
Fósforo	8,942mg/kg
Hierro	580mg/kg

Continuación...(Tabla VI)

Sodio	412mg/kg
Cloro	4,400mg/kg
Magnesio	1,915mg/kg
Manganeso	25mg/kg
Zinc	39mg/kg
Potasio	15,400mg/kg
Otros	57,000mg/kg
CAROTENOIDES	4,000mg/kg
β-caroteno	1.700mg/kg
Xantofilas	1.600mg/kg
CARBOHIDRATOS	16.50%
Ramnosa	9.00%
Glucano	1.50%
Ciclitoles	2.50%
GLUCOSAMINA Y ACIDO MURAMICO	2.00%
Glicógeno	0.50%
Acido Siálico y otros	0.50%
ACIDOS NUCLEICOS	4.50%
Acido ribonucleico	3.50%
Acido desoxirribonucleico	1.00%
VITAMINAS	
Biotina	0.40mg/kg
Cianocobalamina	2.00mg/kg
d-Ca-pantotenato	11.00mg/kg
Acido fólico	0.50mg/kg
Inositol	350.00mg/kg
Acido nicotínico	118.00mg/kg
Piridoxina	3.00mg/kg
Riboflavina	40.00mg/kg
Tiamina	55.00mg/kg
Tocoferol	190.00mg/kg

Santillan (1982)

5.2 ESTUDIOS RELACIONADOS CON EL VALOR NUTRICIO DE *Spirulina maxima* EN ANIMALES Y HUMANOS

Robles y col., en 1975 evaluaron el valor nutricio de la harina de *S. geitleri*, sinónimo de *S. maxima* en cerdo ya que esta microalga representa una fuente alternativa de proteína (65%) además de un completo perfil de aminoácidos y se pretende emplear como sustituto de pastas, oleaginosas y de harinas de pescado; las dietas de los animales que ordinariamente están compuestas de pasta de soya se sustituyeron por pulverizado de *Spirulina* y por una mezcla de L-lisina en base

de sorgo-pulverizado de *Spirulina*, estimando parámetros de importancia tales como fase de crecimiento y finalización, así como características de la canal (largo, grosor de la grasa dorsal, porcentaje de jamón, lomos) los resultados de este estudio indican la factibilidad de emplear *Spirulina maxima* como fuente de proteína suplementaria en la alimentación de cerdos.

Con los datos anteriormente obtenidos por Robles y col., en 1975 sobre el posible uso de *S. maxima* y conciente de la alta demanda económica para la alimentación animal, en 1976 Calderón y col., deciden probar la misma harina de *Spirulina* (proporcionada por Sosa Texcoco) como fuente de proteína para rumiantes (borregos y becerros) enriqueciendo sus dietas con diferentes porcentajes de *Spirulina*; determinando ganancia de peso, crecimiento y conversión alimentaria. Los resultados logrados indican que el pulverizado de *Spirulina maxima* puede sustituir completamente a las pastas proteicas comunmente empleadas (pastas de ajonjolí y de soya) en raciones para becerros y borregos adultos.

En la avicultura, un problema de gran importancia es la pigmentación de la yema del huevo debido a que la coloración de ésta depende exclusivamente de la concentración de xantófilas en el alimento. Un microorganismo que posee cantidades significativas de xantófilas es *Spirulina* (siendo este de 1600 mg/kg) (Mendoza y Pino, 1964).

Con estos antecedentes Avila y Cuca en 1974, llevan a cabo un estudio con gallinas para comparar biológicamente el efecto pigmentante de la harina de *Spirulina maxima*, en relación con la harina de flor de cempasúchil, esta última es la fuente natural más rica de xantófilas y provee de coloración aceptable a los productos avícolas; las xantófilas se administraron a los siguientes niveles 15, 30 y 45 mg/kg de harina de *Spirulina* y de harina de flor de cempasúchil respectivamente, valorando la coloración de la yema de huevo mediante el abanico colorimétrico de Roche. Los resultados que arrojó este estudio indican una vez más que *S. maxima* es una buena fuente de xantófilas y es biológicamente más potente como pigmento que la harina de flor de cempasúchil, a pesar de que ésta última es más rica en xantófilas.

El estudio anterior sirvió de pauta para la evaluación de *Spirulina* como sustituto de la pasta de ajonjolí o de soya de las dietas para gallinas de postura y su valor pigmentante comparado con el de carotenoides sintéticos tales como carofil amarillo y carofil rojo, estos son los usados por algunos avicultores para la fabricación de alimento debido a la coloración aceptable que proveen a la yema; investigación realizada por Bezares y col., 1976. La *Spirulina* se añadió en niveles de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 % en sustitución de la pasta de ajonjolí; los resultados de esta investigación apoyan la idea del uso de *Spirulina maxima* para reemplazar parte de la fuente proteica de la dieta y a la vez impartir pigmentación a la yema, ya que es una buena fuente de proteína y de pigmento en dietas para gallina, recomendando el uso de 2 a 3% de *Spirulina* en las dietas para obtener una coloración aceptable

al mercado (niveles más altos deben limitarse debido al color que imparten a la yema de huevo).

Existe otro estudio, en el cual se determinó la eficiencia proteica (PER) y la utilización neta de las proteínas (NPU) de *S. maxima* y de *S. platensis*, con el fin de evaluar la composición química del alga y estimar la calidad proteica así como la tolerancia de esta en las dietas de ratas. La obtención satisfactoria de resultados con respecto a la composición química, tolerancia animal y calidad de proteína indican que las dos especies de esta alga pueden ser un excelente alimento para animales, especialmente para la avicultura, pero es sólo el principio para tratar de desarrollar productos para mejorar la nutrición humana (Bourges y col., 1971).

Los estudios mencionados anteriormente que han sido desarrollados en diferentes animales (ratas, cerdos, gallinas, borregos y becerros) en los cuales *Spirulina* fue añadida en su totalidad o parcialmente a las dietas comunes, confirman el uso de *Spirulina* para consumo animal recalcando la aceptación de esta microalga por los animales, pero haciendo énfasis especial en la ausencia de reportes de efectos tóxicos.

Pruebas indiscutibles del uso de *Spirulina* por el hombre, son los datos reportados por Dangeard (en 1940 y las revisiones realizadas en México precortesiano) y recopilados por Ciferri, 1983 donde se manifiesta el uso similar que dan a *Spirulina* estas poblaciones, lo que permite suponer que esta alga no tiene propiedades tóxicas.

Estos datos sirvieron de base para incluir *Spirulina* en dietas humanas, se tienen reportes de Pirie en 1975 quien cita resultados de experimentos efectuados en México, donde atletas mexicanos ingerían dosis de aproximadamente 20 a 40 g de esta microalga en seco (pulverizado) diarios durante dos períodos de 30-45 días obteniendo excelentes resultados.

Reportes similares son los citados por Durand-Chastel (1980) sobre pruebas efectuadas en niños quienes sufrían severa desnutrición de tercer grado y a los cuales se les administró *Spirulina* por lo menos un año obteniendo mejores resultados que con la soya.

Un estudio más amplio es realizado en 1976 por Sautier y Tremolieres en Paris, Francia, donde evalúan la aceptabilidad alimentaria de *Spirulina maxima* en humanos, realizando desde encuestas básicas sobre: su aspecto e impresión general en productos culinarios tales como sopas, omelettes, cremas y postres; así como un estudio dirigido a la evaluación nutricia de esta microalga, el cual consistió en la administración de una suspensión de *Spirulina* durante 4 a 6 días mediante sonda gástrica a cinco adultos desnutridos, la suspensión contenía 15, 30 y 50% de *Spirulina* para complementar la tasa proteica requerida. Los resultados fueron favorables, obteniéndose una significativa ganancia de peso y observándose un balance de nitrógeno positivo; en otros parámetros biológicos evaluados se reportó

un modesto incremento de ácido úrico en el suero pero no en la orina y no hubo reportes sobre efectos adversos ni tóxicos.

Se realizaron estudios con *Spirulina* en una población infantil, demostrando que esta microalga es un buen alimento para niños sobre todo mezclada con un poco de leche (Bourges y col., 1971).

La evaluación de la composición química de *Spirulina* y los numerosos estudios relacionados a sus características nutricias, confirman que el pulverizado de *S. maxima* y *S. platensis* representan una valiosa fuente de proteína alimentaria que si bien presenta un contenido de metionina+cisteína y lisina ligeramente menor a las proteínas de referencia tales como la lactoalbumina y el patrón proteico de la FAO (Food and Agricultural Organization).

En la tabla VII se observa el contenido de aminoácidos de *Spirulina* del Lago de Texcoco (México), así como la del Lago Chad (Africa) comparada con la proteína patrón de la FAO.

Tabla VII. CONTENIDO DE AMINOACIDOS DE *Spirulina* SECA DE LOS LAGOS DE TEXCOCO Y CHAD (mg/100 mg proteína)

AMINOACIDOS	TEXCOCO	CHAD	PROT PATRON (1957)
Valina	5.1	6.1	4.2
Leucina	6.8	7.6	4.8
Isoleucina	4.4	4.4	4.2
Fenilalanina	5.2	4.5	2.8
Lisina	3.6	3.2	4.2
Metionina	2.1	3.7	2.2
Triptófano	1.1	1.6	1.4
Treonina	5.0	5.0	2.8
Total de A.A	33.3	36.1	26.6

Bourges y col., 1971.

Como puede observarse, existen ciertas diferencias entre las proteínas de ambos tipos de alga que pueden deberse a que pertenecen a distinta especie o a que son diferentes en el medio de cultivo o en el proceso de secado.

En comparación con el patrón de la FAO la *Spirulina* africana esta limitada por su contenido en lisina (74% del patrón), mientras que la mexicana es pobre en lisina, metionina y triptófano (85%, 93% y 80.7%) del patrón respectivamente, por tanto, aunque es pobre en tres aminoácidos en ninguno alcanza la pobreza de lisina del alga africana y así la "calificación química" que es un parámetro de calidad y que se expresa como la calidad porcentual del aminoácido más limitante en relación a un patrón como el de la FAO, la proteína del huevo, etc. es ligeramente mayor en el alga de Texcoco, 85.7% que en el alga de Chad, 76.1%.

La *Spirulina* seca es un verdadero concentrado proteico (64-74% de la masa total) y lo que es especialmente importante, que su proteína tiene una composición de aminoácidos que le confiere una alta calidad relativa (74-81% del patrón) (Bourges y col., 1971).

Ensayos *in vitro* indican que la proteína proveniente de *Spirulina maxima* es nutricionalmente superior a las proteínas de las leguminosas entre ellas la soya, pero inferior a la proteína cárnica (Becker y Venkataraman, 1982).

Así parece que la alta concentración de proteína, junto con la composición de aminoácidos hace de *Spirulina* una muy buena fuente de estos nutrimentos de interés considerable.

En la actualidad a nivel mundial, las algas son utilizadas para diferentes propósitos, destacándose la obtención de ficoloides y su empleo directo en la alimentación humana (Chapman y Chapman, 1980). El hábito de ingerir algas y la preparación de ellas varía en forma importante de un país a otro. La gran variabilidad de debe principalmente a las materias primas disponibles y a la idiosincracia y preferencias de cada país o región.

Con respecto a las algas comestibles de Chile, las que se consumen en forma tradicional por el hombre pertenecen a las algas pardas (*Cochayuyo* y *Ulte*), verde (*luche verde*) y rojas (*luche rojo*). El cochayuyo (Familia Durvilleaceae, Especie *Durvillea antarctica*) se obtiene a partir de las frondas secadas al sol; el ulte es el talo y parte del disco adhesivo de la *Durvillea antarctica*, que se lava y se somete a ebullición con el objeto de ablandarlos y se comercializa cocido y fresco. En menor escala se consumen el *luche verde* (Familia Ulvaceae, Especie *Ulva lactuca* y el *luche rojo* (Familia Bangeaceae, Especie *Porphyra columbina*) que se expenden generalmente al estado precocido en forma de panes (Instituto Nacional de Normalización 1984; Schmidt-Hebbel, 1981).

Las especies *Ulva lactuca* y *Porphyra columbina* se encuentran a lo largo de toda la costa chilena y la *Durvillea antarctica* se distribuye entre la zona central y

sur central del país. La ingesta de algas es en general baja en nuestro país, salvo en zonas determinadas donde existe el hábito de su consumo, en forma de ensaladas, sopas y guisos.

Desde hace varios miles de años las algas contribuyen a ser un alimento muy estimado y consumido en el mercado oriental. En Occidente no existe una tradición análoga. El empleo de algas como alimento específico se abandonó en general en Europa y América del Norte durante el siglo pasado (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación 1976). Actualmente, también en estos países se están apreciando "vegetales marinos como una fuente de alimentos naturales".

5.3 CARACTERÍSTICAS TERAPÉUTICAS DE *Spirulina maxima*

Es de interés describir algunas de las actividades terapéuticas que sobre *Spirulina* se han reportado.

Esta microalga debido a sus componentes ha llamado la atención de los investigadores por las características terapéuticas que ofrece. Belay y Ota en 1993 al revisar investigaciones clínicas en las cuales se empleó *Spirulina* elaboran un resumen referente a los efectos terapéuticos que proporciona al organismo.

5.3.1 Efectos sobre el metabolismo de lípidos

Estudios realizados por Nayaka y col., en 1988, donde tomaron dos grupos de hombres con las mismas características clínicas de hiperlipidemia, alto colesterol y ligera hipertensión; añaden igual cantidad de *Spirulina* a sus dietas sin modificación alguna de éstas, siendo el período de tratamiento de 8 semanas continuas para un grupo y de 4 para el otro; mostrando una disminución significativa de colesterol sérico al ingerir *Spirulina* constantemente, mientras que la interrupción del tratamiento origina una disminución en el nivel de colesterol sérico para posteriormente regresar al valor inicial, así los investigadores concluyen que *Spirulina* reduce el colesterol sérico y promete tener efectos favorables sobre enfermedades del corazón como aterosclerosis, sin presentar efectos adversos.

En 1990 Iwata y col., tratan ratas hiperlipidémicas inducidas por la administración oral de fructosa al 68% con 5, 10 y 15% de *Spirulina*, observándose ganancia de peso, inhibición en el incremento de colesterol, fosfolípidos y triglicéridos debido al aumento significativo de la actividad de la lipoproteína-lipasa.

5.3.2 Estimulante del sistema inmune

En 1994 Quereshi y col., estudiaron la actividad de un extracto acuoso de *Spirulina* sobre el sistema inmune, el extracto aplicado en cultivos de macrófagos

ocasiona una mejor respuesta de estas células en la fagocitosis así como en la secreción del factor tumoral.

Una investigación muy completa es la efectuada en ratones por Hayashi y col., en 1994, quienes emplearon sistemas *in vivo* e *in vitro* para demostrar que *Spirulina* y un extracto de ésta mejoran la respuesta inmune; los animales alimentados con dietas que contenían 10 y 20% de *Spirulina* mostraron un incremento en las células productoras de anticuerpos, en el porcentaje de células fagocíticas y en la proliferación de células del bazo. Los estudios *in vitro* efectuados con un extracto acuoso de *Spirulina*, muestran un incremento en la proliferación de cultivos de células del bazo.

El conjunto de estos resultados insinúan que *Spirulina* mejora la respuesta inmune, particularmente la respuesta primaria por la estimulación de la función macrófago, fagocitosis y producción de Interleucina-1.

Evets, en 1994 realizó un estudio en la población infantil que habita en áreas altamente radiactivas, encontrando incrementados sus niveles de inmunoglobulinas E; estos niños al ser tratados diariamente con *Spirulina* durante 6 semanas, normalizaron sus niveles de inmunoglobulinas E y consecuentemente disminuyó la frecuencia de alérgias, mientras que al grupo al cual no se le administró *Spirulina* no mostró cambios en sus niveles.

5.3.3 Efecto anticancerígeno y antitumoral

Existen estudios que clasifican a la *Spirulina* como anticancerígeno y antitumoral. Schwartz y col., en 1988, compararon la eficiencia en la prevención del desarrollo de tumores en la bolsa bucal de hamster y en ratón posiblemente por estimulación de la respuesta inmune (Babu, 1995), en dietas ricas en cantaxantina y β -caroteno y de un extracto de microalgas *Spirulina-Dunatiella* administrado topicamente; los resultados muestran una ausencia completa de tumores gruesos y microcopicamente la bolsa bucal presenta áreas localizadas de displasia así como destrucción temprana del carcinoma "in situ" de los animales tratados con el extracto, mientras que los tratados con cantaxantina exhiben una reducción significativa en el tamaño y número de tumores.

Spirulina maxima posee nutrimentos que son de interés para los investigadores, tal es el caso de los polisacáridos, los cuales pueden inhibir la proliferación de células ascíticas de hepatoma de ratón (Lisheng, 1991).

5.3.4 Efecto protector a la radiación

Sabiendo que la radiación ionizante es un mutágeno potente, en 1989 Qishen y col., demostraron que un extracto alcohólico de *Spirulina* administrado oralmente a ratones horas antes de irradiarlos con rayos gamma; reduce la frecuencia de eritrocitos policromáticos nucleados en médula osea, lo que indica

que el extracto actúa como radioprotector y disminuye el daño inducido por la radiación.

Debido al desastre de Chernobyl, millones de personas viven en peligrosas zonas radiactivas a causa de la contaminación en un área de 11,000 millas cuadradas de agua, tierra y alimentos, es por eso que éstas víctimas del envenenamiento radiactivo presentan enfermedades congénitas de nacimiento, leucemia, cáncer alteraciones de la tiroides, anemia, pérdida de la visión y del apetito, así como la depresión del sistema inmune. Un programa desarrollado por el Instituto de Medicina de la Radiación en Minsk Bielorusia, demostró que los elevados niveles de radionúclidos tales como Cesio-137 y Estroncio-90 presentes en los organismos de niños, se reducen en un período de 20 días al administrarles diariamente *Spirulina*, sugiriendo que ésta microalga actúe como un sorbente natural de estos radionúclidos y así poder dar más y mejor vida a estos pequeños (Loseva y Dardynskaya, 1993).

5.3.5 Reducción de nefrotoxicidad debida a drogas y metales pesados

Fukino y col., en 1990, observaron que la toxicidad renal causada por mercurio era suprimida al añadir *Spirulina* a las dietas de ratas y un extracto acuoso de *Spirulina* reduce significativamente la toxicidad renal causada en ratas por drogas de uso farmacéutico como para-aminofenol (empleado para aliviar el dolor) y cisplatino (droga anticarcinogénica) concluyendo que el pigmento azul contenido en el extracto es el que provee la mayor parte del efecto protector contra fallas renales causadas por mercurio y drogas farmacéuticas.

5.3.6 Actividad contra el virus del SIDA

El programa del Instituto Nacional de los Estados Unidos de Norte América, está encargado de descubrir nuevos agentes antitumorales y antivirales de origen natural; en los estudios *in vitro* realizados en 1989 por Gustafson y col., como parte de este programa, encontraron que un amplio número de extractos de algas verde-azules, ricos en sulfolípidos exhibían una notable actividad contra el virus del SIDA, además las células T-Helper (auxiliadoras) expuestas a los extractos sulfolípidicos de estas algas fueron protegidas de la infección por VIH-1. Esto hace suponer que *Spirulina* pueda presentar una actividad similar, ya que también posee sulfolípidos, por lo tanto esto conlleva a posteriores investigaciones.

5.3.7 Efectos farmacológicos y antitoxicológicos

En la literatura hay informes de que *Spirulina* presenta algunas propiedades farmacológicas entre las que descatacan su efecto hipocolesterolemizante (Iwata y col., 1990), hipoglucemizante (Takai y col., 1991), y en el restablecimiento del sistema inmune. Se ha encontrado que el consumo de *Spirulina* reduce la concentración de colesterol en suero y en hígado, además hay disminución del

peso corporal de pacientes obesos sin alteraciones clínicas ni bioquímicas (Becker, 1986; Iwata y col., 1990).

Los estudios crónicos, subcrónicos y de Toxicología de reproducción que se han realizado demuestran que la cianobacteria esta excenta de toxicidad, teratogenicidad y genotóxicidad. Aún cuando la *Spirulina* se ha consumido por tiempos prolongados, se ha observado que en los hamster en gestación no se producen nacimientos de fetos deformes, ni reabsorciones embrionarias o disminución del peso al nacer, además tampoco ocasiona efectos adversos sobre la fertilidad, la duración de la gestación ni sobre diferentes indicadores del desarrollo de neonatos (Salazar y col., 1996; Chamorro y col., 1996). Otros estudios realizados en ratas demostraron que *Spirulina* no presentó datos de toxicidad en estos animales después de un tratamiento subcrónico (Salazar y col., 1998).

El resurgimiento y uso de estas cianobacterias se debe al enorme potencial que representan para la investigación de nuevos principios con actividad terapéutica, además de la importancia médica, económica y social que ofrecen (Patterson y col., 1993). Otras investigaciones realizadas en ratas demostraron que *Spirulina* no presentó datos de toxicidad en estos animales después de un tratamiento subcrónico (Salazar y col., 1998).

Las algas tienen un papel importante económicamente, ofreciendo diversos beneficios, los cuales dependen de sus características y cualidades; entre estos se mencionan la capacidad de fertilizar suelos, obtención de pigmentos para uso industrial tales como β -caroteno, xantófilas, clorofila, algunas otras algas sintetizan vitamina D y otras aportan cantidades apreciables de vitamina B, C y K (Pelczar, 1988).

Además de las aportaciones mencionadas *Spirulina maxima* es una buena fuente de pigmentos (clorofilina, β -caroteno y ficocianina) los cuales podrían ser empleados como colorante de origen natural para alimentos: pastas, barras de dulces, goma de mascar, frituras, bebidas además como complemento alimenticio en forma de tabletas, cápsulas y líquidos (Kay, 1991), razones que la hacen atractiva para las industrias alimentarias y aquellas interesadas en cuidar la salud.

