

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA  
REPÚBLICA (PROPAC)

Actividad antimutagénica de compuestos fenólicos presentes en la  
flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) contra 1-nitropireno

**T E S I S**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
**MAESTRO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

p r e s e n t a

**ISIDRO RESÉNDIZ LÓPEZ**

Santiago de Querétaro, Qro., Noviembre de 1999.

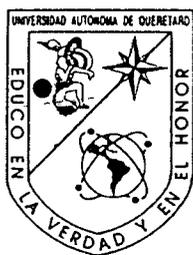
No Adq. H61585

No. Título \_\_\_\_\_

Clas. 582.014

R433a

Ej01



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE QUÍMICA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS  
(PROPAC)

Actividad antimutagénica de compuestos fenólicos presentes en la flor de jamaica  
(*Hibiscus sabdariffa* L.) contra 1-nitropireno

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA  
ISIDRO RESÉNDIZ LÓPEZ

DIRIGIDA POR  
DRA. MA. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA

SINODALES

DRA. MA. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA  
PRESIDENTE

DR. EDUARDO CASTAÑO TOSTADO  
SECRETARIO

DR. MAMADOU MOUSTAPHA BAH  
VOCAL

M. en C. CRISTINA CABRERA MUÑOZ  
SUPLENTE

M. en C. JORGE ÁLVAREZ DOMÍNGUEZ  
SUPLENTE

Q.M. J. MERCED ESPARZA GARCÍA  
DIR. DE LA FACULTAD DE QUÍMICA

DRA. MA. GUADALUPE BERNAL SANTOS  
DIR. DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CENTRO UNIVERSITARIO  
SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO., MÉXICO.

**El Presente Trabajo se Realizó en el Laboratorio de  
Bioquímica Toxicológica del Posgrado en Alimentos de la  
Facultad de Química de la Universidad Autónoma de  
Querétaro, bajo la Dirección de la Dra. Ma. Guadalupe  
Flavia Loarca Piña**

## AGRADECIMIENTOS

A mis asesores:

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña,  
M. en C. Cristina Cabrera Muñoz,  
Dr. Mamadou Moustapha Bah,  
Dr. Eduardo Castaño Tostado y al  
M. en C. Jorge Álvarez Domínguez.

Gracias por sus asesorías, comentarios, observaciones y sobre todo por la motivación que me brindaron para poder culminar el presente trabajo de investigación.

A la Universidad Autónoma de Querétaro que por medio de la Facultad de Química me han permitido seguir con mi formación profesional además, agradezco todo el apoyo brindado durante mi estancia en el Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos.

Agradezco también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de beca para efectuar mis estudios de Posgrado.

A todos mis maestros, compañeros y amigos. Gracias.

A.J.P.M.

# INDICE GENERAL

	Página
<b>INDICE GENERAL</b>	i
<b>Lista de Figuras</b>	v
<b>Lista de Cuadros</b>	vi
<b>Lista de Tablas</b>	vii
<b>RESUMEN</b>	1
<b>SUMMARY</b>	2
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>II. ANTECEDENTES</b>	5
1. Alimentos nutraceuticos	5
1.1 Definición	5
1.2 Propiedades de los alimentos nutraceuticos	6
1.3 Mecanismos de acción	8
2. Compuestos fenolicos en alimentos	11
2.1 Generalidades	11
2.2 Propiedades biológicas de los compuestos fenolicos	12
3. La flor de jamaica ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)	15
3.1 Origen	15
3.2 Morfología general	15
3.3 Clasificación taxonómica	17

3.4 Composición química de las partes constituyentes de la planta	17
3.5 Usos y aplicaciones de los extractos de la jamaica	19
4. Hidrocarburos policíclicos aromáticos nitrados (HPAN)	20
4.1 Generalidades	20
4.2 Origen e incidencia de los poliaromáticos nitrados	21
4.3 Efecto tóxico	22
5. Ensayos de mutagenicidad y antimutagenicidad	24
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	26
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	27
<b>V. OBJETIVOS</b>	27
1. Objetivo General	27
2. Objetivos Particulares	27
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	28
<b>A. MATERIAL</b>	28
1. Compuestos químicos	28
2. Material biológico	28
<b>B. MÉTODOS</b>	29
1. Curva de calibración del ácido protocatecuico (APC)	29

2. Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos de <i>H. sabdariffa</i>	30
2.1 Preparación de los extractos de <i>H. sabdariffa</i> y fraccionamiento	30
2.2 Cuantificación de los compuestos fenólicos en los extractos de <i>H. sabdariffa</i>	31
3. Ensayo de Microsuspensión (Modificación a la Prueba de Ames)	31
3.1 Propagación de la bacteria	31
3.2 Preparación de la mezcla de cofactores	32
3.3 Preincubación	32
3.4 Preparación del agar de superficie y vaciado a cajas Petri	32
4. Potencial mutagénico del 1-NP en la cepa YG1024 de <i>S. typhimurium</i>	33
5. Efecto de los extractos HSEc y HSAE de <i>H. sabdariffa</i> sobre la cepa YG1024	34
6. Potencial antimutagénico de los extractos HSEc y HSAE de <i>H. sabdariffa</i> contra la mutagenicidad inducida por 1-NP	34
7. Potencial antimutagénico del ácido protocatecuico (APC) contra la contra la mutagenicidad inducida por 1-NP	34
8. Ensayo de microsuspensión con dos incubaciones (Mecanismos de acción)	34
9. Análisis cualitativo del ácido protocatecuico (APC) por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	38
10. Análisis estadístico	38

<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	39
1. Curva de calibración del ácido protocatecuico (APC)	39
2. Cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en la flor de jamaica ( <i>H. sabdariffa</i> )	39
3. Potencial mutagénico del 1-NP sobre la cepa YG1024 de <i>S. typhimurium</i>	44
4. Efecto de los extractos (HSEc y HSAE) de <i>H. sabdariffa</i> en la cepa YG1024	46
5. Potencial antimutagénico de los extractos de <i>H. sabdariffa</i> contra la mutagenicidad inducida por 1-NP	48
5.1 Actividad antimutagénica de HSEc	48
5.2 Actividad antimutagénica de HSAE	51
5.3 Actividad antimutagénica de APC	55
6. Ensayo de microsuspensión con dos incubaciones (Mecanismos de acción)	58
6.1 Mecanismos de acción de los extractos de <i>H. sabdariffa</i> y el APC sobre la mutagenicidad inducida por el 1-NP	57
7. Análisis cualitativo del extracto HSAE por HPLC	64
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	67
<b>IX. PERSPECTIVAS</b>	68
<b>X. BIBLIOGRAFÍA</b>	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Planta y extractos de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	16
2. Biotransformación del 1-nitropireno (1-NP)	23
3. Curva de calibración del ácido protocatecuico (APC)	40
4. Curva dosis-respuesta del 1-NP en la cepa de prueba YG1024	44
5. Curva dosis-respuesta de la toxicidad de los extractos (HSEc y HSAE) de <i>H. sabdariffa</i>	46
6. Actividad antimutagénica del extracto hidroalcohólico (HSEc)	48
7. Actividad antimutagénica del extracto soluble en acetato de etilo (HSAE)	52
8. Actividad antimutagénica del ácido protocatecuico (APC)	55
9. Perfil cromatográfico del extracto HSAE	65

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página.
1. Mecanismos de acción de los antimutágenos	9
2. Clasificación taxonómica de la flor de jamaica	18
3. Diseño experimental para determinar la mutagenicidad del 1-NP y la antimutagenicidad de los extractos de <i>H. sabdariffa</i>	35
4. Diseño experimental para determinar el posible mecanismo de acción de los extractos de <i>H. sabdariffa</i>	37
5. Diseño experimental para estudiar el posible mecanismo de acción del APC	8

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Contenido de compuestos fenólicos presentes en los extractos de <i>H. sabdariffa</i>	41
2. Inhibición de la mutagenicidad del 1-NP en YG1024 por el extracto HSEc	49
3. Inhibición de la mutagenicidad del 1-NP en YG1024 por el extracto HSAE	53
4. Inhibición de la mutagenicidad del 1-NP en YG1024 por el APC	56
5. Inhibición de la mutagenicidad del 1-NP por HSEc en YG1024 (dos preincubaciones)	58
6. Inhibición de la mutagenicidad del 1-NP por HSAE en YG1024 (dos preincubaciones)	59
7. Inhibición de la mutagenicidad del 1-NP por APC en YG1024 (dos preincubaciones)	60