De acuerdo a los estudios que se han mencionado con *Spirulina maxima* en relación a sus propiedades nutricias y terapéuticas es importante ampliar los conocimientos sobre su inocuidad, así como también de su posible efecto de quimioprotección sobre genotóxicos presentes en la dieta humana como algunos aditivos colorantes sintéticos para lograr su aceptación y poder garantizar su uso como complemento alimenticio y su acción terapéutica de origen natural, en bien de la salud pública.

Es de gran interés investigar sobre los alimentos con propiedades antimutagénicas y/o anticarcinogénicas así como de otros beneficios a la salud, por ejemplo, disminución en la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas por mencionar el cáncer. Por este motivo se estudiará la microalga *Spirulina maxima* ya que una de las metas de nuestro país es mejorar el proceso de la nutrición y contribuir a reducir la tasa de mortalidad debida a ciertas patologías relacionadas directa o indirectamente con la alimentación. Esta microalga es un recurso natural poseedor de varios compuestos necesarios para el organismo y algunos de sus nutrimentos (aminoácidos, ácidos grasos, β -caroteno, tocoferol, calcio, hierro, zinc, etc.) desempeñan un papel importante con la disminución del cáncer y otras enfermedades por ejemplo: desnutrición, aterosclerosis, hipercolesterolemias, enfermedad coronaria, infecciones virales, entre otras). Es así que este concentrado de proteínas y otros nutrimentos, además de pigmentos, pudiera usarse como complemento alimenticio por ser un alimento muy completo desde el punto de vista nutricional, además como alimento funcional ya que permite prevenir contra el daño génico causado por contaminantes ambientales a los cuales el hombre está comunmente expuesto.

En la actualidad, las investigaciones realizadas con *Spirulina maxima* giran en torno al posible uso de esta como complemento alimenticio para animales y humanos principalmente.

6. ENSAYOS BIOLÓGICOS PARA IDENTIFICAR GENOTÓXICOS

Como se mencionó anteriormente es importante evaluar la capacidad mutagénica de las sustancias químicas como un indicador de riesgo de cáncer (Kolbye y col., 1983; Ames y col., 1987; Lijinsky, 1989).

Por lo cual es necesario realizar pruebas de genotoxicidad en relación a lo que frecuentemente se expone el ser humano y de esta manera poder prevenir daños o enfermedades a corto, mediano y largo plazo.

Las pruebas de genotoxicidad tienen por objetivos demostrar cualitativamente la presencia o ausencia de capacidad mutagénica o carcinogénica de agentes químicos y físicos, servir de guía para la evaluación y cuantificación del riesgo genético humano por la exposición a tales agentes, así como evaluar los efectos reproductivos y teratogénicos (Vega, 1985).

Las numerosas pruebas para evaluar la actividad genotóxica de los agentes químicos permiten determinar distintos tipos de alteraciones genéticas tanto en células somáticas como reproductoras, *in vivo* e *in vitro* (Vega, 1985).

Algunas de las pruebas han sido más utilizadas que otras, constituyéndose en bases de datos para calcular su grado de sensibilidad y especificidad. Se entiende por sensibilidad la proporción de agentes genotóxicos conocidos que dan

resultados positivos en el sistema de prueba; y por especificidad, la proporción de compuestos no genotóxicos que dan resultados negativos en el sistema de prueba.

Existen dos pruebas de genotoxicidad. Las pruebas de larga duración, que apuntan a evaluar la carcinogenicidad y teratogenicidad, en períodos que van desde meses hasta años; se efectúan fundamentalmente *in vivo*, en mamíferos. Las de corta duración son diseñadas para demostrar, en un término de días hasta meses, según la prueba, la capacidad mutagénica de la sustancia estudiada (Vega, 1985a; Ma, 1986).

La forma más eficaz de determinar el riesgo para los seres humanos de desarrollar cáncer como resultado de la exposición a agentes químicos es a través de estudios epidemiológicos, los cuales involucran la comparación del estado de salud de individuos que han estado expuestos a la sustancia en cuestión con un grupo que no ha estado expuesto. Sin embargo, ésta vía presenta serias dificultades, es demasiado lenta, y cuando se detecta un agente como carcinógeno, ya ha ocasionado un grave daño a la salud (Schramm, 1984; Ames y col., 1987).

La importancia de la mutagénesis en el origen del cáncer ha impulsado el diseño de ensayos rápidos para determinar la capacidad mutagénica de los productos químicos (Kolbye y col., 1983; Leon y col., 1988), entre ellos se mencionan la prueba de Ames, la transformación neoplásica de fibroblastos, el ensayo de micronúcleos en eritrocitos de ratón, el ensayo de cromosomas de rana, el ensayo de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* (OPS, 1980; Vega, 1985b; Ma, 1986; Lijinsky, 1989; Ruíz y col., 1992).

A continuación se nombran las pruebas más usuales en la identificación de mutágenos:

- * Pruebas en ADN aislado
- * Pruebas en microorganismos
 - Virus
 - Bacterias (Pba. de Ames, reversión Trp+ en *Escherichia coli*)
 - Hongos
- * Pruebas en células de mamífero en cultivo
- * Pruebas en plantas ("hierba del pollo") *Tradescantia* paludosa, cebolla común (*Allium cepa*) y el haba (*Vicia faba*).
- * Pruebas en insectos
- * Pruebas en mamíferos no humanos
- * Pruebas en humanos

Diversas investigaciones (Gichner y col., 1994; Foltínova y Gones, 1996; Hoogenboom y Kuiper, 1997) sugieren que algunos ensayos a corto plazo que han sido útiles en la detección de mutágenos, pueden ser efectivos en la identificación de antimutágenos, de esta manera, un modo alternativo para

disminuir la tasa de mutación y consecuentemente la incidencia de cáncer, puede ser identificando antimutágenos efectivos e incrementar nuestra exposición a ellos (Ramel y col., 1986; Thebaudin y col., 1997; Stoner y col., 1997) especialmente a través de nuestra dieta (Gaziano y Hennekens, 1996).

Entre los ensayos a corto plazo se encuentra el sistema de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia*. Se pueden utilizar varias especies, variedades y clones de *Tradescantia*. Esta investigación se realizó con el clone 4430 de *Tradescantia*, un híbrido interespecífico de *T. subcalis* y *T. hisutiflora*, su número cromosómico es pequeño, florece todos los días por un período de 5 meses, sus flores se forman de 3 pétalos azules, 3 sépalos y 6 estambres.

6.1 *Tradescantia*

Tradescantia pertenece a la familia de las commelináceas, es una planta que se puede propagar por reproducción vegetativa, florece diariamente por varios períodos de tiempo, sus flores son moradas, es herbácea con hojas estrechas que terminan en punta. Las inflorescencias se localizan en la parte terminal de la rama, forman un conjunto de 16 yemas florales que se mantienen en diferentes etapas de desarrollo (Fig. 1). En cada uno de los 6 estambres hay un par de anteras en las cuales se localizan las células del polen (Ruíz y col., 1992).



Figura 1. *Tradescantia*

Es importante conocer la duración de cada una de las etapas de la meiosis, lo cual nos permite seleccionar los tiempos de tratamiento y recuperación o meiótico que comprenden el estado de desarrollo más sensible de la planta. (Ma, 1983).

En este bioensayo se utilizan las células meióticas como células blanco y los micronúcleos son el punto final. Se basa en la alta sensibilidad que presentan los cromosomas vegetales de la meiosis a los agentes físicos y químicos (Sax, 1938). Estudios realizados por Ma y col., en 1983, al ciclo meiótico de *Tradescantia* demostraron que la Profase I es la etapa más susceptible a la acción de los agentes agresores originando micronúcleos, los cuales se forman a partir del rompimiento de cromosomas, cromosomas enteros dañados en su centrómero o inactivados por alteración al uso meiótico produciendo así material nuclear excluido del núcleo principal, observándose claramente en la etapa de tétradas del mismo ciclo.

Este sistema se ha utilizado para el monitoreo in situ de mutágenos gaseosos y radiación; bioensayos de clastogenicidad de contaminantes ambientales líquidos, drogas y aditivos comunes (Ma, 1983).

Esta prueba revela directamente la magnitud del daño cromosómico de las células germinativas de un eucariote, y es considerada como una de las más eficientes de nuestros tiempos capaz de detectar compuestos genotóxicos, la cual fue desarrollada durante los años 1976-1978 y su estandarización y validación fueron efectuadas por Ma en 1981 comprobando que esta prueba es apropiada para la rápida evaluación de mutagenicidad causada por agente físicos y químicos tanto en fase líquida como gaseosa, fármacos, bebidas comunes (Ma y col., 1983) y en la detección de contaminantes en agua potable, residual (Ma y col., 1983; Ruíz y col., 1992), bebidas refrescantes no alcohólicas (Ruíz y col., 1993), para el ensayo de genotoxicidad de colorantes presentes en productos cárnicos (Ledezma y Alvarez, 1990) y aditivos colorantes sintéticos (por ejemplo tartrazina y azul brillante) empleados en jugos, dulces y refrescos (Rojas, 1992; Gómez, 1994; Martínez y Velázquez, 1995).

Con éste sistema también se han realizado estudios para evaluar el efecto antígenotóxico de fenoles presentes en frijol (Estrada, 1995), igualmente con extractos y pigmentos: β -caroteno, clorofilina y ficocianina obtenidos de alga *Spirulina maxima* (Paz, 1997), obteniéndose de un 38 a un 79% de inhibición en la frecuencia de micronúcleos inducida por el mutágeno (hidrazida maleico). Estos resultados muestran la eficiencia del sistema lo que le permite ser una herramienta útil para éste tipo de estudios.

II HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

El extracto del alga *Spirulina maxima* ejerce efecto antigenotóxico sobre la acción de agentes inductores de genotoxicidad.

1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial antigenotóxico de *Spirulina maxima* para inhibir la genotoxicidad inducida por algunos componentes comúnmente presentes en alimentos como son los aditivos colorantes sintéticos (tartrazina y azul brillante) mediante el sistema de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* (MCN-TRAD).

2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Corroborar el efecto genotóxico de los aditivos colorantes sintéticos mediante el sistema de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* por vía inflorescencia.

Evaluar el efecto antigenotóxico con el sistema de MCN-TRAD del extracto de *Spirulina maxima* así como de sus pigmentos y sus diferentes mezclas a las concentraciones identificadas en el pulverizado de *Spirulina* mediante la inhibición de la frecuencia de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* inducida por los aditivos colorantes sintéticos (tartrazina y azul brillante).

III MATERIAL Y METODOS

La microalga *Spirulina maxima*, utilizada en la presente investigación fue cultivada y cosechada seminaturalmente en los estanques de la Compañía Sosa Texcoco; una vez cosechada la *Spirulina* se rompe por homogenización o sonicación de las células y el fluido obtenido es pasteurizado para eliminar contaminación microbiológica y el producto final se seca por aspersión, siendo éste un fino polvo verde-azul conocido también como pulverizado de *Spirulina maxima*, y fue proporcionado por el Laboratorio de Investigación Preclínica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

1 OBTENCION DEL EXTRACTO POLAR (ACUOSO) A PARTIR DEL PULVERIZADO DE *Spirulina maxima*

Se colocaron 10 g del pulverizado de *Spirulina maxima* en 100 ml de agua destilada, manteniéndose en agitación continua durante 13 h a temperatura ambiente (TA), posteriormente la muestra se colectó y se centrifugó a 4500 RPM en una centrifuga Beckman Modelo JZ-21 durante 20 minutos a temperatura de 23°C, el extracto así obtenido contenía una gran cantidad de partículas no disueltas, por consiguiente se eliminaron los sólidos suspendidos mediante otra centrifugación. El sobrenadante obtenido se concentró en un rotavapor (Caframo W 2000-Heidolph WB 2000) a temperatura de 60°C eliminando agua hasta una concentración de 168 mg/ml (168 mg de materia extractable por ml de extracto) la cual se calculó llevando hasta sequedad el extracto y pesando la materia extractable. El sobrenadante se recolectó y almacenó bajo condiciones apropiadas de temperatura (4°C) y en ausencia de luz hasta su estudio Biológico (Fig. 2)

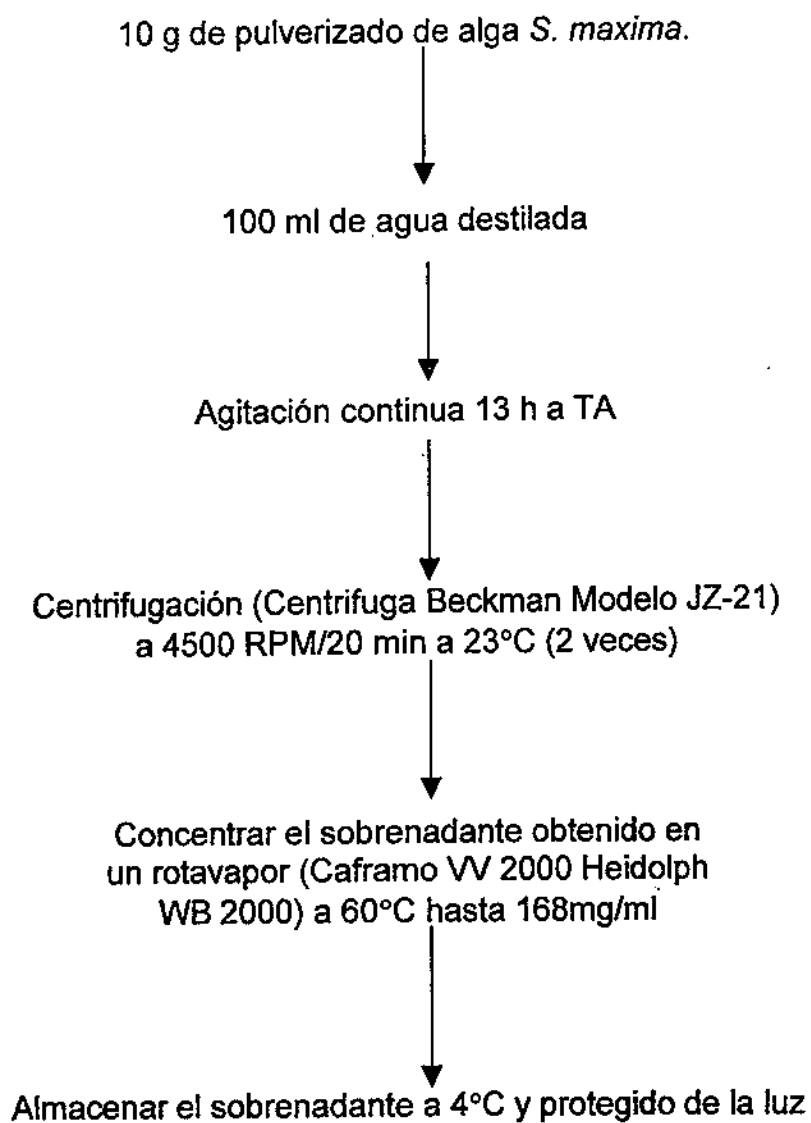


Figura 2 DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA OBTENCION DEL EXTRACTO POLAR (ACUOSO) A PARTIR DEL PULVERIZADO DE ALGA *Spirulina maxima*

2 IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE FICOCIANINA EN EL PULVERIZADO DE *Spirulina maxima*

El pigmento ficocianina, se obtuvo mediante el método descrito por Gantt y col., 1979 aplicándolo al pulverizado de *Spirulina maxima*. Se colocaron 2 g del pulverizado en 40 ml de buffer de fosfato de potasio (0.01 M, pH = 7), posteriormente se agitó por 20 minutos a TA y se centrifugó a una velocidad de 3500 RPM en una centrifuga Clay Adams Modelo Dynac por 10 minutos a TA, después se agregaron 40 ml de buffer al sedimento agitando y centrifugando bajo las condiciones antes mencionadas, este procedimiento se repitió 3 veces más hasta completar 200 ml de extracto. Finalmente el extracto se centrifugó a 21000 RPM empleando una centrifuga refrigerada Beckman Modelo JZ-21 durante 1 h a TA. Al sobrenadante obtenido se le agregó sulfato de amonio hasta obtener una saturación del 50%, posteriormente se colocó en hielo hasta la formación de un precipitado azul y se centrifugó a 5000 RPM en una centrifuga refrigerada por 15 minutos a 0°C, el precipitado obtenido se disolvió en agua destilada fría (4°C) y se almacenó a 4°C en ausencia de luz para su posterior identificación.

La identificación y cuantificación del pigmento ficocianina en el extracto acuoso así como en su extracción a partir del pulverizado de *Spirulina maxima* se realizó espectrofotométricamente efectuando un barrido (desde 300 a 700 nm) y una lectura directa de su absorbancia en espectrofotómetro UV/VIS (Beckman, Modelo DU-65) a 620 nm, comparando con datos reportados en la literatura científica (Gantt y col., 1979; Paz, 1997).

2.1 ECUACIONES PARA EL CALCULO DEL CONTENIDO DE FICOCIANINA

Para realizar el cálculo de la concentración del pigmento ficocianina en la microalga *Spirulina maxima* se utilizó la siguiente ecuación:

$$C = \frac{(A)(FD)(Vol. muestra)(1000)}{(E)(b) (peso muestra)}$$

Donde:

C = Concentración (mg/kg)

A = Absorbancia a 620nm

E = Coeficiente de extinción = 8.620 ((mg/ml)cm)⁻¹

b = Longitud de la celda = 1 cm

FD = Factor de dilución

Vol. final del buffer en ml

Peso de la muestra en g

1000 = Factor de conversión de g a kg

3 ENSAYO BIOLÓGICO

Los bioensayos a corto plazo son necesarios para la evaluación de mutágenos. La prueba de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* (MCN-TRAD) clon 4430 es considerado como uno de los bioensayos a corto plazo más eficientes de nuestros tiempos, capaz de detectar compuestos genotóxicos como aditivos colorantes sintéticos presentes en jugos, dulces y refrescos (Rojas, 1992; Gómez, 1994; Martínez y Velázquez, 1995). Fármacos y bebidas comunes (Ma y col., 1983; Ruiz y col., 1999). Así como antígenos por ejemplo, fenoles presentes en el frijol (Estrada, 1995), además de extractos y pigmentos de alga *Spirulina maxima* (Paz, 1997).

Este sistema fue desarrollado durante los años 1976-1978 y su estandarización y validación fue realizada por Ma en 1981.

3.1 PROPAGACION Y CULTIVO DE *Tradescantia* CLONE 4430

La planta *Tradescantia* clon 4430, es un híbrido interespecífico de *T. subcáulis* y *T. hirsutiflora*, para su cultivo y propagación se requirió de un invernadero donde se le dieron las condiciones adecuadas para su óptimo desarrollo: temperatura de 21-26°C durante el día y alrededor de 16°C durante la noche. Para favorecer la floración se necesitó un fotoperíodo de 16-18 h de luz por lo tanto, se administró luz suplementaria (1800ft-candelas de luz fluorescente y 180 ft candelas de luz incandescente) y una humedad relativa de 60-80% (Ma, 1983). Las plantas se cultivaron en una mezcla de arena y tierra de hoja en una proporción 1:3.

Además fueron necesarios otros cuidados como: fertilización utilizándose una mezcla de compuestos sólidos NPK (5:10:5) y micronutrientes (B, Mn, Zn, Cu, Mo), los cuales se aplicaron cada 30 días; se removió la tierra de las macetas, se cortaron inflorescencias viejas y hojas adultas, el control de plagas (pulgón verde y blanco) se realizó eliminándose manualmente.

3.2 ENSAYO GENOTÓXICO

En el Departamento de Mutagénesis Ambiental del CEACA-UAQ se emprendió un programa para identificar y cuantificar aditivos colorantes sintéticos en bebidas no carbonatadas no alcohólicas, dulces y bebidas carbonatadas no alcohólicas de mayor consumo en la Ciudad de Querétaro (Rojas, 1992; Gómez, 1994; Martínez y Velázquez 1995) mediante el sistema de MCN-TRAD, se identificaron con mayor frecuencia los aditivos colorantes sintéticos tartrazina y azul brillante. Se realizó una curva dosis-efecto partiendo de la concentración identificada en los productos, mediante la cual se observó un efecto genotóxico.

Se llevaron a cabo estudios preliminares, con la finalidad de definir las concentraciones de tartrazina y azul brillante que por vía inflorescencia indujeran genotoxicidad tomando como referencia las cifras obtenidas en los ensayos del

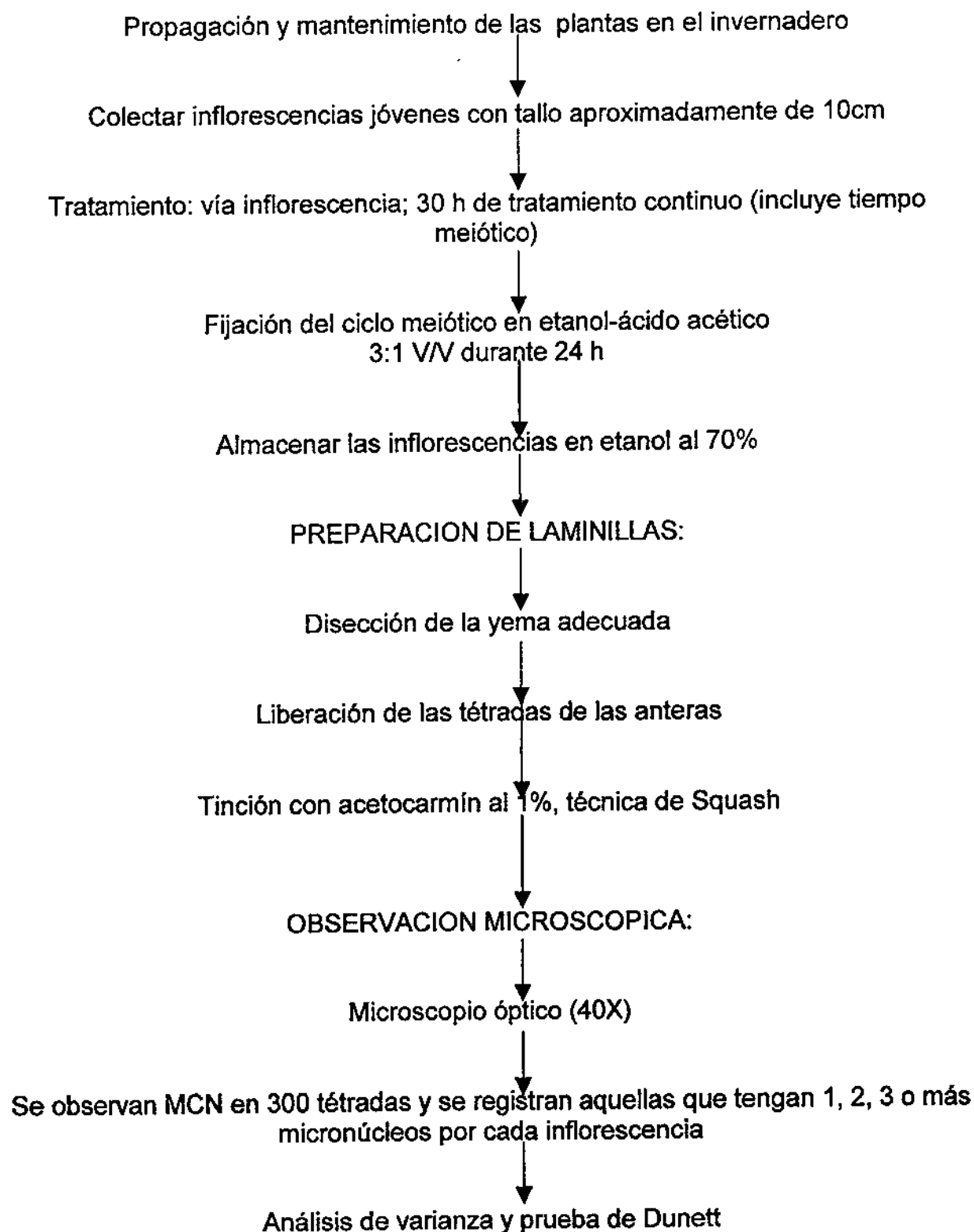


Figura 3 DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL ENSAYO GENOTOXICO Y ANTIGENOTOXICO (SISTEMA DE MCN-TRAD) CLONE 4430

objetivo de 40X, contándose 300 células por inflorescencia y registrándose las células normales y aquellas con 1, 2, 3, o más micronúcleos, determinando el % de MCN de cada uno de los grupos experimentales.

De la misma forma se evaluó la capacidad antígenotóxica de los pigmentos clorofilina, β -caroteno y ficocianina tanto individual como en mezcla con respecto al efecto genotóxico inducido por los aditivos colorantes sintéticos (tartrazina y azul brillante). Para los dos primeros pigmentos utilizados en este estudio se emplearon sus estándares (Sal de sodio y cobre, Sigma y Trans- β -caroteno, Sigma) a las concentraciones de 5.1312 mg/kg y 33.71mg/kg respectivamente, identificados y cuantificados en el extracto de *Spirulina maxima* por Paz en 1997. En el caso del pigmento ficocianina fue extraído del pulverizado de ésta microalga, siguiendo con la metodología descrita en el estudio químico obteniéndose una concentración de 112761.02 mg/kg.

Clorofila y ficocianina son pigmentos hidrosolubles y β -caroteno es liposoluble por esta razón se solubilizaron en distintos compuestos polares como el agua y dimetilsulfóxido al 1% respectivamente.

El porcentaje de inhibición se obtuvo mediante la capacidad de disminuir la frecuencia de micronúcleos inducida por los aditivos colorantes sintéticos (tartrazina o azul brillante) aplicándose la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \left[1 - \frac{\% \text{ de MCN del antígenotóxico}}{\% \text{ de MCN inducido por el genotóxico}} \right] \times 100$$

El grupo experimental se conformó por un control negativo (agua destilada), el control positivo o genotóxico (tartrazina o azul brillante), los ensayos antígenotóxicos con el extracto acuoso de *Spirulina maxima* y sus pigmentos clorofilina, β -caroteno y ficocianina con sus respectivos controles. Los datos se obtuvieron de tres experimentos independientes, contando 300 células en 5 y 15 preparaciones por experimento correspondiendo estas a 5 y 15 inflorescencias para controles y ensayos antígenotóxicos respectivamente.

4 ANALISIS ESTADISTICO

Mediante los datos de frecuencia de micronúcleos sobre los ensayos genotóxicos y antígenotóxicos se calculó la media y la desviación estándar para todos los tratamientos y se aplicó el análisis de varianza y la prueba de Dunett comparando tratamientos con un control negativo (agua destilada) con una significancia del 95% (Gacula y Singh, 1984).

IV RESULTADOS

1 CONTENIDO DE FICOCIANINA EN EL EXTRACTO ACUOSO Y EN EL PULVERIZADO DE *Spirulina maxima*.

La ficocianina se extrajo e identificó a partir del pulverizado de *Spirulina maxima* cuyo espectro de absorbancia obtenido se muestra en la Fig. 4. Se observó que este pigmento presentó un pico máximo a 620nm, como lo demuestran también algunos autores (Gantt y col., 1979) (Fig. 5).

Los resultados de ficocianina tanto en el extracto como en el pulverizado de *Spirulina maxima* (Tabla VIII) son semejantes a los obtenidos por Paz en 1997 (1405.78 mg/kg, 116064.54 mg/kg respectivamente). El extracto de esta microalga se obtuvo a la concentración de 168 mg/ml.

Tabla VIII. CONTENIDO DEL PIGMENTO FICOCIANINA EN EL EXTRACTO ACUOSO DE ALGA *S. maxima* ASI COMO EN SU PULVERIZADO.

CONTENIDO DE FICOCIANINA (mg/kg)

1 EXTRACTO	1143.4856	(1.14g/kg)
2 PULVERIZADO	112761.02	(112.76 g/kg)

1 Se utilizó para su extracción fosfato de potasio 0.01M (pH = 7)

2 Se obtuvo a partir de 10g de *S. maxima* en 100 ml de agua destilada

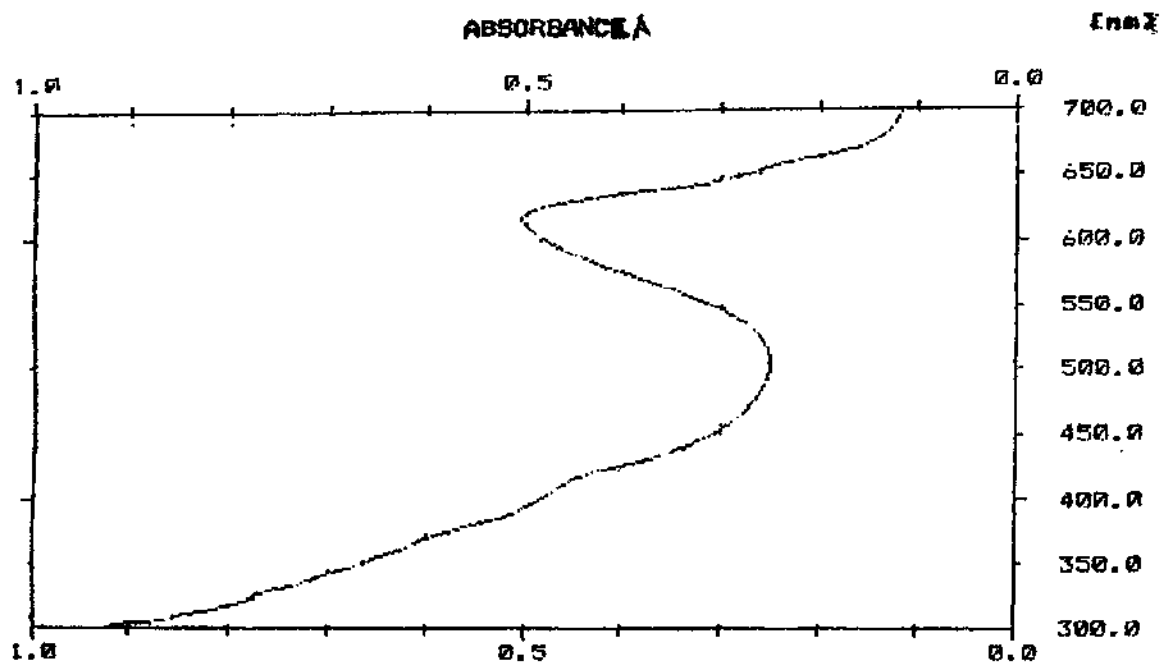


Figura 4 IDENTIFICACION ESPECTROFOTOMETRICA DEL PIGMENTO FICOCIANINA EN EL PULVERIZADO DE *Spirulina maxima*

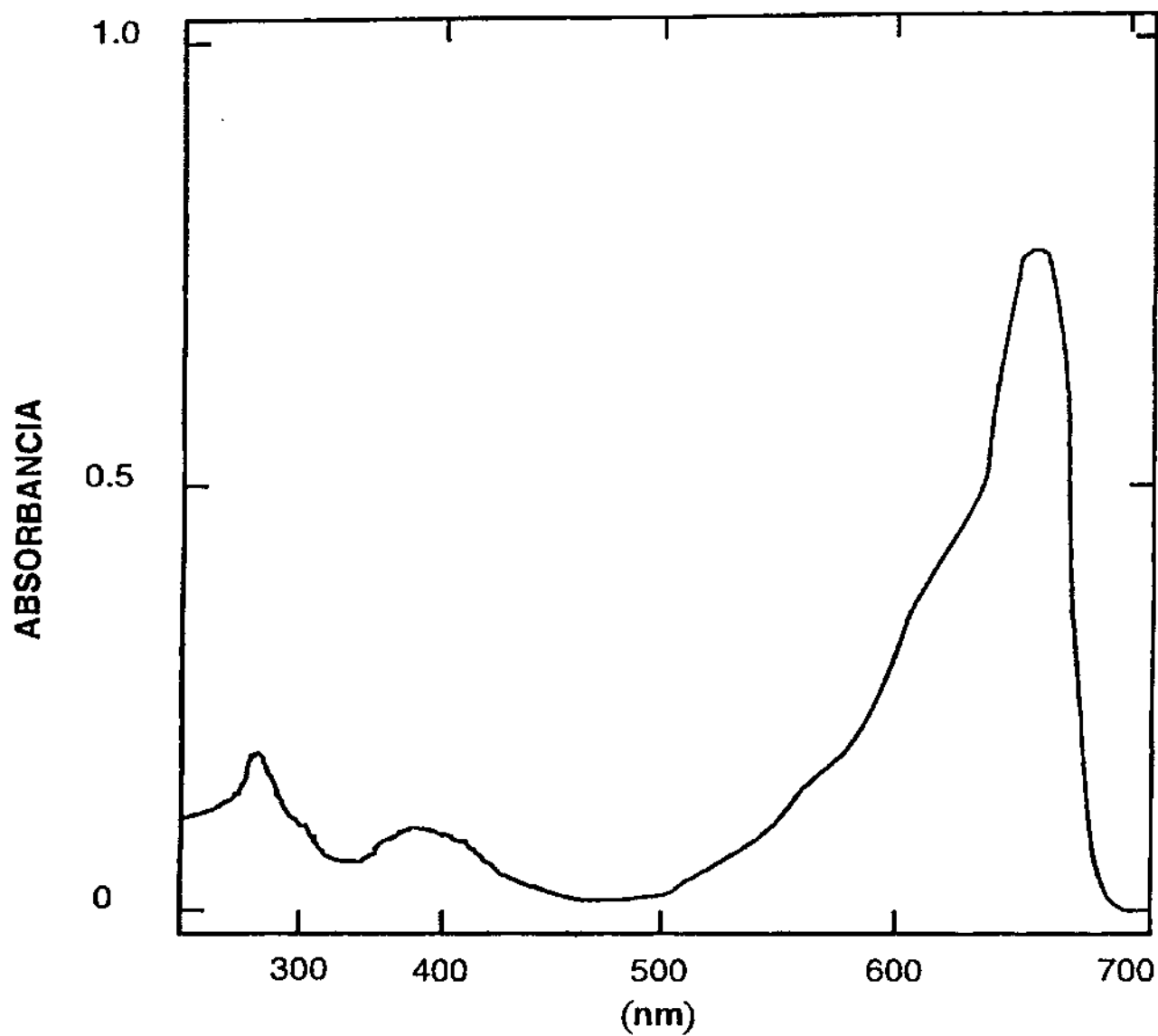


Figura 5 ESPECTRO DE ABSORBANCIA DEL PIGMENTO FICOCIANINA (Gantt y col., 1979)

2. ENSAYOS BIOLÓGICOS CON EL ADITIVO COLORANTE SINTÉTICO TARTRAZINA.

2.1 GENOTOXICIDAD INDUCIDA CON TARTRAZINA

En la Tabla IX se muestran los resultados de genotoxicidad de las células meióticas de *Tradescantia* con el aditivo colorante sintético tartrazina a la concentración de 0.0024 mg/ml, aplicándose por vía inflorescencia; reportando la frecuencia de MCN en 100 tétradas tanto para el tratamiento como para su control negativo (agua destilada). En esta tabla se muestra que tartrazina induce un efecto genotóxico hasta un 7.52 ± 2.32 MCN/100 tétradas. Los resultados del análisis estadístico (Dunett) empleados para este efecto genotóxico se observan en la Tabla X en la cual se presenta diferencia significativa del aditivo colorante sintético con respecto al control negativo.

Tabla IX FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS (MCN) EN CELULAS MEIOTICAS DE *Tradescantia* CLONE 4430 INDUCIDA EN EL ENSAYO GENOTOXICO CON TARTRAZINA Y SU CONTROL NEGATIVO.

MCN/100 TETRADAS	
CONTROL NEGATIVO	TARTRAZINA (0.0024mg/ml)
3.27±0.83	8.06±1.72
3.88±0.66	8.33±3.87
3.53±0.37	7.53±1.44
3.79±0.44	6.86±1.60
3.13±1.26	7.79±1.99
3.13±0.69	6.26±1.93

Control negativo: Agua destilada

Valores de media y desviación estándar en el ensayo genotóxico

Tabla X RELACION ESTADISTICA DE LA DIFERENCIA DE MEDIAS DE DUNETT PARA LA FRECUENCIA DE MCN EN CELULAS MEIOTICAS DE *Tradescantia* CLONE 4430 INDUCIDA POR TARTRAZINA, COMPARADA CON UN CONTROL NEGATIVO (AGUA DESTILADA).

Tratamiento	q	$p_{0.05} = 2.639$
Tartrazina	5.855	**
	7.193	**
	5.210	**
	4.367	**
	5.548	**
	3.608	**

Si el valor de q es mayor que 2.639 indica:

** = Significativo con respecto al control negativo ($p < 0.05$)

2.2 ANTIGENOTOXICIDAD CON EXTRACTO ACUOSO DE *Spirulina maxima* Y SUS PIGMENTOS: CLOROFILINA, β -CAROTENO Y FICOCIANINA EN FORMA INDEPENDIENTE Y EN SUS RESPECTIVAS MEZCLAS Y COMO GENOTOXICO TARTRAZINA.

La Tabla XI muestra la frecuencia de micronúcleos (MCN) en células meióticas de *Tradescantia* inducida en los ensayos antígenotóxicos con extracto acuoso de *Spirulina maxima* y sus pigmentos clorofilina, β -caroteno y ficocianina aplicados en forma independiente y en mezclas, así como por sus respectivos controles, empleando tartrazina como inductor de genotoxicidad. Se puede observar que la frecuencia de MCN en los controles varía de 3.06 ± 0.80 a 4.29 ± 0.91 MCN/100 tétradas mientras que la obtenida con tartrazina es de 7.52 ± 2.32 MCN/100 tétradas y en los ensayos antígenotóxicos se observa en cada uno de ellos una disminución de MCN con respecto a la obtenida con tartrazina. Los resultados se analizaron mediante el estadístico de Dunnett, mostrándose en la Tabla XII, donde se observa que la presencia de ficocianina mezclada con los demás pigmentos presenta una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con respecto al control negativo (agua destilada), lo cual quiere decir, que tartrazina manifiesta su efecto genotóxico y que los pigmentos protegen parcialmente a las células de *Tradescantia* del daño inducido por este colorante.

En la Tabla XIII se presenta la frecuencia de micronúcleos por 100 tétradas para tartrazina y la obtenida en los ensayos antígenotóxicos con el extracto acuoso de *Spirulina maxima*, sus pigmentos: clorofilina, β -caroteno y ficocianina de manera independiente y en mezcla así como el porcentaje de inhibición de la frecuencia de MCN inducida por tartrazina (7.52 ± 2.32), observándose que el pigmento clorofilina mostró la mayor inhibición (51.06%) y de las mezclas, clorofilina + β -caroteno en un 46.67%. El % de inhibición se redujo hasta 41.48% en las mezcla con ficocianina. Estos datos se aprecian gráficamente en la Figura 6.

Tabla XI FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS MEIÓTICAS DE *Tradescantia* CLONE 4430 INDUCIDA EN LOS ENSAYOS ANTIGENOTÓXICOS CON EXTRACTO ACUOSO DE *Spirulina maxima* Y SUS PIGMENTOS: CLOROFILINA, B-CAROTENO, FICOCIANINA EN FORMA INDEPENDIENTE Y EN MEZCLAS, SUS RESPECTIVOS CONTROLES Y TARTRAZINA (0.0024 mg/ml).

CONTROLES	MCN/100 TETRADAS (M ± DE)
Agua destilada	3.41±0.73
Extracto acuoso	3.06±0.80
Clorofilina	3.81±0.82
β-caroteno	3.93±0.91
DMSO 1%	3.21±0.72
Ficocianina	3.29±0.77
Clorofilina + β-caroteno	4.06±1.24
Clorofilina + Ficocianina	3.42±0.80
β-caroteno + Ficocianina	3.12±1.09
Clorofilina + β-caroteno + Ficocianina	4.29±0.91
Tartrazina	7.52±2.32
ENSAYOS ANTIGENOTÓXICOS	
Extracto + tartrazina	4.26±1.40
Clorofilina + tartrazina	3.68±1.28
β-caroteno + tartrazina	3.87±1.08
Ficocianina + tartrazina	3.85±1.02
Clorofilina + β-caroteno + tartrazina	4.01±1.16
Clorofilina + Ficocianina + tartrazina	4.28±0.83
β-caroteno + Ficocianina + tartrazina	4.40±0.97
Clorof + β-carot + Ficoc + tartrazina	4.40±0.85

Agua destilada: control negativo

Tartrazina: Inductor de genotoxicidad

Tabla XII RELACIONES ESTADISTICAS DE LA DIFERENCIA DE MEDIAS DE DUNETT PARA LA FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS (MCN) EN CELULAS MEIOTICAS DE *Tradescantia* CLONE 4430 INDUCIDA CON EXTRACTO ACUOSO DE *Spirulina maxima* Y SUS PIGMENTOS CLOROFILINA, β -CAROTENO Y FICOCIANINA INDEPENDIENTE Y EN MEZCLA COMPARADOS CON UN CONTROL NEGATIVO (AGUA DESTILADA).

Tratamientos	q	$p_{0.05} = 2.94$
CONTROLES		
Tartrazina	14.859	**
Extracto	0.9899	NS
Clorofilina	1.263	NS
β -caroteno	1.629	NS
DMSO 1%	0.6208	NS
Ficocianina	0.2797	NS
Clor + β -car	1.857	NS
Clor + Fico	0.04625	NS
β -car + Fico	0.6872	NS
Clor + β -car + Fico	2.165	NS
ENSAYOS ANTIGENOTOXICOS		
Extrac + tart	3.411	*
Clor + tart	1.078	NS
β -car + tart	1.824	NS
Fico + tart	1.747	NS
Clor + β -car + tart	2.357	NS
Clor + Fico + tart	3.433	*
β -car + Fico + tart	3.899	*
Clo + β + Fico + tart	3.899	*

Si el valor de q es mayor que 2.949 indica:

** = Altamente significativo

* = Significativo ($p < 0.05$)

NS = No significativo ($p > 0.05$)

Tabla XIII PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA FRECUENCIA DE MCN EN CELULAS MEIOTICAS DE *Tradescantia* CLONE 4430 INDUCIDA POR TARTRAZINA (0.0024 mg/ml) EN LOS ENSAYOS ANTIGENOTOXICOS CON EL EXTRACTO ACUOSO DE *Spirulina maxima* Y SUS PIGMENTOS CLOROFILINA, β -CAROTENO Y FICOCIANINA EN FORMA INDEPENDIENTE Y EN SUS RESPECTIVAS MEZCLAS.