## RESUMEN

En la actualidad se sabe que algunos componentes de la dieta tienen la capacidad de proteger y prevenir al organismo contra diversas enfermedades crónicas degenerativas mediante diferentes formas de acción; a este grupo de compuestos se les ha denominado nutraceuticos. Se consideran como compuestos nutraceuticos a los productos fitoquimicos no nutritivos presentes en plantas, frutas y verduras que son comunes en la dieta. La flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es consumida en México como bebida refrescante, la cual, se asume, tiene un alto contenido de elementos fitoquimicos entre los que destacan los polifenoles. Por otro lado, se ha demostrado también que los compuestos fenolicos de diferentes plantas e infusiones poseen propiedades antimutagenicas y anticarcinogenicas. Dadas estas propiedades, se estudió el efecto que este tipo de compuestos pudieran tener sobre el 1-nitropireno (mutágeno directo) que se puede generar durante la preparación de los alimentos o proveniente de la contaminación ambiental. La extracción y cuantificación de los compuestos fenolicos de la flor de jamaica (*H. sabdariffa*), se realizó siguiendo el método propuesto por Tseng et al. (1996). Para el extracto hidroalcoholico (HSEc) y la fracción soluble en acetato de etilo (HSAE) el contenido fenolico resultó ser de  $420.98 \pm 50.40$  y  $152.42 \pm 29.10$  mg equivalentes de ácido protocatecuico (APC) respectivamente por cada 20 g de flor seca. En el presente trabajo se utilizó el ensayo de microsuspensión (modificación a la Prueba de Ames) para evaluar el potencial mutagenico del 1-nitropireno (1-NP); asimismo, para establecer el potencial antimutagenico y sugerir los posibles mecanismos de acción (dos preincubaciones) de los compuestos fenolicos presentes en los extractos de la flor de jamaica (HSEc y HSAE) y el APC utilizado como control positivo de antimutagenesis contra la mutagenicidad inducida por el 1-NP en la cepa de prueba YG1024 de *Salmonella typhimurium*. Los HSEc y HSAE (125, 250 y 500  $\mu\text{g}/\text{tubo}$ ) y el APC (25, 50 y 125  $\mu\text{g}/\text{tubo}$ ) no fueron ni mutagenicos ni tóxicos a las concentraciones evaluadas para la cepa YG1024. Se realizó una curva dosis-respuesta del 1-NP (2, 4, 6, 8, 10 y 16  $\text{ng}/\text{tubo}$ ) de la que se eligieron 2 y 8  $\text{ng}/\text{tubo}$  para los ensayos de antimutagenicidad. Los extractos inhibieron la mutagenicidad inducida por el 1-NP (4 y 8  $\text{ng}/\text{tubo}$ ) a las dosis seleccionadas en un 60 y 80% respectivamente, mientras que el APC inhibió la mutagenicidad en un 60%. Con la finalidad de conocer la posible interacción entre los extractos y el 1-NP, se llevó a cabo un ensayo de microsuspensión con dos microincubaciones. Los resultados sugieren que los posibles mecanismos de acción de los compuestos fenolicos presentes en los extractos de *H. sabdariffa* podrían ser explicados por la combinación de los efectos extracelulares (formación de un complejo que limita la biodisponibilidad del agente mutagenico) e intracelulares (quimioprotección y reparación). Para el HSEc, el efecto mayoritario fue a nivel extracelular (acomplejamiento), mientras que para HSAE y el APC el efecto de relevancia fue a nivel intracelular de quimioprotección.

**Palabras clave** Nutraceuticos, *Hibiscus sabdariffa* L., 1-nitropireno, Mutagenicidad, Antimutagenicidad, *Salmonella typhimurium*