	MCN/100 TETRADAS	% INHIBICION
Tartrazina	7.52±2.32	-----
Extracto + tartrazina	4.26±1.40	43.35
Clorofilina + tartrazina	3.68±1.28	51.06
β -caroteno + tartrazina	3.87±1.08	48.53
Ficocianina + tartrazina	3.85±1.02	48.80
Clor + β -car + tart	4.01±1.16	46.67
Clor + Fico + tart	4.28±0.83	43.08
β -car + Fico + tart	4.40±0.97	41.48
Clo + β + Fico + tart	4.40±0.85	41.48

El % de inhibición se obtuvo mediante la fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición} = \left[1 - \frac{\% \text{ MCN antigenotóxico}}{\% \text{ MCN genotóxico}} \right] \times 100$$

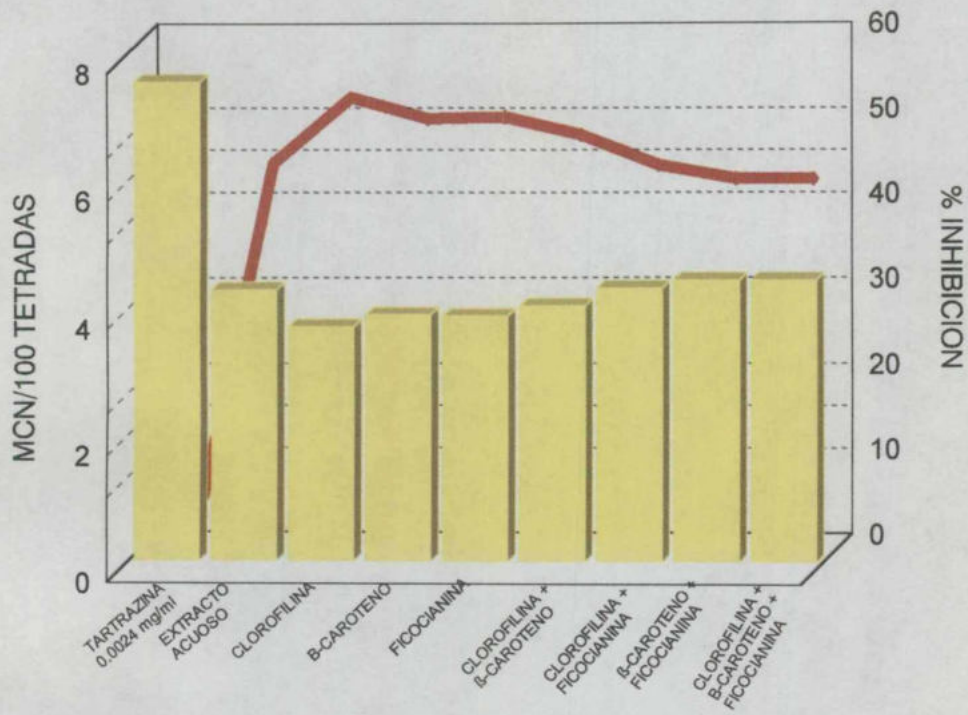


Figura 6 PORCIENTO DE INHIBICION DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Spirulina maxima* Y SUS PIGMENTO CLOROFILINA, β -CAROTENO Y FICOCIANINA Y SUS DIFERENTES MEZCLAS SOBRE LA FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS INDUCIDA POR EL ADITIVO COLORANTE SINTETICO TARTRAZINA

3 ENSAYO BIOLÓGICO CON EL ADITIVO COLORANTE SINTÉTICO AZUL BRILLANTE

3.1 GENOTOXICIDAD INDUCIDA CON AZUL BRILLANTE

La Tabla XIV describe la frecuencia de micronúcleos (MCN) en células meióticas de *Tradescantia* clone 4430 inducida por el mutágeno: azul brillante, a la concentración de 0.014 mg/ml, reportando la frecuencia de MCN en 100 tétradas tanto para el mutágeno como para el control negativo (agua destilada) cuyos valores fueron hasta 6.75 ± 1.17 y 3.34 ± 0.78 MCN/100 tétradas respectivamente.

Su análisis estadístico con Dunett se presenta en la Tabla XV donde se observa una diferencia significativa ($p < 0.05$) en los datos al ser comparados con el control negativo.

Tabla XIV FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS (MCN) EN CELULAS MEIOTICAS DE *Tradescantia* CLONE 4430 INDUCIDA EN EL ENSAYO GENOTOXICO CON AZUL BRILLANTE Y SU CONTROL NEGATIVO.

MCN/100 TETRADAS	
CONTROL NEGATIVO	TARTRAZINA (0.0024mg/ml)
3.06±0.43	6.06±1.23
3.06±0.43	6.06±1.23
3.33±1.30	7.19±0.60
3.33±0.94	6.66±1.08
3.59±1.14	7.46±1.52
3.79±0.44	6.26±0.54

Control negativo: Agua destilada

Valores de media y desviación estándar en el ensayo genotóxico

3.2 ANTIGENOTOXICIDAD CON EXTRACTO ACUOSO DE *Spirulina maxima* Y SUS PIGMENTOS: CLOROFILINA, β -CAROTENO Y FICOCIANINA EN FORMA INDEPENDIENTE Y EN SUS RESPECTIVAS MEZCLAS Y COMO GENOTOXICO AZUL BRILLANTE.

La frecuencia de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* clone 4430 inducida en los ensayos antigenotóxicos con extracto acuoso de *Spirulina maxima* y sus pigmentos clorofilina, β -caroteno y ficocianina independientes y en mezclas, sus respectivos controles empleando como genotóxico azul brillante se muestran en la Tabla XVI de la cual se puede decir que el rango de variación en los controles va de 3.12 ± 1.09 a 4.29 ± 0.91 MCN/100 tétradas, y que el azul brillante induce una frecuencia de 6.75 ± 1.17 MCN/100 tétradas, mientras que en los tratamientos antigenotóxicos se presenta una menor inducción de MCN con relación a la obtenida con el genotóxico. Los datos se analizaron mediante el estadístico de Dunett observando diferencia significativa ($p < 0.05$) con el azul brillante y en las mezclas que contenían ficocianina así como en el extracto con respecto al control negativo (agua destilada) (Tabla XVII), lo que significa que tanto el extracto como los pigmentos en mezcla protegen a las células de *Tradescantia* en cierto porcentaje (Tabla XVIII) y que aún se manifiesta el efecto del genotóxico azul brillante.

En los valores correspondientes al porcentaje de inhibición de la frecuencia de MCN en células meióticas de *Tradescantia* inducida con azul brillante y en los ensayos antigenotóxicos con extracto acuoso de *Spirulina* y sus pigmentos en forma independiente como en mezcla, la mayor inhibición se presentó con clorofilina en un 47.85% y aplicados en mezclas, clorofilina + β -caroteno protegió en un 43.11%, las mezclas con el pigmento ficocianina disminuyeron la inhibición hasta 36.59% (Tabla XVIII). En la Figura 7 se observa la representación gráfica de estos resultados.

Tabla XVI FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS MEIÓTICAS DE *Tradescantia* CLONE 4430 INDUCIDA EN LOS ENSAYOS ANTIGENOTÓXICOS CON EXTRACTO ACUOSO DE *Spirulina maxima* Y SUS PIGMENTOS: CLOROFILINA, β -CAROTENO Y FICOCIANINA EN FORMA INDEPENDIENTE Y EN MEZCLAS, SUS RESPECTIVOS CONTROLES Y AZUL BRILLANTE (0.014 mg/ml)

CONTROLES	MCN/100 TETRADAS (M \pm DE)
Agua destilada	3.34 \pm 0.78
Extracto acuoso	3.26 \pm 1.07
Clorofilina	3.36 \pm 1.04
β -caroteno	3.81 \pm 1.04
DMSO 1%	3.28 \pm 0.85
Ficocianina	3.29 \pm 0.77
Clorofilina + β -caroteno	3.57 \pm 0.92
Clorofilina + Ficocianina	3.42 \pm 0.80
β -caroteno + Ficocianina	3.12 \pm 1.09
Clorofilina + β -caroteno + Ficocianina	4.29 \pm 0.91
Azul brillante	6.75 \pm 1.17
ENSAYOS ANTIGENOTÓXICOS	
Extracto + Azul brillante	3.99 \pm 1.13
Clorofilina + Azul brillante	3.52 \pm 1.04
β -caroteno + Azul brillante	3.54 \pm 1.12
Ficocianina + Azul brillante	3.96 \pm 0.95
Clorofilina + β -caroteno + Azul b	3.84 \pm 1.01
Clorofilina + Ficocianina + Azul b	4.26 \pm 1.11
β -caroteno + Ficocianina + Azul b	4.12 \pm 0.91
Clorof + β -carot + Ficoc + Azul b	4.28 \pm 1.00

Agua destilada: control negativo

Azul brillante: inductor de genotoxicidad

Tabla XVII RELACIONES ESTADISTICAS DE LA DIFERENCIA DE MEDIAS DE DUNETT PARA LA FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS (MCN) EN CELULAS MEIOTICAS DE *Tradescantia* CLONE 4430 INDUCIDA CON EXTRACTO ACUOSO DE *Spirulina maxima* Y SUS PIGMENTOS CLOROFILINA, β -CAROTENO Y FICOCIANINA INDEPENDIENTE Y EN MEZCLA COMPARADOS CON UN CONTROL NEGATIVO (AGUA DESTILADA).

Tratamientos	q	$p_{0.05} = 2.97$
CONTROLES		
Azul brillante	14.010	**
Extracto	0.2116	NS
Clorofilina	0.1496	NS
β -caroteno	1.796	NS
DMSO 1%	0.1496	NS
Ficocianina	0.09106	NS
Clor + β -car	0.7759	NS
Clor + Fico	0.2732	NS
β -car + Fico	0.5464	NS
Clor + β -car + Fico	2.641	NS
ENSAYOS ANTIGENOTOXICOS		
Extrac + Azul b	3.133	*
Clor + Azul b	0.8371	NS
β -car + Azul b	0.9658	NS
Fico + Azul b	2.769	NS
Clor + β + Azul b	2.221	NS
Clo + Fico + Azul b	4.057	*
β + Fico + Azul b	3.445	*
C + β + F + Azul b	4.153	*

Si el valor de q es mayor que 2.97 indica:

** = Altamente significativo

* = Indica significativo ($p < 0.05$)

NS = No significativo ($p > 0.05$)

Tabla XVIII PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA FRECUENCIA DE MCN EN CELULAS MEIOTICAS DE *Tradescantia* CLONE 4430 INDUCIDA POR AZUL BRILLANTE (0.014 mg/ml) EN LOS ENSAYOS ANTIGENOTOXICOS CON EL EXTRACTO ACUOSO DE *Spirulina maxima* Y SUS PIGMENTOS CLOROFILINA, β -CAROTENO Y FICOCIANINA EN FORMA INDEPENDIENTE Y EN SUS RESPECTIVAS MEZCLAS.

	MCN/100 TETRADAS	% INHIBICION
Azul brillante	6.75±1.17	-----
Extracto + Azul b	3.99±1.13	40.88
Clorofilina + Azul b	3.52±1.04	47.85
β -caroteno + Azul b	3.54±1.12	47.55
Ficocianina + Azul b	3.96±0.95	41.33
Clor + β -car + Azul b	3.84±1.01	43.11
Clor + Fico + Azul b	4.26±1.11	36.88
β -car + Fico + Azul b	4.12±0.91	38.96
Clo + β + Fico + Azul b	4.28±1.00	36.59

El % de inhibición se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición} = \left[1 - \frac{\% \text{ MCN antigenotóxico}}{\% \text{ MCN genotóxico}} \right] \times 100$$

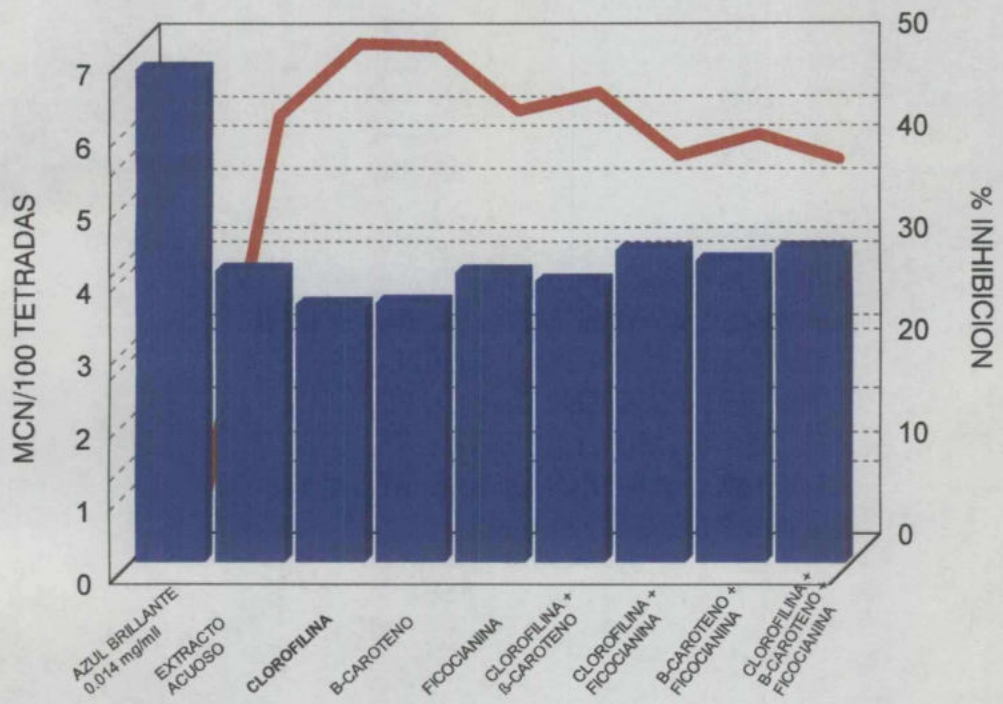


Figura 7 PORCIENTO DE INHIBICION DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Spirulina maxima* Y SUS PIGMENTOS CLOROFILINA, B-CAROTENO Y FICOCIANINA Y SUS DIFERENTES MEZCLAS SOBRE LA FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS INDUCIDA POR EL ADITIVO COLORANTE SINTETICO AZUL BRILLANTE

V DISCUSION

En los años recientes han surgido una serie de cambios en los hábitos alimentarios, que implican el consumo de distintos tipos de aditivos, adicionados en la preparación de alimentos y bebidas (Chávez y col., 1993b), entre los que destacan los colorantes sintéticos, por la importancia que tiene el color tanto en la aceptación como en el rechazo del alimento por parte del consumidor, lo que representa algunas ventajas pero también un grave problema, ya que la gran producción y variedad de las sustancias químicas a las que diariamente se expone el hombre, aumenta la posibilidad de que estas puedan contribuir a incrementar las mutaciones de la carga génica humana (Desroisier, 1983; Marmion, 1984; Newsome, 1986; Branen, 1990; Valdés, 1991).

Algunos compuestos químicos pueden participar en las etapas de iniciación y progresión del proceso de carcinogénesis al ocasionar alteraciones en el material genético de las células debido a su capacidad mutagénica es decir, existe la posibilidad de que un compuesto mutagénico sea también carcinogénico. Incluso, aún cuando un compuesto no sea mutagénico por sí sólo, al asociarse a otros compuestos o bien al sufrir transformaciones dentro del organismo, se puede convertir en mutagénico (Miller y Skinner, 1983; Ames y col., 1987; Leon y col., 1988).

Es conocido que eventos mutacionales pueden conducir a desordenes y enfermedades en las células. Esto ha sido confirmado con respecto al desarrollo de cáncer, estableciendo que la actividad oncogénica esta relacionada con la mutación genética o translocación cromosómica (Gilliland, 1997).

Algunos estudios (Kalter, 1971; Trosko y Chang, 1978) sugieren una relación causal entre la mutagénesis y la transformación maligna de las células (carcinogénesis) y ciertas alteraciones del desarrollo (teratogénesis).

Cabe hacer notar que, si bien existen numerosos estudios que asocian la generación de cáncer con la exposición a ciertos compuestos químicos, a la fecha sólo se cuenta con datos preliminares (una elevada incidencia de cáncer en las esposas de los individuos expuestos en el ambiente laboral) que sugieren la ocurrencia del daño genético en los gametos (Infante y col., 1976; Corbett, 1976). Estos estudios constituyen la primera indicación en humanos de alteraciones hereditarias inducidas por agentes químicos.

El daño al ADN es considerado uno de los más importantes contribuidores al cáncer. Un indicador del daño mutagénico al material genético podría ser útil en la estimación del riesgo de cáncer en la población y en el monitoreo del efecto de la quimioprevención. Mucho de este daño es oxidativo por naturaleza. Se ha estimado que una célula humana típica experimenta cerca de 10000 "golpes" oxidativos a su

ADN cada día. Las enzimas reparan la mayoría del daño provocado más no todo. Las lesiones oxidativas se acumulan con la edad y esto provoca riesgo de cáncer (Pryor, 1991).

Aproximadamente el 90% de todos los cánceres, se correlacionan con los factores ambientales, incluyendo los hábitos alimentarios (Armstrong y Doll, 1975; Wynder y Gori, 1977; Doll, 1992; Potter, 1992). Estudios epidemiológicos sugieren que el 35% de todas las muertes por cáncer pueden correlacionarse con la dieta (Eddy, 1986).

El hábito de consumir alimentos industrializados disminuye la ingestión de vitaminas, ciertos nutrimentos inorgánicos, así como fibra que contienen los alimentos en su estado más natural (Lowering, 1985; Connor y Connor, 1989; Sabaté, 1995). Por otra parte implica la ingestión de sustancias agregadas a los alimentos (aditivos alimentarios) con el fin de mejorar la apariencia, textura, color, sabor, etc. de los mismos (Concon, 1988; Branen, 1990). Los más ampliamente utilizados son los colorantes y dentro de estos los sintéticos (Desroisier, 1983; Marmion, 1984; Newsome, 1986). Sin embargo se debe considerar su aspecto toxicológico, ya que puede traer riesgos a la salud, entre ellos procesos carcinogénicos.

Por tal motivo se realizaron estudios en jugos, dulces y refrescos, para identificar y cuantificar aditivos colorantes sintéticos en estos alimentos, encontrando con mayor frecuencia los aditivos colorantes sintéticos tartrazina y azul brillante, los cuales al ser evaluados mediante el sistema de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia*, se observó un efecto genotóxico para ambos (Rojas, 1992; Gómez, 1994; Martínez y Velázquez, 1995).

Los aditivos colorantes sintéticos tartrazina y azul brillante fueron identificados y cuantificados con mayor frecuencia en jugos, dulces y refrescos de mayor consumo en la ciudad de Querétaro (Rojas, 1992; Gómez, 1994; Martínez y Velázquez, 1995), encontrando un efecto genotóxico, en las células meióticas de *Tradescantia*. Existen discrepancias entre los diferentes ensayos de mutagenicidad, por ejemplo, en el caso de tartrazina en ensayos de Ames y linfoma de ratón los resultados fueron negativos (Patterson y Butler, 1982; Brown y Dietrich, 1983), mientras que en células de mamíferos y en células fibroblásticas de hamster se presentaron efectos clastogénicos (Wortzen y col., 1978). Por otra parte el azul brillante, desde 1969 no ha sido enlistado por la Legislación Mexicana en forma permanente para su uso. En un reporte final expedido por la FDA en 1981 (Newsome, 1986) basado en reportes sobre estudios teratológicos y de reproducción multigeneracionales, emitió que no se encontraron efectos adversos; en Canadá se revisaron los estudios desarrollados por la FDA y concluyen que no hay evidencias razonables para establecer la no-carcinogenicidad hasta 100 ppm (Hatchcock, 1984).

Hasta el momento se desconoce la forma en que actúan los aditivos colorantes sintéticos, particularmente tartrazina y azul brillante al ser ingeridos y metabolizados en el organismo. Por tanto, es importante estudiar con detalle, su estructura química ya que se han reportado entre los colorantes del grupo azo y otros componentes químicos de los alimentos (Samter y Beers, 1967), por lo cual su efecto genotóxico o clastogénico pudiera ser atribuido a la alteración de este grupo sobre la cadena del ácido desoxirribonucleico (ADN) y que puede producir carcinogenicidad (Fishbeing, 1979). El consumo de estos aditivos colorantes es un grave problema ya que se encuentran en diversos productos industrializados y por clasificarse dentro de los grupo azo pueden conducir a alteraciones en el material genético y a procesos carcinogénicos (Nony y col., 1980; Patterson y Butler, 1982; Medvedev y col., 1988; Percy y col., 1989). Por tal razón es recomendable seguir realizando investigaciones.

Los colorantes azo, se caracterizan por uno o más radicales unidos a un grupo amino ($R-N=N-R'$). Algunos han estado vinculados con cáncer de vejiga en humanos, con sarcoma esplénico, hepatocarcinomas y anomalías nucleares en animales de experimentación y aberraciones cromosómicas de células de mamífero (Nony y col., 1980; Patterson y Butler, 1982; Medvedev y col., 1988; Percy y col., 1989). El colorante azo en el organismo es reducido y el puente azo es abierto por enzimas azoreductasas para producir aminas aromáticas. La toxicidad y carcinogenicidad de ciertos colorantes azo de sistemas en mamíferos puede resultar de interacciones de las moléculas íntegras con receptores del citosol (Lubet y col., 1983; Collier y col., 1993) o de la formación de radicales libres y arilaminas durante la azoreducción (Nony y col., 1980; Collier y col., 1993).

La población general se ve expuesta a una gran variedad de sustancias presentes en el aire, agua y principalmente en alimentos, como son los aditivos colorantes sintéticos que se consumen diariamente, aunado a esto dado el gran número de carcinógenos ambientales es casi imposible ingerir alimentos libres de esas sustancias (Ames y col., 1987; Pariza, 1989). Además de esto se sabe que mutaciones cromosómicas y genéticas son factores importantes en carcinogénesis y que ciertos cánceres humanos pueden ser prevenidos por la identificación de agentes antimutagénicos en el medio (Gaziano y Hennekens, 1996; Ames y Lois, 1997) y que la incidencia de cáncer puede reducirse si las células entran en contacto con sustancias que ejerzan un efecto quimioprotector (Gaziano y Hennekens, 1996).

Analizando ésta problemática de alimentación (consumo de aditivos colorantes sintéticos) a la que el hombre se expone en su vida cotidiana y conociendo las consecuencias, así como las posibles alternativas de solución, se decidió estudiar la microalga *Spirulina maxima* poseedora de algunos compuestos quimioprotectores, entre ellos: clorofilina, β -caroteno y ficocianina (Santillan, 1982; Paz, 1997) para evaluar su potencial antígenotóxico sobre la genotoxicidad inducida por tartrazina y azul brillante y de esta manera poder prevenir daños al material genético o enfermedades, entre ellas el cáncer.

Se identificó y cuantificó el pigmento ficocianina en el extracto, dando una concentración de 1143.4856 mg/kg (1.14 g/kg) así como en su extracción a partir del pulverizado cuya concentración es 100 veces mayor que la obtenida en el extracto 112761.02 mg/kg (112.76 g/kg) de dicha microalga, encontrando resultados similares a los obtenidos por Paz en 1997 (1405.78 mg/kg y 116064.54 mg/kg respectivamente).

Estos resultados confirman lo reportado en la literatura acerca de la presencia de dichos pigmentos en el extracto y en el pulverizado de *Spirulina maxima* (Santillan, 1982; Ondarza, 1988; Kay, 1991), además de que la clorofila y la ficocianina se extraen fácilmente con agua, mientras que el β -caroteno se logra extraer con dimetilsulfóxido al 1% por ser un compuesto liposoluble.

Rojas en 1992, realizó una curva dosis-efecto donde determinó las concentraciones de tartrazina y azul brillante que indujeron genotoxicidad en las células meióticas de *Tradescantia* por vía tallo. En base a estos resultados se llevaron a cabo estudios preliminares para obtener las concentraciones que por vía inflorescencia ejercieran un efecto genotóxico mediante el sistema de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia*, ya que el daño a las células es más directo que por vía tallo, debido a la exposición total de las yemas que contienen a las células meióticas y que permiten un mayor contacto de los mutágenos con las células blanco, que además se encuentran en Profase I, etapa de mayor susceptibilidad al daño provocado por dichas sustancias genotóxicas ocasionando rompimiento de cromosomas (efecto clastogénico) (Schmid, 1976) manifestado por la frecuencia de micronúcleos, observándose en la etapa de tétradas. El efecto clastogénico es originado por la ruptura de los puentes de hidrógeno del ADN debilitando la molécula de ADN. La frecuencia de micronúcleos inducida por el aditivo colorante tartrazina fue hasta 7.52 ± 2.32 MCN/100 tétradas y por el azul brillante hasta 6.75 ± 1.17 MCN/100 tétradas. Estos valores son altos en comparación con el control negativo (agua destilada) (3.37 ± 0.04 MCN/100 tétradas), lo cual indica el potencial genotóxico, es decir, el daño al material genético que ejercen ambos aditivos colorantes sintéticos sobre las células meióticas de *Tradescantia*.

Los siguientes estudios apoyan lo referente a genotoxicidad debido a que se ha utilizado la misma prueba de micronúcleos con resultados favorables. Evaluación de la capacidad genotóxica de: compuestos físicos y químicos, fármacos y bebidas comunes (Ma y col., 1983), bebidas refrescantes no alcohólicas (Ruíz y col., 1993), colorantes sintéticos en cárnicos (Ledezma y Alvarez, 1990), aditivos colorantes sintéticos (tartrazina y azul brillante) presentes en jugos, dulces y refrescos (Rojas, 1992; Gómez, 1994; Martínez y Velázquez, 1995), fármacos (Ruíz y col., 1999) así como también en la detección de contaminantes en agua potable residual (Ma y col., 1983; Ruíz y col., 1992), y ensayos antígenotóxicos (Estrada, 1995; Paz, 1997) indicando con esto la efectividad del sistema.

También mediante este sistema se evaluó la inducción de micronúcleos del extracto acuoso de *Spirulina maxima* dando una frecuencia de 3.16 ± 0.14 MCN/100 tétradas siendo muy semejante al encontrado en el control negativo (agua destilada) (3.37 ± 0.04 MCN/100 tétradas), por tanto, se puede decir que el extracto está exento de genotoxicidad lo que indica la inocuidad de este al ser aplicado en las células meióticas de *Tradescantia* observando ausencia de daño al material genético.

Por consiguiente se realizaron ensayos antígenotóxicos con el extracto acuoso de *Spirulina maxima* en las células de *Tradescantia* con el fin de protegerlas del daño genotóxico inducido por los aditivos colorantes sintéticos tartrazina (7.52 ± 2.32 MCN/100 tétradas) y azul brillante (6.75 ± 1.17 MCN/100 tétradas). Los resultados mostraron que el extracto acuoso redujo la frecuencia de micronúcleos en un 4.26 ± 1.40 MCN/100 tétradas en relación al inducido por tartrazina y hasta 3.99 ± 1.13 MCN/100 tétradas con respecto al azul brillante. En el análisis estadístico de los datos la diferencia significativa que presenta el extracto con respecto al control negativo (agua destilada) indica una inhibición parcial de aproximadamente 43 y 40% del daño inducido por tartrazina y azul brillante respectivamente lo cual demuestra el potencial que tiene el extracto acuoso de *Spirulina* para proteger al ADN contra el efecto de ciertos aditivos colorantes sintéticos.

Estos resultados son semejantes a lo descrito por Paz en 1997, acerca del potencial antígenotóxico del extracto y pigmentos (clorofilina, β -caroteno, ficocianina) de la microalga *Spirulina maxima* con hidrazida maleico, evaluados en células meióticas de *Tradescantia*. Este mismo sistema biológico ha sido efectivo para determinar la capacidad antígenotóxica de fenoles presentes en frijol (Estrada, 1995).

En la literatura científica se han mencionado diversos estudios antígenotóxicos con extractos de *Spirulina* y otras microalgas, así como con extractos de otros alimentos (verduras), por ejemplo Schwartz y col., en 1988, demostraron que un extracto de microalgas *Spirulina-Dunatiella* es efectivo en la prevención del desarrollo de tumores en la bolsa bucal de hamster cuando dicho extracto se aplica tópicamente, observaron también que dietas ricas en β -caroteno y cantaxantina reducían significativamente el número de tumores y el tamaño de estos. Mientras que Qishen y col., 1989 al tener conocimiento de la actividad antimutagénica y radioprotectiva de extractos derivados de plantas y animales, mostraron que un extracto alcohólico obtenido de *Spirulina platensis*, podía reducir el daño inducido por la radiación ionizante sobre la médula ósea de ratón, de tal manera que las células tratadas con dicho extracto resistieron al daño que causan la radiación gamma, estos autores proponen dos mecanismos por los cuales las células se protegieron de las radiaciones. 1) La capacidad de la célula para mejorar el daño inducido al ADN puede aumentar por la presencia del extracto alcohólico.

2) La acción radioprotectiva del extracto alcohólico puede resultar de una mejora pasajera en el mecanismo "atrapador de radicales" en las células irradiadas, de tal forma que los compuestos capaces de "atrapar" los radicales libres causantes de la peroxidación lipídica, son conocidos como antioxidantes y algunos de la dieta que han presentado actividad antimutagénica y anticarcinogénica son: ácido ascórbico, β -caroteno, α -tocoferol, selenio, calcio, clorofilina, clorofila, etc. Debido al desastre de Chernobil millones de personas viven en zonas peligrosamente radiactivas y en contacto directo con agua, tierra y alimentos contaminados; una consecuencia de vivir en estas áreas es el alto nivel de radionúclidos (Cesio-137 y Estroncio-90), en los organismos de las personas. Al respecto Loseva y Dardynskaya en 1993 demostraron que la administración diaria de *Spirulina* podían disminuir los elevados niveles de radionúclidos encontrados en niños.

Se ha descrito también que extractos de verduras tales como: col, apio, espinacas y col de brusellas, por mencionar algunos, probados en diversos sistemas *in vivo* fueron reportadas por reducir significativamente la actividad mutagénica de genotóxicos conocidos como el pirolisato (Kada y col., 1978; Barale y col., 1983; Abraham y col., 1986; Itô y col., 1986, Muenzner, 1986; Kim y col., 1987; Hayatsu y col., 1988; Knasmueller y col., 1989; Sharma, 1990; Sarkar y col., 1996) o una mezcla de benzo (a) pireno y 3-metilcolantreno (Lai y col., 1980), también se han evaluado el extracto de hojas de espinaca, cantidades iguales de clorofila extraída de las hojas y clorofilina sintética donde se demuestra que el extracto y la clorofilina no fueron tóxicos ni clastogénicos y protegieron contra la actividad de genotóxicos, tales como el pesticida clordano y sal de cromo inorgánico (Sarkar y col., 1994). La protección contra el daño cromosómico fue atribuida a la clorofila (Sharma, 1990). La actividad antimutagénica de ésta se obtuvo principalmente usando extractos crudos cuyo efecto es debido a la composición total del extracto, más que de un sólo constituyente. El extracto de clorofila y su derivado clorofilina mostraron no tener efectos tóxicos ni mutagénicos, particularmente en sistemas microbianos (Sarkar y col., 1994).

En general el alto consumo de frutas y verduras, se ha relacionado con un efecto protector en contra del cáncer, mientras que una baja ingesta se relaciona con un incremento del riesgo en esta patología en la mayoría de los órganos excepto próstata. La evidencia es muy fuerte para el cáncer epitelial, como el de pulmón, laringe y esófago y menos convincente para el cáncer mamario (Packet y Sullivan, 1995), se ha descrito que una dieta rica en frutas, verduras, cereales y nueces ha sido asociada como factor de protección contra efectos carcinogénicos y relacionados con mutágenos y actividad clastogénica de agentes genotóxicos (Bjelke, 1974; Graham y col., 1978; Shu y col., 1989) atribuyendo estos efectos a la presencia de vitaminas A, C, y carotenoides (β -caroteno) que pueden actuar como nutrimentos antioxidantes preventivos contra el cáncer y aterogénesis. En estudios realizados por Abbey y col., 1995 se demostró que una dieta suplementada con β -carotenos y vitamina C provenientes de frutas y verduras tuvo un efecto protector sobre la oxidación de las LDL-colesterol. Otras investigaciones con vitamina E han

mostrado una asociación inversa con la enfermedad cardiovascular (Ishidate y col., 1984). La cantidad requerida para evitar la oxidación de los LDL-colesterol es difícil de alcanzar sin un aumento en el consumo de grasa en la dieta; por tanto algunos autores recomiendan que el consumo sea por medio de suplementos (Combes y Haveland-Smith, 1982; Martínez y Velázquez, 1995).

Es importante mencionar que la microalga *Spirulina maxima* es poseedora de diversos componentes con propiedades antígenotóxicas como xantófilas, selenio, calcio, potasio, tocoferol, clorofilina, β -caroteno, ficocianina, entre otros (Henrikson, 1981; Santillan, 1982; Aeschbacher, 1989), ácido γ -linoleico (Belay y col., 1997), ácido palmítico, el cual ha mostrado reducir el daño genotóxico producido por ciclofosfamida en sistemas *in vivo* (Chorvatovivová y Navarová, 1992; Gonzales de Mejía, 1997). Por tanto estos constituyentes presentes en el extracto permiten suponer que pudieron haber ayudado a potenciar el efecto de quimioprotección, es decir que protegieron al ADN. Estos datos permiten suponer que el extracto acuoso así como los pigmentos de esta microalga protegieron al ADN de las células de *Tradescantia* de la acción genotóxica inducida por tartrazina y azul brillante, es así que *Spirulina* puede actuar como protector del material genético de agentes químicos.

Con la finalidad de conocer si las propiedades antígenotóxicas que presentó el extracto de *Spirulina* se le pueden atribuir a sus pigmentos (clorofilina, β -caroteno y ficocianina), se realizaron ensayos antígenotóxicos con cada uno de ellos, en forma independiente y en mezcla a las concentraciones determinadas en el pulverizado de *S. maxima* usando los estándares de clorofilina y β -caroteno y el pigmento extraído ficocianina, observándose en los resultados, que estos pigmentos presentan actividad antígenotóxica independientes y en mezcla, manifestado por la inhibición de la frecuencia de micronúcleos inducidos por tartrazina y azul brillante. El análisis estadístico no mostró diferencia significativa de los pigmentos clorofilina, β -caroteno y ficocianina aplicados de manera independiente, así como la mezcla clorofilina + β -caroteno en relación al control negativo (agua destilada), esto nos habla de su potencial quimioprotector sobre las células blanco y por otra parte de su inocuidad al material genético demostrándose con el % de inhibición, correspondiendo la mayor protección al pigmento clorofilina en 51.06% y 47.85% para ambos colorantes respectivamente. En relación a las mezclas de los tres pigmentos la de mayor protección fue clorofilina + β -caroteno en un 46.67% al emplear tartrazina y de 43.11% con azul brillante. Estos resultados muestran que clorofilina ejerce un efecto quimioprotector del daño al material genético, comprobado por diversos autores (Sarkar y col., 1996). Sin embargo cuando ficocianina se combina con clorofilina, β -caroteno y en la mezcla de los tres pigmentos el porcentaje de protección a las células se reduce a 41.48% y 36.59% con tartrazina y azul brillante respectivamente. Estos resultados nos dan la pauta para sugerir que el extracto mostró diferencia significativa con respecto al control negativo debido a la presencia de ficocianina y por tanto a que los tres pigmentos se encuentran contenidos en el mismo.

No se conocen bien los mecanismos de acción del extracto acuoso, así como los pigmentos clorofilina, β -caroteno y ficocianina de *Spirulina maxima* (Brokman y col., 1992; Sarkar y col., 1996) por medio de los cuales ejercieron un efecto de quimioprotección al material genético en las células meióticas de *Tradescantia* (Paz, 1997). Sin embargo los conocimientos acerca del efecto antimutagénico y anticarcinogénico atribuido a los compuestos antioxidantes, hacen sugerir que los resultados de inhibición sobre la frecuencia de micronúcleos inducidos por los aditivos colorantes sintéticos: tartrazina y azul brillante se deben a que los dos primeros pigmentos se clasifican dentro del grupo de los antioxidantes (Schwartz y col., 1988; Frankel y col., 1996; Gaziano y Hennekens, 1996; Belay y col., 1997) y que por esta característica pudieron haber actuado como atrapadores de moléculas reactivas (metabolitos electrofílicos cargados positivamente o radicales oxígeno).

La clorofila es un pigmento verde presente en los organismos que realizan la fotosíntesis, es el principal pigmento absorbedor de luz y es el encargado de impartir el color verde a las hojas, por ello se encuentra en las plantas verdes, pero también esta presente en las algas pardas, diatomeas, dinoflagelados y en las microalgas verde-azules (Goodwin, 1976; Gross, 1987; Ondarza, 1988).

La sal de sodio y cobre (clorofilina) utilizada en los ensayos biológicos mostró un poder antígenotóxico mediante la disminución de la frecuencia de micronúcleos llegando hasta 3.68 ± 1.28 MCN/100 tétradas y 3.52 ± 1.04 MCN/100 tétradas en relación a la inducida por los mutágenos tartrazina (7.52 ± 2.32 MCN/100 tétradas) y azul brillante (6.75 ± 1.17 MCN/100 tétradas) respectivamente. Estos resultados demuestran el poder quimioprotector que ejerce *Spirulina maxima* al contener este pigmento además de otros componentes que la hacen más interesante.

Los resultados de esta investigación acerca del poder antígenotóxico de clorofilina coinciden con lo reportado por diversos autores en los siguiente estudios.

En virtud de que la clorofila está presente en todas las plantas verdes, ciertos estudios han atribuido a ésta propiedades antígenotóxicas y antimutagénicas; al respecto Lai y col., 1980, Ong y col., 1986 han mostrado una relación directa entre la acción inhibitoria de extractos de plantas contra agentes genotóxicos y el contenido de clorofila, igualmente Sato y col., 1990 han sugerido que aproximadamente el 20% de los efectos antimutagénicos observados en extractos de plantas acuáticas son atribuibles a la clorofila. La investigación realizada por Gentile y Gentile en 1991 advierte que la concentración de clorofila es un factor importante que debe tomarse en cuenta en la evaluación de la acción antimutagénica de plantas.

La actividad inhibitoria de clorofila sobre los efectos producidos por el humo condensado del cigarro, benzo (a) pireno y Trp-p-2 han sido estudiados en bacterias y *Drosophila* (Hayatsu y col., 1988) utilizando clorofilina (sal de sodio y cobre) debido a su solubilidad en agua, este componente ha sido probado en diversos estudios *in vitro* e *in vivo*, generalmente mostrando ausencia de toxicidad y un eficiente poder antígenotóxico (Sarkar y col., 1993; Sarkar y col., 1994; Sarkar y col., 1996).

Estudios realizados en 1986 por Ong y col., demostraron que la clorofilina, posee actividad antimutagénica e inhibe la mutagenicidad causada por mezclas complejas en el humo de cigarro, atmósfera, partículas de emisión del diesel entre otras. En 1989 este mismo grupo de investigadores demostró que componentes comunes de nuestra dieta como clorofilina, β -caroteno, retinol, vitamina C y vitamina E, son capaces de inhibir la actividad mutagénica de las diferentes mezclas complejas estudiadas. La propiedad antimutagénica de clorofilina se le atribuye principalmente al atrapamiento molecular de mutágenos (Arimoto y col., 1993).

El β -caroteno es un pigmento fotosintético que capta la energía luminosa (Ondarza, 1988) presente en vegetales verdes y amarillos pero también es común en algas y microalgas (Goodwin, 1976; Gross, 1987), es un pigmento liposoluble, de ahí su solubilidad en solventes apolares tales como hexano y éter de petróleo, así como en solventes grasos como acetona, cloroformo, alcohol y dimetilsulfóxido.

Estudios epidemiológicos demuestran que el β -caroteno puede actuar como un agente quimiopreventivo con respecto a la inhibición de la aparición de ciertos tipos de tumores en humanos (Peto y col., 1981). Epstein en 1977 reportó que con la administración intraperitoneal de β -caroteno obtenía un retraso significativo en la inducción de tumores de piel en ratones sin pelo expuestos a la luz UV; estos resultados fueron confirmados por Mathews-Roth en 1982 quienes al administrar este pigmento en la dieta de ratones tratados con dimetilbenzo (a) antraceno observaron una reducción del 70% en tumorigénesis de piel. Datos similares fueron obtenidos por Santamaría y col., en 1983 encontrando que la administración de β -caroteno en la dieta y por instalación intragástrica protegía a los ratones contra la acción fotocarcinogénica del benzo (a) pireno por luz UV y contra la carcinogénesis del benzo (a) pireno en ratones mantenidos en ausencia de luz.

El β -caroteno, pigmento conocido por ser antimutagénico en sistemas *in vitro* e *in vivo* (Renner, 1985; Charleux, 1996) protege de la grasa corporal y contra la oxidación de membranas, este es un atrapador de radicales libres y notablemente eficiente para suprimir el oxígeno singulente (forma muy reactiva del oxígeno) el cual es mutagénico y particularmente efectivo en la peroxidación lipídica causada. Los carotenoides han mostrado ser anticarcinógenos en ratas y ratones y probablemente en humanos (Ames, 1983).

La vitamina A, β -caroteno (provitamina A) E y C reducen y detienen de manera significativa la incidencia de cáncer en piel, colon, estómago, esofago, glándula mamaria, vejiga y pulmón (Lupescu, 1993).

Estudios prospectivos han sugerido que las personas con altas ingestiones de β -caroteno y vitamina E tienen más bajo riesgo de enfermedad coronaria y ataque cardíaco (Gaziano y col., 1994).

Los carotenoides, especialmente los β -carotenos poseen un efecto antitumoral en muchos tipos de cáncer en animales y humanos de lo cual se deduce que su poder quimiopreventivo no está relacionado a su conversión a vitamina A (Lupescu, 1993).

Algunos autores sugieren que en numerosos estudios epidemiológicos los carotenoides pueden ser importantes en la prevención de varios tipos de cáncer (Krinsky, 1993; Gerster, 1993; Van, 1993). y el consumo de una dieta rica en estos después de un diagnóstico de cáncer ha sido asociado con un pronóstico más favorable (Ingram, 1994; Jain y Miller, 1994).

Otros estudios más recientes, muestran que compuestos como la clorofila, el β -caroteno y algunas vitaminas, las cuales se encuentran naturalmente en las plantas, frutas, verduras y microalgas, resultan ser potentes inhibidores de algunos agentes químicos capaces de inducir mutagenicidad (Cabrera, 1993); en 1995 Quintanar demuestra que los extractos ricos en carotenoides de diferentes chiles verdes, son capaces de inhibir la acción de ciertos mutágenos ambientales como son los hidrocarburos policíclicos aromáticos. De igual modo, Ramos en 1995 demostró que los pigmentos obtenidos de la flor de cempasúchil tales como xantófilas, presentan un elevado potencial antimutagénico contra mutágenos ambientales conocidos. En 1996 Sarkar y col, demuestran esta misma acción por los extractos de hojas de espinacas (ricos en clorofila) contra la actividad de un clastógeno metálico común.

Con respecto a la ficocianina se define como un pigmento accesorio que funciona como receptor de la energía luminosa, es una biliproteína, ya que el tetrapirrol de cadena abierta llamado ficocianobilina se encuentra conjugado con una proteína específica que es la ficocianina (Ondarza, 1988), es un pigmento azul, responsable del color tan característico que tienen las microalgas entre ellas *Spirulina maxima*. Se distribuye principalmente en las algas rojas y en las microalgas verde-azules y al igual que muchas proteínas globulares, las biliproteínas pueden extraerse fácilmente en agua o soluciones diluidas de sal con previa ruptura de las células (Haxo y col., 1955; Troxler y col., 1975), en 1979 Gantt y col., establecieron un proceso para el aislamiento de ficocianina a partir de diversos cultivos de especies de algas rojas y verde-azules; este proceso se ha modificado subsecuentemente dependiendo de la especie de microalga verde-azul, además por considerarse de cultivos vivos, la metodología implica el uso de equipo

especial para el manejo de estos, es por ello que principalmente se obtenga en agua y/o buffer de fosfatos con pH aproximados a 7 (6.8 - 7).

Se desconoce el mecanismo de acción de este pigmento, los estudios más recientes acerca de las propiedades terapéuticas que ofrece son: efecto protector de la nefrotoxicidad causada por metales pesados, estimulación del sistema inmune (Fukino y col., 1990; Cheng-Wu, 1994), así como los estudios realizados por Paz en 1997 en relación al efecto antígenotóxico que ejerce la ficocianina sobre la genotoxicidad inducida por el mutágeno hidrazida maleico (químico con propiedades de estimular el crecimiento de plantas), usado ampliamente en la agricultura, es conocido por su potencial clastogénico en un número de modelos de plantas, las cuales incluyen *Hordeum*, *Arabidopsis*, *Vicia*, *Allium* y *Tradescantia* (Constantin y Owens, 1982). La capacidad del rompimiento cromosómico de hidrazida maleico ha sido atribuida a su potencial para romper los puentes de hidrógeno de las moléculas de ADN (Gechner y col., 1982). Se encontraron en la presente investigación datos semejantes de antígenotoxicidad pero empleando otros mutágenos: tartrazina y azul brillante. Se sugiere continuar realizando investigaciones con este pigmento.

Es importante considerar el efecto antígenotóxico o de protección al material genético que ha mostrado la microalga *Spirulina maxima* sobre diferentes mutágenos como el hidrazida maleico (Paz, 1997), así como en este estudio contra aditivos colorantes sintéticos: tartrazina y azul brillante, ya que estos se encuentran comúnmente presentes en la dieta diaria y pueden llegar a desarrollar un proceso carcinogénico al ocasionar mutaciones en las células, además fue interesante comprobar su inocuidad para el ADN de las células de *Tradescantia*.

Sin embargo los estudios con *Spirulina* no se limitan únicamente a su capacidad antígenotóxica, sino que diversas investigaciones realizadas en el país e incluso en otros como Africa y Francia, la han estado evaluando desde tiempos remotos, donde destaca por su alto contenido de proteínas (65-70%) con un completo perfil de aminoácidos esenciales y no esenciales, ácidos grasos, vitaminas, nutrimentos inorgánicos y pigmentos. Esta microalga ha sido ampliamente utilizada por sus diferentes propiedades terapéuticas tanto en experimentos animales como en el hombre, en distintos casos como desnutrición, hipercolesterolemias, estimulación del sistema inmune, efecto protector a la radiación, actividad contra el virus del SIDA, anticancerígeno y antitumoral (Sautier y Tremolieres, 1976; Nayaka y col., 1988; Schwartz y col., 1988; Qishen y col., 1989; Gustafson y col., 1989; Quereshi y col., 1994).

Estudios crónicos, subcrónicos y de Toxicología de reproducción así como pruebas de mutagenicidad desarrolladas en varias especies de roedores concluyen que el alga usada en la dieta de estos experimentos esta excenta, de toxicidad, teratogenicidad y genotoxicidad (Chamorro y col., 1985, 1987; Chamorro y Salazar, 1996; Chamorro y col., 1997). Otras investigaciones realizadas en ratas, donde se utilizaron diferentes concentraciones de *S. maxima* en su dieta no mostraron

efectos adversos ni tóxicos después de un tratamiento subcrónico (Salazar y col., 1998).

Es relevante mencionar que *Spirulina maxima* podría ser utilizada por la industria alimentaria como aditivo de tipo nutrimental adicionándola a sus productos (pastas, frituras, bebidas, entre otros), con el fin de ofrecer al consumidor una mejor calidad de estos, ya que es un recurso natural muy importante por su elevado contenido de proteínas de cuya composición total representa el 70%, característica que la distingue de los demás alimentos de origen vegetal, incluso de las leguminosas y específicamente de la soya, la cual en un caso de desnutrición de tercer grado fue sustituida por la administración de *Spirulina*, obteniendo buenos resultados en cuanto al peso (Durand-Chastel, 1980), también se ha utilizado en casos de desnutrición en adultos (Sautier y Tremolieres, 1976) así como por atletas mexicanos, quienes la ingerían como una fuente proteica (Pirie, 1975). Esta microalga no sólo es de interés por sus proteínas sino porque además contiene ácidos grasos esenciales, vitaminas del complejo B (tiamina, riboflavina, piridoxina, cianocobalamina, etc.), tocoferol nutrimentos inorgánicos como el calcio, hierro, zinc, por mencionar algunos, es así que la industria farmacéutica la podría emplear para la elaboración de complementos alimenticios en forma de cápsulas, tabletas y líquidos (Kay, 1991). *Spirulina* presenta también pigmentos (clorofilina, β -caroteno y ficocianina) con capacidad para proteger al material genético del daño inducido por algunas sustancias. Otros pigmentos que contiene son las xantófilas con un buen efecto pigmentante en la yema de huevo, (Avila y Cuca, 1974; Bezares y col., 1976), por lo cual se puede sugerir otro uso de esta microalga como aditivo colorante de origen natural, debido a la presencia de sus pigmentos, siendo el color un parámetro de evaluación tan importante en la calidad visual y por tanto de aceptación o rechazo del alimento por parte del consumidor.

Por todo lo citado anteriormente se puede decir que la microalga *Spirulina maxima* podría emplearse como un alimento funcional que interviene en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades, regulando los procesos corporales tales como: aumentar los mecanismos de defensa, participar en la prevención de enfermedades específicas como el cáncer, retardar los procesos de envejecimiento, entre otros (Milner, 1994), además, aparte de su alta calidad nutricia protege al ADN del daño genotóxico inducido por sustancias comúnmente presentes en los alimentos (industrializados) específicamente los aditivos colorantes sintéticos tartrazina y azul brillante. Atribuyendo la capacidad quimioprotectora de *Spirulina* a sus componentes principalmente a β -caroteno y clorofilina que están relacionados con la disminución en la incidencia de cáncer, tal es el caso de estudios epidemiológicos que demuestran que el cáncer gástrico, cervix, mama y vejiga pueden reducirse si aumentamos en nuestra dieta el consumo de frutas, verduras y carotenoides (Shelleke y col., 1981; Ames, 1983; Paganini y col., 1987; Lupescu, 1993; Ingram, 1994; Jain y Miller, 1994) y por ser compuestos antioxidantes así como una acción antígenotóxica ejercida por el pigmento ficocianina, importante también por sus aportaciones terapéuticas contribuyendo a un mejor estado de salud del ser humano. Por tanto es

recomendable difundir en instituciones del área de la salud lo observado en esta investigación respecto a su inocuidad y sobre su capacidad antigenotóxica para proteger al material genético de las células y lo reportado en la literatura acerca de sus características nutricias, terapéuticas (Nayaka y col., 1988; Iwata y col., 1990; Quereshi y col., 1994; Hayashi y col., 1994) y de cultivo, pudiendo crecer y desarrollarse en cualquier país usando materiales simples y sin tecnología sofisticada (Trainor, 1978; Ciferri y Tiboni, 1985) de tal manera que debido a su importancia se logre cultivar y con ello se promueva su uso en la alimentación humana.

VI CONCLUSIONES

- Los aditivos colorantes sintéticos tartrazina (FD&C amarillo No. 5) y azul brillante (FD&C azul No. 1) mostraron un efecto genotóxico (daño al material genético) evaluado por la frecuencia de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* clone 4430 a las concentraciones de 0.0024 mg/ml y 0.014 mg/ml respectivamente.
- El extracto acuoso de *Spirulina maxima* (168 mg/ml) es inocuo para las células meióticas de *Tradescantia*, ya que la frecuencia de MCN (3.16 ± 0.14) es muy semejante a la obtenida con el control negativo (3.37 ± 0.04) y presentó un efecto inhibitorio de 43.35% sobre la frecuencia de MCN inducida por tartrazina y un 40.88% con azul brillante.
- Los pigmentos clorofilina, β -caroteno y ficocianina presentes en el extracto acuoso de *Spirulina maxima* mostraron un efecto de quimioprotección tanto individual como en sus respectivas mezclas para las células blanco de *Tradescantia*. Clorofilina mostró un 51.06% de inhibición del daño inducido por tartrazina y 47.85% del daño por azul brillante. En relación a las mezclas, clorofilina + β -caroteno indujo una protección de 46.67% al material genético para tartrazina y 43.11% para azul brillante, se observó que con la presencia de ficocianina en las mezclas de los pigmentos, el porcentaje de protección a las células es menor con relación al obtenido con el pigmento aplicado en forma separada para ambos aditivos colorantes sintéticos.

VII REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abbey, M., Noaker, y Nestel, P., 1995. Dietary supplementation with orange and carrot juice in cigarette smokers lowers oxidation products in copper-oxidized low-density lipoproteins. *J. Am. Diet Assoc.*, 95:671-675.

Abraham, S. K., Mahajan, S. y Kesavan, P. C., 1986. Inhibitory effects of dietary vegetables on the in vitro clastogenicity of cyclophosphamide. *Mutation Res.*, 172:51-54.

Aeschbacher, H. D., 1989. Antimutagens and anticarcinogens in the diet, *Biol. Zent.*, 1(108):303-308.

Ames, B. N., 1979. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science*, 204:587-593.

Ames, B. N., 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science*, 221:1256-1264.

Ames, B. N., Magau, R. y Swirsky, G. L., 1987. Jerarquización de posibles peligros carcinogénicos. *Science*. 236:271.

Ames, B. N. y Lois, S. G., 1997. The causes and prevention of cancer: Gaing Perspective *Environmental Health Perspectives*, 105(4):865-873.

Arimoto, S., Fukuoka, S., Itome, C., Nakano, H., Rai, H. y Hayatsu, H., 1993. Inhibition of the mutagenicity of aminoacid pyrolysis products by hemin and other biological pyrrole pigments, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 92:662-668.

Armstrong, B. y Doll, R., 1975. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries with special reference to dietary practices. *Int. J. Cancer*, 15:617-631.

Avila, G. E. y Cuca, M., 1974. Efecto de la alga *Spirulina geitleri* sobre la pigmentación de la yema de huevo. *Técnica Pecuaria*, 26:47-48.

Babu, M., 1995. Evaluation of chemoprevention of oral cancer with *Spirulina*. *Nutrition and Cancer*, 24(2): 197-202.

Barale, R., Zucconi, D., Bertani, R. y Lopriero, N., 1983. Vegetables inhibit, *in vivo*, the mutagenicity of nitrite combined with nitrosable compounds, *Mutation Res.*, 120:145-150.

Bartsch, M., Kuroku, T., Roberfroid, M. y Malaveille, C., 1982. Metabolic activation systems *in vitro* for carcinogen/mutagen screening test. En: Chemical Mutagens: Principle and Methods. (Eds) De Serres and Hollaender. Plenum Press, New York, 95-161.

Becker, E. W. y Venkataraman, L. V., 1982. Biotechnology and exploitation of algae—the Indian approach. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit GmbH, Esborn, F.D.R., 1-216.

Becker, E. W., 1986. Clinical and Biochemical evaluations of the algae *Spirulina* with regard to its application in the treatment of obesity, a double-blind cross-over study. Nutr. Inst., 34:565-574.

Becker, E. W., 1988. Micro-algae for human and animal consumption. En: Microalgae biotechnology (M. A. Borowitzka and L. J. Borowitzka, eds.). Cambridge University Press, Cambridge, 222-256.

Belay, A. y Ota, Y., 1993. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. Journal of Appl. Phycology, 5:235-241.

Belay, A., Kato, T. y Ota, Y., 1997. *Spirulina (Arthospira)*: potential application as an animal feed supplement. Journal of Applied Phycology, 18:303-311.

Bezares, S.A., Arteaga, C. y Avila, E., 1976. Valor pigmentante y nutritivo de alga *Spirulina* en dietas para gallinas en postura. Técnica Pecuaria, 30:30-34.

Bjelke, E., 1974. Epidemiologic Studies of cancer of stomach, colon, and rectum. Scand. J. Gastroenterol, 9: 1-235.

Blot, W. J., Li, J. Y., Taylor, P. R., Guo, W., Dawsey, S., Wang, G. Q., Yang, C. S., Zheng, S. F., Gail, M., Li, G. Y., Yu, Y., Liu, B., Tangrea, J., Sun, Y., Liu, F., Fraumeni, J. F., Zhang, Y. H. y Li, B., 1993. Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. J. Natl. Cancer Inst., 85:1483-1492.

Borzelleca, J. F., Hogan, G. K. y Koestner, A., 1985. Chronic carcinogenicity study of FD&C blue No. 2 in rats. Ed. Chem. Toxic., 23(6):551-558.

Bourges, H., Sotomayor, A., Mendoza, E., y Chávez, A., 1971. Utilization of the alga *Spirulina* as a protein source. Nutrition Reports International, 4(1):31-43.

Branen, L. A., 1990. Introduction to Food Additives. En: Food Additives. Eds. Branen, A. L., Davidson, P. M. y Salminen, S. Marcel Dekker, Inc., New York, 1-8.

Brockman, H. E., Stack, H. F. y Waters, M. D., 1992. Antimutagenicity profiles of same natural substances. *Mutat. Res.*, 238:57-85.

Brown, J. P. y Dietrich, P. S., 1983. Mutagenicity of selected sulfonated azo dyes in the *Salmonella*/microsome assay: use of aerobic and anaerobic activation procedures. *Mutation Res.*, 116:305.

Cabrera, L. G., 1993. Effect of five dietary antimutagens on the genotoxicity of six mutagens using three different short-term test. Tesis de Doctorado, Universidad del Estado de Illinois.

Calderón, C. J. F., Merino, Z. H. y Barragán, M. D., 1976. Valor alimenticio del alga *Spirulina (Spirulina geitleri)* para rumiantes. *Técnica Pecuaria*, 30:42-46.

Cameron, T. P., Hughes, T. J., Kirlyay, P. E., Fung, V. A. y Dunkel, V. C., 1987. Mutagenicity activity of 27 dyes and related chemicals in the *Salmonella*/microsome and mouse lymphoma TK...assays. *Mutation Res.*, 189:223-229.

Carrada, B. T., 1992. La influencia de los factores ambientales y genéticos en la carcinogénesis humana. *Gaceta Médica*, 2(11):6.

Casarett y Doull's., 1991. Genetic Toxicology, Teratogens, Chemical Carcinogens. En: Toxicology The basic science of poisons. Mary O. Amdur, Ph D, Jonhn Doull, Ph D. M. D., Curtis D. Klaassen, Ph. D (Eds), Pergamon Press. 127-226.

Chaffe, F. H. y Settupane, G. A., 1967. Asthma Caused by FD&C Approved dyes. *J. Allergy*, 40:65-72.

Chamorro, G., Salazar, M., Izquierdo, M. E., Salazar, J. S. y Ulloa, G. V., 1985. Multigeneration study on reproduction and lactation in rats fed with *Spirulina*, *Ach. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol*, 20:165-171.

Chamorro, G., Salazar, S., Salazar, M. y Pages, N., 1987. Evaluation teratologique de la *Spiruline* chez le hamster, *Belgian Journal of Food Chemistry and Biotechnology*, 42(6):188-191.

Chamorro, G. y Salazar, M., 1996. Dominant lethal study of *Spirulina maxima* in male and female rats after short-term feeding. *Phytotherapy Research*, 10:28-32.

Chamorro, G. A., Salazar, M., Salazar, S. y Steele, C. E., 1996. Effect of *Spirulina maxima* consumption on reproduction and peri-and postnatal development in rats. *Food Chem Toxicol*, 34:353-359.

Chamorro, G., Salazar, S., Favila-Castillo, L., Steele, C. y Salazar, M., 1997. Reproductive and peri-and postnatal evaluation of *Spirulina maxima* in mice. *Journal of Applied Phycology*, 9:107-112.

Chapman, V. J. y Chapman, D. J., 1980. Seaweeds and their uses. Ed Chapman and Hall Lt 3a. Ed New York.

Charleux, J. L., 1996. β -carotene, Vitamin C and Vitamin E: The Protective Micronutrients. *Nutrition Reviews*, 54(11):109-114.

Chavéz, A., De Chavéz, M. M., Roldan, J. A., Bermejo, S. y Avila, A., 1993a. Factores de riesgo: Cambios recientes en el consumo de alimentos. En: *La Nutrición en México y la Transición Epidemiológica*. División de Nutrición de Comunidad INNSZ, México, D. F., 21-33.

Chavéz, A., De Chavéz, M. M., Roldan, J. A., Bermejo, S. y Avila, A., 1993b. Introducción: El país y su población. En: *La Nutrición en México y la Transición Epidemiológica*. División de Nutrición de Comunidad INNSZ, México, D. F., 1-3.

Cheng-Wu, A., 1994. Effects of polysaccharide and phycocyanin from *Spirulina* on peripheral blood and hematopoietic system of bone marrow in mice. Proc on Second Asia Pacific Conf. On Algal Biotech. Univ. of Malaysia China.

Chorvatovivová, D. y Navarova, J., 1992. Suppressing effects of glucan on micronuclei induced by cyclophosphamide in mice. *Mutation Res.*, 282:147-150.

Chung, K. T., Fulk, E. y Andrews, A. M., 1981. Mutagenicity testing of some commonly used dyes. *Applied and environmental microbiology*, 42(4):641-648.

Ciferri, O., 1983. *Spirulina* The Edible Microorganism. *Microbiological Reviews*, 551-578.

Ciferri, O. y Tiboni, O., 1985. The biochemistry and Industrial potential of *Spirulina*. *Annual Review of Microbiology*, 39:503-526.

Clayson, D. B., 1968. The techniqua of bladder implantation. Furter results and assessment. *Br. J. Cancer*, 22:825-832.

Clayson, D. B. y Garner, R. C., 1976. Carcinogenic aromatic amines and related compounds. En: *Chemical Carcinogens*. Ed. Searle, C. E. American Chemists Society. Washington, D. C., 366.

Clement, G., Giddey, C. y Menzi, R., 1967. Aminoacid composition and nutritive value of the alga *Spirulina maxima*. *J. Sci. Food agric.*, 18:497-501.

Collier, S. W., Storm, J. E. y Bronaugh, R. L., 1993. Reduction of azo dyes during *in vitro* percutaneous absorption. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 118:73-79.

Combes, R. D. y Haveland-Smith, R.B., 1981. A review of genotoxicity of food, drug and cosmetics colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes. *Mutation research*, 189:223-261.

Combes, R. D. y Haveland-Smith, R. B., 1982. A review of the genotoxicity of food, drug and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes. *Mutation Res.*, 98:101-103.

Concon, J. M., 1988. *Food Toxicology*. Parte B. Marcel Dekker Inc., 1316-1321.

Connor, W. E. y Connor, S. L., 1989. Dietary treatment of familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis* 19 (1):1-105.

Constantin, M. J. y Owene, E., 1982. Introduction and Perspective of a plant genetic and cytogenetic assays. A report of the U. S. Environmental Protection. Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.*, 99:1-2.

Corbett, T. H., 1976. Cancer and congenital anomalies associated with anesthetics. *Ann. New York Acad. Sci. USA*, 271:58.

Cortinas de N. C., Ostrosky de W. y Gálvan, S., 1980. *Manual de Métodos para la investigación de mutágenos y carcinógenos químicos ambientales*. Instituto de Investigaciones biomédicas. Universidad Autónoma de México. 9

Cronquist, A., 1986. Algas verde-azules. En: *Botánica básica*, Ed. C.E.C.S.A., México, D. F., 130-141.

Dangeard, P., 1940. Sur une algue bleve alimentaire pour l'homme: *Arthrospira platensis* (Nordst.) Gomont. *Actes Soc Linn Boreaux Extr Procés-varbaux*, 91:39-41.

Desrosier, N. W., 1983. Tecnología de la evaluación de los alimentos. En: *Elementos de Tecnología de Alimentos*. Editorial CECSA. México, D. F., 16, 17 y 574.

de Saint Blanquat, G., 1988. Colorantes alimentarios. En: *Aditivos y Auxiliares de fabricación en las Industrias Agroalimentarias*. Ed. Mulfon, L. J. Edit. Acribia, S. A., Zaragoza, España, 275-291.

Devi, M. A., Venkataraman, I. V. y Rajasekaran, T., 1979. Hypercholesterolemia effect of diets containing algae on albino rats. *Nutr. Rep. Int.*, 20:103-107.

Diario Oficial de la Federación 1995. Secretaría de Salud, Norma Oficial Mexicana NOM-001-SSA1-1993, Bienes y Servicios. Colorantes Orgánicos Sintéticos. Especificaciones Sanitarias Generales.

Díaz del Castillo, B., 1928. Historia verdadera de la Conquista de la Nueva España. Ed. España-Calpe, Madrid, 323-325.

Dillon, J. C. y Phan, P. A., 1993. *Spirulina* as a source of proteins in human nutrition. Bull. Inst. Ocean, 12: 103-107.

Doll, R. y Peto, R., 1981. The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. J. Natl. Cancer Inst., 66:1192-1308.

Doll, R., 1992. The lessons of life: Keynote address to the nutrition and cancer conference. Cancer Res. 52: 2024-2029.

Diplock, A., 1992. The Protective Roles of Antioxidant Nutrient in disease Prevention. Back-Grounder. Vitamin Nutrition Information Service, 3(1):1-11.

Durand-Chastel, H., 1980. Production and use of *Spirulina* in México. En: Algae Biomass, G. Shelef and C. J. Soeder (Eds), Elsevier/North-Holland, Biomedical Press., Amsterdam, 51-64.

Duxbury, D. D., 1990. Replacement colors and bends for banned FD&C No. 3 lake. Food Procesing.

Dziedzic, J. D., 1987. Applications of food colorants. Food technology, 41(4):78-88.

Eddy, D. M., 1986. Setting priorities for cancer control programs. J. Natl. Cancer Inst., 76:187-199.

Ensminger, A., Ensminger, M. y Konlande, J., 1995. The Concise Encyclopedia of Food y Nutrition. CRS Press. U.S.A., 1059-1069.

Epstein, J. H., 1977. Effect of β -carotene on ultraviolet-induced cancer formation in the hairless mouse-skin, Photochem. Photobiol, 25:211-218.

Estrada, C. S., 1995. Potencial antimutagénico de los fenoles presentes en el frijol. Tesis para obtener el Título de Químico Farmacobiólogo. Universidad Autónoma de Querétaro.

Evets, L., 1994. Means to normalize the levels of inmunoglobulin E, using the food supplement *Spirulina*, Grodenski State medical Univ, Russian Federation Committee of Patents and Trade. Patent (17) RU (11) 2005486.

Fabricant, J. D., Boué, J. y Boué, A., 1978. Genetic studies in espontaneous abortion. Contemporary Ob. Gynec., 11:73.

Fay, H. T., 1978. Risk factors in scrotal ephitelioma. J. R. Soc. Med., 71:741-747.

Fishbeing, L., 1979. On the etiology and metabolic epidemiology of the main human cancers. En: Potential Industrial Carcinogens and Mutagens. Eds. Ayres I. C. y Kirschman, J. C. Elsevier Publishing Co. Inc., Amsterdam, 174.

Flores, M. M., Nicola, D. L., 1993. Nutrición en la etiología y tratamiento del cáncer. En: Cancerología. 39(1):1763-1767.

Foltínova, P. y Grones, J., 1996. Euglena gracilis as an eukaryotic test organism form detecting mutagens and antimutagens. Mutation Res., 393:1-6.

Francis, F. J., 1987. Lesser-Know Food Colorants. Food Technology, 41(4):62-68.

Frankel, E. N., Huang, S. W., Aeschbach, R. y Prior, E., 1996. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents carnosic acid, carnosol and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. J. Agric. Food Chem., 44:131-135.

Freeland, J. H., 1981. El ADN la clave de la vida. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México, D. F., 10-20.

Fugita, Y., Wakabayashi, K., Nagao, M. y Suginura, T., 1985. Mutagens. En: LARC Workshop, 144:227.

Fukino, H., Takagi, Y. y Yamane, Y., 1990. Effect of *Spirulina* on the renal toxicity induced by inorganic mercury and cisplatin. Eisei Kagaku, Japan, 36:5.

Furia, T. E., 1972. Color additives in food. En: Handbook of food additives 2nd. Ed. Vol. 1, CRC PRESS., 593-594.

Gacula, M. C. Y Singh, J., 1984. The Analysis of variance and Multiple comparison Tests. In "Statistical Methods in Food and consumer Research." Ed. Schweigert, B. S., Hawthorn, J. y Stewart, G. F. Academic Press, Inc., New York, 62.

Gallegos, A. J., 1993. The past, present and future of algae in Mexico in *Spirulina*, algae of life. (Ed). Durand-Chastel H. Bull. Inst. Ocean, 12:133-139.

Gantt, E., Lipshultz, C. A., Grabowski, J., and Zimmerman, B. K., 1979. Phycobilisomes from Blue-Green and Red algae, Plant Physiology, 63:615-620.

Gardner, J. E., 1980. Introducción. En: Principios de Genética. Ed. LIMUSA. México, D. F., 1-2.

Gaziano, J. M., Manson, J. E. y Hennekens, C. H., 1994. Natural antioxidants and cardiovascular disease: observational epidemiologic studies and randomized trials. In: Natural antioxidants in human health and disease (B. Frei, de.), Academic Press., 387-409.

Gaziano, J. M. y Hennekens, Ch. H., 1996. Uptake on dietary antioxidants and cancer. *Path Biol.*, 44:42-45.

Gechner, T., Veleminsky, J. y Pokorny, V., 1982. Somatic mutations induced by maleic hidrazide and its potassium and diethanolamine salts in the *Tradescantia* mutation assay. *Mutation Res.*, 103:289-293.

Gentile, J. M. y Gentile, G. J., 1991. The metabolic activation of 4-nitrophenylenediamine by chlorophyll-containing plant extracts. Ther relationships between mutagenicity and antimutagenicity, *Mutation Research*, 250:79-86.

Gerster, H., 1993. Anticarcinogenic effect of common carotenoids. *Int J. Vitamin Nutr Res.*, 63:93-121.

Gichner, T. y Veleminsky, J., 1988. Inhibitors of N-nitroso compounds-induced mutagenicity. *Mutation Research*, 195:21-43.

Gichner, T., Cabrera, L. G., Wagner, E. D. y Plewa, M. J., 1994. Induction of somatic mutations in *Tradescantia* clone 4430 by three phenylenediamine isomers and the antimutagenic and ammonium meta-vanadate. *Mutation Rev.*, 306:165-172.

Gilliland, F. D., 1997. Ethnic differences in cancer incidence. A marker for inherited susceptibility. *Environ. Health Perspectives* 105:897-900.

Glatthaar, B. E., Hornig, D. H. y Moser, V., 1986. The role of ascorbic acid in carcinogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 206:357.

Gómez, R. R., 1994. Determinación de colorantes sintéticos en dulces y su efecto genotóxico. Tesis para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad Autónoma de Querétaro.

Gonzalez de Mejía, E., Ramos-Gómez, M. y Loarca-Piña, G., 1997. Antimutagenic activity of natural xanthophylls against aflatoxin B₁ in *Salmonella typhimurium* *Environ Mol Mutag.*, 30:346-353.

Goodwin, T. W., 1976. Structure, properties and distribution of chloropylls, Chemistry of carotenoids, Algal biliproteins and phycobilins, En: Chemistry and biochemistry of plant pigments, T. W. Goodwin (Ed), Academic Press London, 1:1-57, 149-219, 328-371.

Graham, S., Dayal, H., Swanson, M., Mittelman, A. y Wilkinson, G., 1978. Diet in the epidemiology of cancer of the colon and rectum. *J. Natl. Cancer Res. Inst.*, 61:709-714.

Gross, J., 1987. Chlorophylls, Carotenoids; En: Pigments in fruits, B. S. Schwegert (Ed), Academic Press London, 1-57, 59-86.

Gustafson, K. R., Cardellina II, J. H., Fuller, R. W., Weislow, O. S., Kiser, R. F., Snader, K. M., Patterson, G. N. L. y Boyd, M. R., 1989. AIDS-Antiviral sulfolipids from Cyanobacteria (Blue-Green Algae), 81(16):1254-1258.

Hart, F. L. y Fisher, H. J., 1971. Colorantes. En: Análisis Moderno de los Alimentos. Edit. Acribia. Zaragoza, España. 532-549.

Hatchcock, N. J., 1982. Comparative risk analysis of technological hazards. En: Nutritional toxicology. Ed. I. E. Liener, Academic Press Inc., New York, 73.

Hatchcock, N. J., 1984. Comparative risk analysis of technological Hazards. In: Nutritional Toxicology. Ed. I. E. Liener, Academic Press. Inc., New York, 87.

Haveland-Smith, R. B. y Combes, R. D., 1980. Screening of food dyes for genotoxic activity. Food Cosmet. Toxicol., 18:215-221.

Haveland-Smith, R. B., Combes, R. D. y Bridges, B. A., 1982. Studies on the genotoxicity of fluorescein dyes mutation Res., 88:1.

Haxo, F. T., O'hEocha, C. y Norris, P. S., 1955. Comparative studies of chromatographically separated phycoerythrins and phycocianins, Arch Biochem biophys, 54:162-173.

Hayashi, O., Kato, T. y Okuwaki, Y., 1994. Enhancement of antibody production in mice by dietary *Spirulina platensis*. J. Nutr. Sci. Vitaminol, 40:431-441.

Hayatsu, H., Negishi, T. y Arimoto, S., 1988. Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Mutation Research, 202:429-446.

Hennekens, Ch., y Gaziano, M., 1993. Antioxidants and Heart Disease: Epidemiology and Clinical Evidence. Clin. Cardiol. 16 Suppl., 1-10-1-15.

Henrikson, R., 1981. Earth Food *Spirulina*, Ronore Enterprises, Laguna Beach, C. A. 619.

Hofstadter, D. R., 1982. ¿Es arbitrario el código genético?, ¿Podría otro código funcionar igualmente bien?. Investigación y Ciencia, 68:112-119.

Hooper, K. N., Gold, S. L., Backman, G. y Peto, R., 1987. Monitoring in occupational genotoxicans. Cancer prevention. Strategies in the workplace, Becker, C. Ed. Hemisphere. Washington DC., 217-228.

Hoogenboom, L. A. P. y Kuiper, H. A., 1997. The use of in vitro models for assessing the presence and safety of residues of xenobiotics in food. Food Science and Technology, 8:157-166.

Howson, C. P., Hiyama, T. y Wynder, E. L., 1986. The decline in gastric cancer: Epidemiology of an unplanned triumph. *Epidemiol Rev.*, 8(1):639.

Hueper, W. C. y Conway, W. D. 1964. Proposed system for food safety assessment. En: "Chemical Carcinogenesis and cancers." Ed. T. Thomas, 154. Morgan Kings, Inc., Springfield. Illinois.

Igoe, R. S., 1983. "Dictionary of Food Ingredients" Social and Economic Committee, Food Safety Council. Van Nortrand Reembold Co., New York, 34-55.

Ilker, A., 1987. *In Vitro* Pigment Production: An Alternative to color Synthesis. Plant tissue culture may be un reliable, cost-effective means of boosting pigment production. *Food Technology*, 41(4):70.

Infante, P. F., Wagoner, J. K. y Waxweiler, R. J., 1976. Carcinogenic, mutagenic and teratogenic risks associated with vinyl chloride. *Mutat. Res.*, 41:131.

Ingram, D., 1994. Diet and subsequent survival in women with breast cancer. *Br J. Cancer*, 69:592-595.

Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática 1999. Información Estadística del Sector Salud y Seguridad Social, Mortalidad por causas, cuaderno No. 15, 45-67.

Instituto Nacional de Normalización, 1984. Chile. Algas comunmente reconocidas en Chile para fines comerciales. Nomenclatura común y científica. NCH 1857.

IRDC. 1992. Long-term dietary toxicity/ carcinogenicity study in rats. Final report. International Research and Development Corporation.

Ishidate, Jr. M., Sofuni, T. K., Voshikawa, K., Hayashi, M. I., Nohmi, R., Sawada, M. y Matsuoka, A., 1984. Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Food Chem. Toxicol.*, 22:623-628.

Ito, Y., Maeda, S. y Sugiyama, T., 1986. Suppresion of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced chromosome aberrations in rat bone marrow cells by vegetable juices. *Mutation Res.*, 172:55-60.

Iwata, K., Inayama, T. y Kato, T., 1990. Effects of *Spirulina platensis* on plasma lipoprotein lipase activity in fructose-induced hyperlipidemic rats, *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, 40:431-441.

Jain, M. y Miller, A. B., 1994. To T Premorbid diet and the prognosis of women with breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 86:1390-1397.

Jidong, S., Giraud, W. D., Rodney, A., Moxley, J. A. y Driskell, 1997. β -carotene and α -tocoferol Inhibit the Development of Atherosclerotic Lesions in Hypercholesterolemic Rabbits.

Kada, T., Morita, K. y Inoue, T., 1978. Antimutagenic actions of vegetable factor (s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrrolisate, *Mutation Research*, 53:351-353.

Kalter, H., 1971. Correlation Between Teratogenic and mutagenic effects of chemical in mammals. En: *Chemical mutagens. Principles and methods for their detection*. Ed. A. Hollaender, 1:57.

Kay, R. A., 1991. Microalgae as food as supplement, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30(6):555-573.

Kazdova, L., Urbanova, D., Vrana, A., Matejekova, M. y Novakova, V., 1995. Protective effect of vitamin E on aortic lipid peroxidation and atheroma formation in hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis* 115 (Suppl.), S47.

Kim, D., Ahn, B., Yeum, D., Lee, D., Kim, S. y Park, Y., 1987. Degradation of carcinogenic nitrosamine formation factor by natural food components: 1. Nitrite-scavenging effects of vegetable extracts, *Bull. Korean Fish Soc.*, 20:463-468.

Knasmueller, S., Martin, R. D., Womjan, G. y Szakmary, A., 1989. Studies on the antimutagenic activities of garlic extract. *Environ. Mol. Mutagen.*, 13:357-365.

Knekt, P., 1988. Serum vitamin E level and risk of female cancers. *Int. J. Epidemiol.*, 17:281.

Kolbye, A. C., M. D., M. P. H. y J. D., 1983. Food Legislation and control of carcinogens in Food. *Environmental aspects of cancer. The role of macro and micro components of foods*. Food and Nutrition Press Inc. Westport Connecticut, USA., 238-248.

Krinsky, N. I., 1993. Actions of carotenoids in biological system. *Ann Rev Nutr.*, 13:561-587.

Lacaz-Ruiz, R., and Mos, E. N., 1990. Producción de biomasa de *Spirulina maxima* para alimentación humana y animal. *Rev. Microbiol.*, 21:85-97.

Lafont, A. M., Chai, Y. C., Cornhill, J. F., Whitlow, P. L., Howe, P. H. y Chisolm, G. M., 1995. Effect of alpha-tocopherol on restenosis after angioplasty in model of experimental atherosclerosis. *J. Clin. Invest.*, 95:1018-1025.

Lai, C. N., Bultler, M. A. y Matney, T. S., 1980. Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content. *Mutation Research*, 77:245-250.

Ledezma, M. A. y Alvarez, D. J., 1990. Evaluación de parámetros de la norma de calidad en algunos cárnicos. Ensayo genotóxico en *Tradescantia* de colorantes empleados en la industria cárnica. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro.

Lemoine, L., Dang, D. K., Phan, P. A., Zabulon, G. y Thomas, J. C., 1993. Influence of salinity on the Growth Rates and on Pigments and Protein Contents of *Spirulina maxima* an *Spirulina platensis* in *Spirulina*, *Algae of life*. H. Durand-Chastel et al. (Ed). *Bull. Ins. Ocean*, 12:77-85.

Leonard, A., 1975. Test for heritable translocations in male mammals. *Mutation Research*, 31:277-290.

León, J., Guerrero, I. y Pellicer, A., 1988. Activación de los oncogenes por radiación y agentes químicos. *Investigación y Ciencia*, 143:20-32.

Levine, R. P., 1974. Estructura y Duplicación del Material Genético. En: *Genetica*. CECSA. México, D. F., 28-33.

Lijinski, W., 1989. A view of the relations between carcinogenesis and mutagenesis. *Environmental and molecular mutagenesis*, 14(16):78:84.

Lisheng, 1991. Inhibite effect and mechanism of polysaccharide of *Spirulina* on transplanted tumor cells in mice. *Marine Sciences*, Qingdao, China, 5:33-38.

Loomis, T. A., 1974. Principies de Biological Test for toxicity. *Essentials of toxicology*. Ed. LEA and Febiger Philadelphia., 167.

López, C. L., 1995. Epidemiología del Cáncer de estómago. En: *Cancerología*, 41(1):34-58.

Loseva, L. P. y Dardynskaya, I. V., 1993. 6th International Congress of Applied Algology, Research Institute of Radiation Medicine, Minsk, Belarus, Czech Republic. Belarus. September, 1993.

Lowering, 1985. Blood cholesterol to prevent heart disease. Concensus conference. *JAMA*, 253(14):2080-2086.

Lubet, R. A., Connolly, G., Kouri, R. E., Nebert, D. W. y Bigelow, S. W., 1983. Biological effects of the Sudan dyes: Role of Ah cytosolic receptor. *Biochemical Pharmacology*, 32:3053-3058.

Lupescu, A., 1993. The role of vitamins A, β -caroteno, E and C in Cancer Cell Biology. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 63:3-14.

Ma, T. H., 1981. *Tradescantia*-Micronucleus-in-Tetrad mutagen test for on site monitorin and further validation, US EPA Report, EPA 600/SI/81-019.

Ma, T. H., 1983. *Tradescantia*-Micronucleus (TRAD-MCN) test for environmental clastogens. In: Kolber, A. R., Wong, T. K., Grant, L. D., Dewoskin, R. S., and Hughes, T. J. (Eds). *In vitro toxicity testing of Environmental Agents, Current and Future possibilities*. Plenum Press. NY., 191-214.

Ma, T. H., Harris, M. M., Anderson, V. A., Ahmed, I., Mohammad, K., Bare, J. L. y Guanghen, L., 1983. *Tradescantia*-micronúcleos (TRAD-MCN) test on 140 health related agents, *Mutation Res.*, 138:157-167.

Ma, Te-Hsiu., 1986. Desarrollo y aplicación de bioensayos rápidos y fáciles para mutágenos ambientales. *Investigación*, 16/17:130-132.

Mahan, K. L., R. D., C. D., M. S. y Arlin, T. M., 1995. Vitaminas. En: *Nutrición y Dietoterapia*. Interamericana Mc Graw-Hill, México, D. F., 101-105.

Marmion, D. M., 1984. *Handbook of U. S. Colorants for food, drugs and cosmetics*. John Wiley y Sons Inc. USA.

Marshall, A. y Van Elswyk., 1995. Dietary Polyunsaturated Fat. *Nutrition Today*, 30:207-213.

Martínez, C. J. P.R. y Velázquez, L. R., 1995. Identificación, cuantificación y su efecto genotóxico. Tesis para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad Autónoma de Querétaro.

Mathews-Roth, M. M., 1982. Antitumor activity of beta-carotene, canthaxantina and phytoene, *Oncology*, 39:33-37.

Medvedev, Z. A., Crowne, H. M. y Medvedeva, M. N., 1988. Age related variations of hepatocarcinogenic effect of azo dye (3'-MDAB) as linked to the level of hepatocyte polyploidization. *Mechanisms of Ageing and Development*, 46:159-174.

Meggos, H. N., 1984. Colors: Key food ingredients. *Food Technol*, 38:70.

Mendoza, F. C. y Pino, J. A., 1964. Efecto pigmentante de tres fuentes de xantofilas sobre la yema de huevo, *Técnica Pecuaria*, 3:20-23.

Milner, J. A., 1994. Reducing the Risk of Cancer. En: *Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals*. (Eds.) Goldberg, I. Chapman y Hall, Inc. United States of America, 39.

Miller, K., 1982. Sensitivity to tartrazine. Br. Med. Journal, 285:159.

Miller, S. A. y Skinner, K., 1983. Science and the law: The basis for new food safety legislation. En: Environmental aspects of cancer. The role of macro and micro components of foods. Food & Nutrition Press Inc. Westport, Connecticut, USA, 231-237.

Mirvish, S. S., 1986. Effects of the Vitamin C and E on N-nitroso compound formation, carcinogenesis and cancer. Cancer, 58:184.

Muenzner, R., 1986. Modifying action of vegetable juice on the mutagenicity of beef extract and nitrosated beef extract. Food Chem. Toxicol., 24:847-850.

Nayaka, N., Honma, Y. y Goto, Y., 1988. Cholesterol lowering effect of *Spirulina* Nutrition Reports International 33:565-574.

Newsome, R. L., 1986. Food Colors. Food Technology, 40(7):49-56.

Nili, E., Noguchi, N. y Tsuchihashi, H., 1995. Interaction among Vitamin C, Vitamin E, and β -carotene. Am J Clin Nutri, 62:1322-6S.

Nony, C. R., Bowman, M. C., Cairns, T., Lowy, L. K. y Tolos, W. P., 1980. Metabolism studies of an azo dye and pigment in the hamster based on analysis of the urine for potentially carcinogenic aromatic amine metabolites. Journal of Analytical Toxicology, 4:132-140.

Novick, A. y Szilard, L., 1952. Anti-Mutagens, Nature (London), 170:926-927.

Ondarza, R. N., 1988. Fotosíntesis Fijación del CO₂ Biología Moderna, Ed. Trillas, México, 177-178.

Ong, T., Whong, W., Stewart, J. y Brockman, H., 1986. Chlorophyllin a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures, Mutation Research, 173:111-115.

OPS, 1980. Criterios de salud ambiental 6. Principios y métodos para evaluar la toxicidad de las sustancias químicas, parte I. OPS/OMS. México, D. F. Caps. 4 y 7.

Oser, B. L., Ford, R. A. y Bruce, K. B. 1984. GRAS Substances. Food technology, 43(10):66-68.

Packer, L., 1994. Vitamin E Is Nature's Master Antioxidant. Scientific American Science & Medicine, 1:2.

Packer, L. y Sullivan, J., 1995. The Promise of Antioxidants. The Saturday Evening Post. Health Effects of Nutritional Antioxidants, Antioxidant Effects of Iron Depletion.

Paganini-Hill, A., Chao, A., Ross, R. K. y Henderson, B. E., 1987. Vitamina A, β -caroteno, and the risk of cancer: A prospective study, Journal and National Cancer Institute, 79:443-448.

Pariza, M. W., 1989. A perspective on diet and cancer. En: Food Toxicology. A perspective on the relative risk. Marcel Dekker Inc. U.S.A, 1-9.

Patterson, R. M. y Butler, J. S., 1982. Tartrazine-induced chromosomal aberrations in mammalian cells. Food Chemists Tox., 20:461.

Patterson, M. G., Baker, K. K., Baldwin, C. L., Caplan, F. R., Larsen, L. K., Levine, I. A., Moore, R. E., Nelson, C. S., Tschappat, K. D., Tuang, G. D., Boyd, M. R., Carsellina II, J. H., Coollins, R. P., Gustarfoson, K. R., Snader, K. M., Weislow, O. S. y Lewinw, R. A., 1993. Antiviral activity of curturated blue-green algae (*Cyanophyta*). J. Phycol., 29:125-130.

Paz, G. V., 1997. Estudio de los pigmentos presentes en extractos obtenidos del alga *Spirulina maxima* y su efecto antígenotóxico. Tesis para obtener el Título de Químico Biólogo. Universidad Autónoma de Querétaro.

Pelczar, M. J., 1988. Microbiología. Mc. Graw-Hill, México, 8:304-305.

Percy, A. J., Moore, N. y Chipman, J. K., 1989. Formation of nuclear anomalies in rat intestine by benzidine and its biliary metabolites. Toxicology, 57:217-223.

Peto, R., Doll, R., Buckley, J. D. y Sporn, M. B., 1981. Can dietary β -carotene materially reduce human cancer rates, Nature (London), 290:201-208.

Piper, M. J., Tonacia, J. y Matanoski, M. G., 1985. Phenacetin use has gardually decreased following reports of urinary bladder and Kidney tumors in rats and mice. N. Expel. J. Med., 292:313.

Pirie, N. W., 1975. The *Spirulina* algae, En: Food proteins sources, N. W. Pirie (Ed), Int. Biol. Progr. 4 Cambridge University Press, Cambridge, 33-34.

Potter, J. D., 1992. Epidemiology of diet and cancer: evidence of human maladaptation. In Macronutrients. Investigating Their role in cancer. Micozzi, M. S., and Moon, T. E., eds., Marcel Dekker. New York, 55-84.

Prasad, K. y Kalra, J., 1993. Oxygen free radicals and hypercholesterolemic atherosclerosis: effect of vitamin E. Am. Heart J., 125:958-973.

Prival, M. J., Davis, V. M., Peiperl, M. D. y Bell, S. J., 1988. Evaluation of azo food dyes for mutagenicity and inhibition of mutagenicity by methods using *Salmonella typhimurium*. Mutation research, 206:247-259.

Pryor, W. A., 1991. The antioxidant nutrient and disease prevention: What do we need to find out? Am J Clin Nutr, 53 (1):391-393.

Qishen, P., Baojiang, G. y Kolman, A., 1989. Radioprotective effect of extract from *Spirulina platensis* in mouse bone marrow cells studied by using the micronucleus test, En: Toxicology Letters, 48:165-169.

Qureshi, M. A., Garlich, J. D. y Kidd, M. T., 1996. Dietary *Spirulina platensis* Enhances Humoral and Cell-Mediated Immune Functions In Chickens. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 18(3):465-476.

Quintanar, H. J. A., 1995. Evaluación del potencial antimutagénico de los extractos de variedades de chile verde (*Capsicum spp*) de mayor consumo en el Estado de Querétaro. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Querétaro.

Ramel, C., 1978. The detection and control of mutagenic and carcinogenic compounds in the environment. AMBIO, 7:244.

Ramel, C., Alekperov, U. K., Ames, B. N., Kada, T. y Wattenberg, L. W., 1986. Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis, Mutation Research, 168:47-65.

Ramos, G. M., 1995. Efecto antimutagénico de xantofilas presentes en flor de cempasuchil (*Tagetes erecta*) y mecanismo de inhibición de luteína sobre 1-nitropireno y aflatoxina B1, Tesis de Maestría, DIPA, Universidad Autónoma de Querétaro.

Reddy, K. J. y Lafwuani, D. N., 1983. The human dose clofibrate is 2 g per day for many years. An epidemiologic study is in world Health Organization. Report. Lancet 1984-II 600. Haveland, J. R. y Kane, P. J., 1982. Answ. Rev. Med., 33:417.

Renner, W., 1985. Anticlastogenic effects of β -carotene in Chinese hamster time and dose-response studies with different mutagens Mutation Res., 144.

Rimm, E., Stamfer, M. y Ascherio, A., 1993. Vitamin E Consumption and the Risk of Coronary Heart Disease in Men. The New England Journal of Medicine, 328:1450-1456.

Robles, C. A., Soriano, T. J. y Shimada, A. S., 1975. El valor nutritivo del alga *Spirulina (Spirulina geitleri)* para el cerdo de abasto, Técnica Pecuaria, 28:13-16.

Rojas, M. J. I., 1992. Aislamiento, identificación y cuantificación de aditivos colorantes presentes en bebidas no carbonatadas, no alcohólicas de mayor consumo en la ciudad de Querétaro y su relación con posibles efectos genotóxicos. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro.

Rosetta, L. N., 1990. Natural and Synthetic Coloring Agents. Food Additives. Eds. Branen, L. A., Davidson, M. P. y Salminen, S., Marcel Dekker, Inc., USA., 327-345.

Ruiz, F. L. E., Valtierra, R. M. E., Lecona, U. S., Pérez, A. y Ma, T. H., 1992. *Tradescantia*-Micronucleus (TRAD-MCN) bioassay on clastogenicity of wastewater and in situ monitoring. *Mutation Res.*, 270:45-51.

Ruiz, F. E., Rea, L. M. A., Díaz, R. A., Audifred, I. y Rodríguez, M. E., 1993. Prueba de MCN en *Tradescantia* para bebidas refrescantes y edulcorantes sin valor calórico. Reporte final de investigación. CEACA-UAQ.

Ruiz, E., Madrigal-Bujaidar, E., Salazar, M., Carvajal, G. y Chamorro, G., 1999. Medical Science Research Clastogenic activity of the new anticonvulsivant 4-hydroxy-4-ethyl-4-phenylbutyramide in the *Tradescantia* bioassay, 27(1):45-47.

Sabaté, J., 1995. Que podemos comer hoy para no enfermar mañana. *Med Clin.*, 104:17-18.

Salazar, M., Chamorro, G. A., Salazar, S. y Steele, C. E., 1996. Effect of *Spirulina maxima* consumption on reproduction and peri-and postnatal development in rats. *Food Chem Toxicol*, 34:353-359.

Salazar, M., Martínez, E., Madrigal, E., Ruiz, L. E. y Chamorro, G. A., 1998. Subchronic toxicity study in mice feed *Spirulina maxima* *Journal of Ethnopharmacology*.

Samter, M. y Beers, R. F., 1967. Concerning the nature of intolerance to aspirin. *J. Allergy*, 40:281-293.

Santamaría, L., Bianchi, A., Arnaboldi, A., Andreoni, L. y Bermond, P., 1983. Dietary carotenoids block photocarcinogenic enhancement by benz(a)pyrene and inhibits its carcinogenesis in the dark, *Experientia*, 39:1043-1045.

Santillán, C. C., 1982. Mass production of *Spirulina*. *Experientia*, 28:40-41.

Sarkar, D., Sharma, A. y Talukder, G., 1983. Differential protection of chlorophyllin against clastogenic effects of chromium and chlordane in mouse bone marrow *in vivo*. *Mutation Res.*, 301:33-38.

Sarkar, D., Sharma, A. y Talukder, G., 1994. Chlorophyll and chlorophyllin as modifiers of genotoxic effects, *Mutation Res.*, 318:239-247.

Sarkar, D., Sharma, A. y Talukder, G., 1996. Clastogenic activity of pure chlorophyllin and anticlastogenic effects of equivalent amounts of crude extract of indian spinach leaf and chlorophyllin following dietary supplementation too mice. *Environmental and Molecular mutagenesis*, 28:121-126.

Sato, T., Ose, Y., Nagase, H., Kito, H., 1990. Mechanism of antimutagenicity of aquatic plant extracts agaist benzo(a)pyrene in the *Salmonella* assay, *Mutation Research*, 241:283-290.

Sautier, C. y Tremolieres, J., 1976. Valeur alimentaire des algues *Spirulines* chez l'homme, *Ann. Nutr. Aliment*, 30:517-534.

Sax, K., 1938. Chromosome aberration induced by X-rays. *Genetics*, 23:494-516.

Sax, K., 1957. The effect of ionizin radiation on chromosomes, *Quart. Rev. Biol.*, 32:15.

Schmidt-Hebbel, H., 1981. *Avances en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, AlfaBeta impresores.

Schmid, W., 1976. The micronucleus test for cytogenetic analysis. En: *Chemical Mutagens: Principles and Methods for their delection*, Plenum Press, New York-Londres, 4:31-53.

Schramm, A. T., 1984. Future trends in risk analysis. *Food Technology*, 43(10):119-122.

Schuep, W. y Schierle, J., 1997. Determinación de β -carotene in Commercial Foods: Interlaboratory Study, *Journal of AOAC International*, 5(80):1057-1063.

Schwartz, J., Shklar, G., Reid, S. y Trickler, D., 1988. Prevention of experimental oral cancer by extracts of *Spirulina-Dunatiella* algae. *Nutr. Cancer*, 11:127-134.

Senti, F. R., 1981. Food Additives and Food Safety. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, 20(2):237-246.

Shaish, A., Daugherty, A. O., Sulivann, F., Schonfeld, G., y Heinecke, J. W., 1995. β -carotene inhibits atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *J. Clin. Invest.*, 96:2075-2082.

Sharma, A., 1990. Modulation of mutagenesis by plants products. Platinum Jubilee Lecture, Indian Science Congress Association, Cochin, India.

Sharrat, M., Frazer, A. C. y Paranjoti I. S., 1966. Biological effects of citrus red No. 2 in the mouse. *Food Cosmetic. Toxicol.*, 4:4493-502.

Shekelle, R. B., Liu, S., Raynor, Jr. W. J., Lepper, M., Maliza, C., Rosoff, A. H., Paul, O., Shryock, A. M. y Stamler, J., 1981. Dietary vitamin A and risk of cancer in the Western Electric study, *Lancet*, II:1185-1189.

Shu, X. O., Gao, Y. T., Yuan, J. M., Ziegler, R. G. y Brinton, L. A., 1989. Dietary factors and epithelial ovarian cancer, *Br. J. Cancer*, 59:92-96.

Simon, R. A., 1984. Adverse reactions to drug additives. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 74:623.

Smith, M. V., 1984. Use for risk assesment in regulatory decision-making. *Food Technology*, 43(10):113-118.

Smith, M. J., Miller, C. W., Harris, M. y Allen, K. G. D., 1994. β -carotene administration decreases LDL oxidation, plasma malondialdehyde and atherosclerosis in Yucatán Miniature Swine. *FASEB. J. & A804*. (Abstr).

Sortwell, D. R., 1995. VIII Simposio de Nutrición y Alimentos México, D. F., 1-9.

Stampfer, M. J., Hennekens, C. H., Manson, J. E., Colditz, G. A., Rosner, B. y Willett, W. C., 1993. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N Engl. J. Med.*, 328:1444-9.

Steinberg, D., Parthasarathy, S., Care, T. E., Khoo, J. C. y Witztum, J. L., 1984. Beyond cholesterol: Modificatons of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.*, 320(14):915-924.

Stoner, G. D., Morse, M. A., and Kelloff, G. J., 1997. Perspectives in Cancer Chemoprevention. *Environmental Health Perspectives*, 105(4):945-953.

Sugimura, T., 1986. Past, present and future of mutagens in cooked food, *Environmental Health Perspectives*, 67:5-10.

Takai, Y., Hoyosomado, Y. y Kato, K., 1991. Effects hypoglucemic of water soluble and water insoluble fractions of *Spirulina* in rats. *J. Jap. Soc. Nutr. Food Sci.*, 44:273-277.

Tejero, E., 1994. Radicales libres y antioxidantes. *Cuadernos de Nutrición*, 17:21-28.

Temple, N. J. y Basu, T. K., 1987. Protective effect of beta-carotene against colon tumors in mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, 78:1211.

Thebaudin, J. Y., Lefebvre, A. C., Harrington, M. y Bourgeois, C. M., 1997. Dietary fibres: Nutritional and technological interest. *Food Science and technology*, 8:41-45.

Trainor, F. R., 1978. *Introductory Phycology*, John Wiley and Sons (Eds), Press, New York, 85-88.

Tredici, M. R., ChiniZitelli, G., Biagiolini, S. y Materassi, R., 1993. Novel photoreactors for the mass cultivation of *Spirulina*, algae of life H. Durand-Chastel, (ed). *Bull. Inst. Ocean*, 12:87-95.

Trosko, J. E. y Chang, Ch., 1978. Relationship between mutagenesis and carconogenesis. *Photochem, Photobiol*, 28:157.

Troxler, R. F., Foster, J. A., Brown, A. S. y Franzblau, C., 1975. The alfa and β subunits of *Cyanidium Caldarium* phycocyanin: Properties and Amino Acid Sequences at the Amino Terminus. *Biochemistry*. 2(14):268-274.

Uri, N., 1961. Mechanism of antioxidation. En: *Autoxidation and Antioxidants*, Vol. I., Lundberg, W. O. (Ed). Widely, New York, 133.

Valdés, S. E., 1991. Toxicología de Aditivos. Conferencia en el Centro de Estudios Sobre Contaminación Ambiental. Curso de Toxicología de Alimentos.

Vargas, Q. N. A., Gonzalez, E., Nieto, V. Z. y Valle, V. P., 1996. Colorantes usados en productos alimenticios que se comercializan sin marca y se expenden en Escuelas Primarias y Parques del Distrito Federal. *Tecnol. Aliment. México*, D. F., 31(3):10-15.

Van Poppel, G., 1993. Carotenoids and cancer: an update with emphasis on human intervention on studies. *Eur J Cancer*, 29A:1335-1344.

Vega, S., 1985. Evaluación del riesgo en la exposición a sustancias químicas. En: *Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales*. Toxicología VI. OPS/OMS. México, D.F., 2-17.

Vega, S., 1985a. Carcinogénesis química. En: *Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales*. Toxicología IV. OPS/OMS. México, D.F., 2-15.

Vega, S., 1985b. Genotoxicidad y daño al sistema reproductor. En: *Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales*. Toxicología V. OPS/OMS. México, D.F., 3-5.

Wahle, K., Rice-Evans, C. y Bruckdorfer, K., 1990. Lipids, Lipoproteins and antioxidants in Cardiovascular Dysfunction. *Biochemical Society Transactions*, 18:1041-1045.

Waters, M. D., Brady, A. L., Stack, H. F. y Brockman, H. E., 1990. Antimutagenicity profiles for same model compounds. *Mutation Research*, 238:57-85.

Watson, J. D. y Crick, H. C., 1953. Genetical implications of the structure of the deoxyribonucleic acid. *Nature*. 171:964-967.

Weisberger, J. H., 1986. Role of fat, fiber, nitrate and food additives in carcinogenesis: a critical evaluation and Recommendations. *Nutr Cancer*, 8:47.

Weisz, P. B., 1972. Clases de plantas Monera. En: *Tratado de Botánica*, Ed. C.E.C.S.A., México, 169-189.

Wortzen, G., Larsen, T. C. y Tarding, F., 1978. Hemoglobin formation in vivo induced by azo-dyes and their metabolites. *Toxicologic aspects of food Safety. Arch*, 1:309.

Wynder, E. L. y Gori, G. B., 1977. Contribution of the environmental to cancer incidence: an epidemiologic exercise *J. Natl. Cancer Inst.*, 58:825-832.

Ziemiński, S. y Panczenko-Kresowska, B., 1994. Beta-carotene, vitamin E and vitamin C prevent the progression of atherosclerosis in hyperlipidemic guinea pigs. *Atherosclerosis X*, 4 (abstr).

Zimmerman, E. F., 1975. Chemical structure and teratogenic mechanism of action. En: *Methods for Detection of environmental agents that produce congenital defects*. Ed: Th H., Shepard, J. R., Miller, M. M., 79.

ANEXOS

ANEXO 1. PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DE ALGUNOS ADITIVOS COLORANTES SINTÉTICOS UTILIZADOS CON MAYOR FRECUENCIA EN JUGOS, DULCES Y REFRESCOS (TARTRAZINA Y AZUL BRILLANTE)

1.1 TARTRAZINA

Es un colorante con buena estabilidad a cambios de pH, no muestra cambios a pH de 3 a 8. Excelente solubilidad en agua, de 20g a 100ml de agua a 25 C°. Buena estabilidad a la luz y al calor y regular estabilidad a la oxidación. Buena fuerza pigmentaria; compatibilidad moderada con los componentes alimenticios. Se utiliza en alimentos para animales, postres, cereales y helados (Igoe, 1983).

1.2 AZUL BRILLANTE

Colorante con solubilidad de 20g en 100ml de agua a 25 C°, su estabilidad disminuye después de una semana a pH 3, 7 y 8, es inestable en álcalis como Na₂CO₃ al 10% y NH₄OH al 10%, tiene buena estabilidad a la oxidación y al calor, con excelente fuerza pigmentaria. Se utiliza con otros colorantes primarios para producir una variedad de tonos, teniendo una buena compatibilidad con otros componentes de los alimentos. Se utiliza en dulces, repostería, bebidas no alcohólicas (Igoe, 1983).

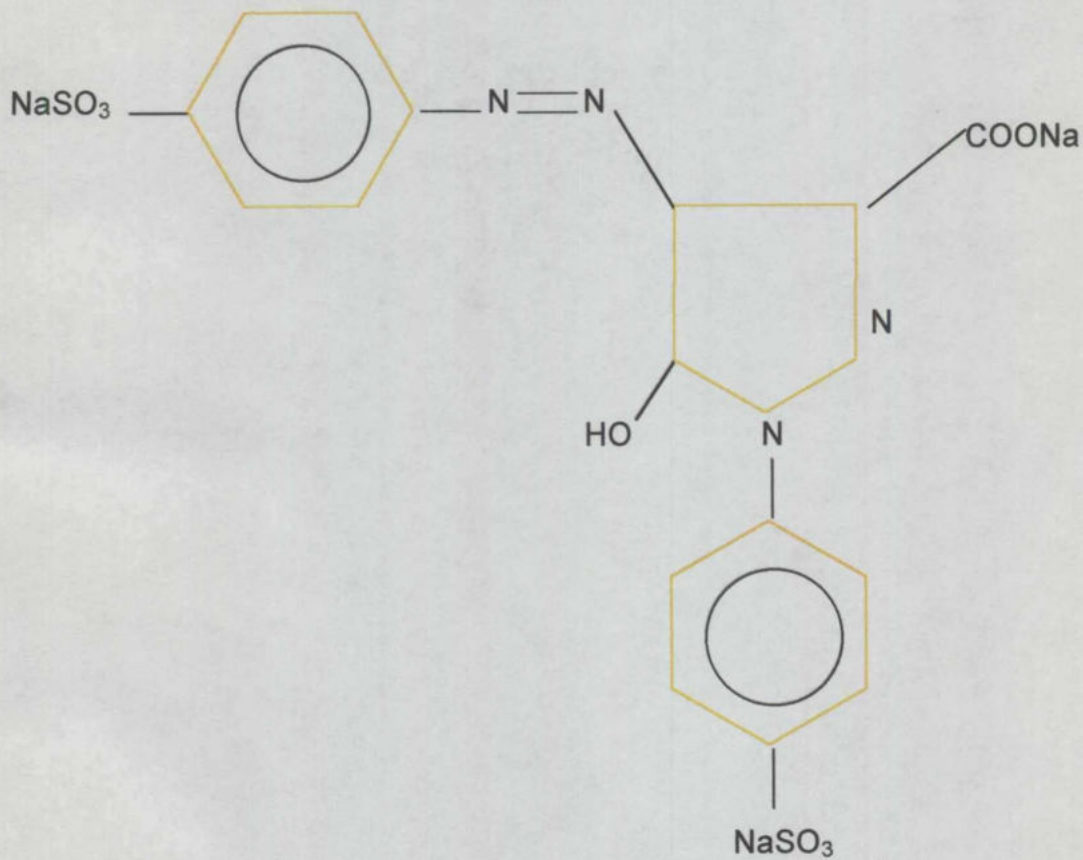
ANEXO 2. ESTRUCTURA QUIMICA DE ALGUNOS ADITIVOS COLORANTES SINTÉTICOS UTILIZADOS CON MAYOR FRECUENCIA EN JUGOS, DULCES Y REFRESCOS (TARTRAZINA Y AZUL BRILLANTE)

2.1 TARTRAZINA

La tartrazina pertenece a los colorantes disazoicos, es una sal trisódica del ácido 5-hidroxi-2-p-sulfofenil-4-(p-sulfofenilazo) pirazol-3-carboxílico.

Fórmula química: $C_{15}H_9N_4O_9S_2Na_3$

Peso molecular = 534.4



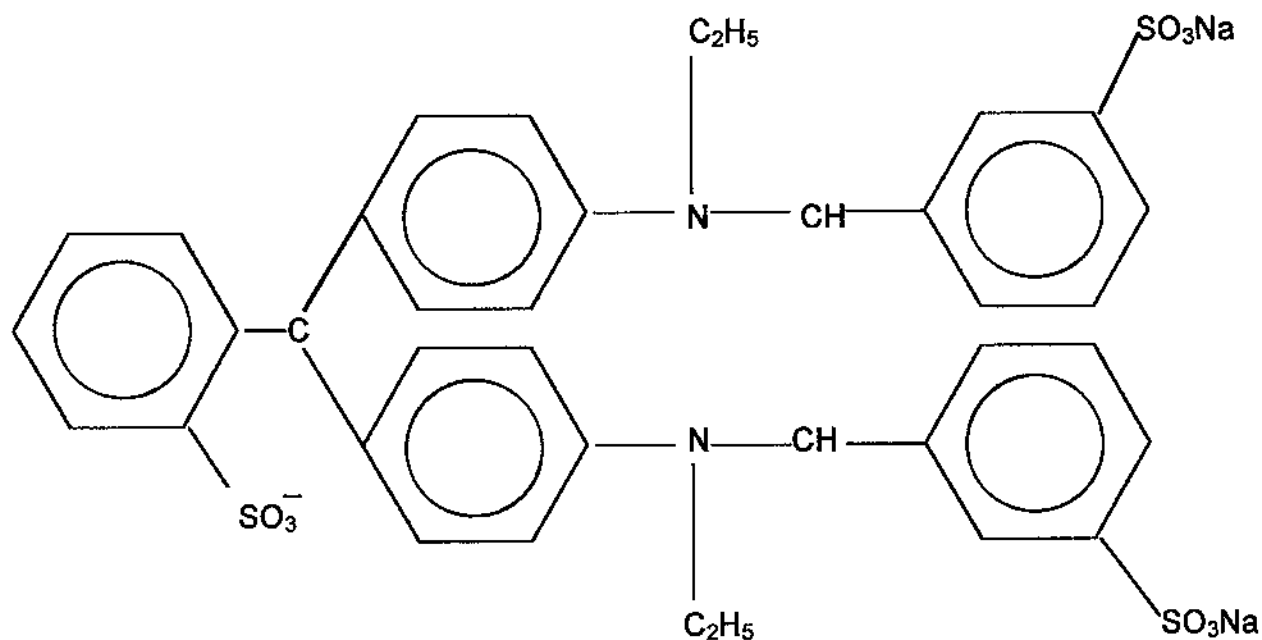
(de Saint Blanquat, 1988).

2.2 AZUL BRILLANTE

Se clasifica dentro de los colorantes del trifenilmetano, es una sal disódica de 4-{{4-(N-etil-p-sulfobencil-amino)-fenil)-(2-sulfonium-fenil)-metileno}{-(1-(N-etil-N-p-sulfobencil)- 2,5-ciclohexadienimina).

Fórmula química: $C_{37}H_{34}N_2O_9S_3Na_2$

Peso molecular: = 792.84.



(Furia, 1972).