## SUMMARY

Recent research has shown that frequent consumption of fruits, vegetables and herb, rich in phytochemicals lowered the risk of chronic degenerative diseases such as cancer. Many of these food components have been called nutraceuticals. Nutraceutical is defined as any substance that is in a plant, food or an extracted part of it that provides medicinal or health benefits. The dried flowers of *Hibiscus sabdariffa* L. are a popular plant in Mexico. They are used in cold and warm beverages. The calyces of Hibiscus, used in traditional medicine, and are found to phenolic compounds with marked physiological activities. Experimental studies have established that polyphenols show protection against the mutagenic/carcinogenic agents such as nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons (NPAH). 1-nitropyrene (1-NP) is the most abundant NPAH in organic solvent extracts of diesel soot and ambient air, therefore often used as a model compound in genetic toxicology. It's considered to contribute to the direct-acting mutagenicity. The dried flowers of *H. sabdariffa* were extracted with ethanol (HSEc) and further treated with chloroform and ethylacetate to obtain fraction HSAE, as described by Tseng *et al.* (1996). The amounts of polyphenol compounds from extracts of Hibiscus (HSEc and HSAE) were  $420.98 \pm 50.40$  and  $152.42 \pm 29.10$  expressed as mg of protocatechuic acid (PCA) equivalent respectively per 20 g of dry flowers. In the present study, the *Salmonella typhimurium* tester strain YG1024 was used in the microsuspension assay to examine the mutagenicity of 1-NP and the antimutagenic effect of extracts from *H. sabdariffa* (HSEc and HSAE) rich in phenolic compounds. PCA was used as an antimutagenicity positive control on 1-NP mutagenicity. Further, a two-stage incubation procedure was used to investigate phenolic compounds and 1-NP interaction. This involved washing to get bacterial cells free of the incubation mixture after the first incubation. The phenolics extracts (HSEc and HSAE) and PCA were not toxic to the bacteria at the concentrations tested (extracts: 125, 250 and 500  $\mu\text{g}/\text{plate}$ ; PCA alone 25, 50 and 125  $\mu\text{g}/\text{plate}$ ). Dose-response curve was obtained for 1-NP at 2, 4, 6, 8, 10 and 16  $\text{ng}/\text{plate}$ , this experiment allowed the selection of the doses of 4 and 8  $\text{ng}/\text{plate}$  for antimutagenicity assay. Extracts from *H. sabdariffa*. (HSEc and HSAE) inhibited the 1-NP (4 and 8  $\text{ng}/\text{tubo}$ ) mutagenicity by 60 and 80% respectively, whereas PCA inhibited the mutagenicity in a 60%. With the purpose to know the possible interaction between compounds of extracts and 1-NP, a double incubation assay was carried out. The results suggested that a possible mechanism of action of phenolic compounds of extracts may be due to both extracellular (formation of a complex that could limit the bioavailability of mutagen agent) and intracellular (chemopreventive and reparation) effect. The greatest inhibitory effect of HSEc was extracellular (formation of a chemical complex between compounds of extracts and 1-NP), whereas for HSAE and PCA, the major effect was intracellular (chemopreventive).

**KEY WORDS:** Nutraceuticals, *Hibiscus sabdariffa* L., 1-nitropyrene, Microsuspension, Mutagenicity, Antimutagenicity, *Salmonella typhimurium*

# I. INTRODUCCIÓN

Los alimentos son una mezcla compleja de componentes que pueden tener sustancias tanto con actividad mutagénica como antimutagénica, y ellas pueden provenir de cuatro fuentes principales: de origen natural, generados durante el procesamiento de los alimentos, adicionadas intencionalmente y accidentales (Ishidate *et al.*, 1991).

Estudios epidemiológicos y experimentales proveen de información referente al papel que desempeñan los alimentos en la iniciación, promoción y progresión de varios tipos de cáncer en humanos (Morse *et al.*, 1993). Por otra parte, los alimentos pueden contener sustancias con ciertas propiedades que directa o indirectamente, pueden reducir, proteger o eliminar la actividad mutagénica de otros compuestos (Kelloff *et al.*, 1994), a los que actualmente se les ha llamado alimentos funcionales o nutraceuticos, definidos a éstos como sustancias derivadas de los alimentos que otorgan beneficios medicinales y para la salud (Wild-Oats, 1998). Fan (1998), los define como alimentos o extractos de plantas que son seguros, no tóxicos y saludables, que pueden conferir cambios farmacológicos benéficos en el organismo. También se ha definido a los alimentos nutraceuticos como “alimento o ingrediente alimenticio que provee de beneficios medicinales o de salud, incluyendo la prevención y tratamiento de ciertas enfermedades” (Culhane, 1995; Fox, 1998). Las sustancias con propiedades antimutagénicas más estudiadas son los compuestos fenólicos presentes en los alimentos (Gary *et al.*, 1995).

Los compuestos fenólicos se caracterizan por presentar anillos aromáticos simples o polímeros con diversos grupos hidróxilo. También se les ha asociado con propiedades antinutricionales, características sensoriales y antioxidantes naturales, tanto en alimentos frescos como procesados (Ho, 1992).

Edenharder *et al.* (1996), han mostrado que el potencial antimutagénico de diferentes compuestos fenólicos contra nitroarenos representativos está relacionado con su estructura

Los nitroarenos son sistemas de anillos aromáticos que se forman por la combustión incompleta de material orgánico, principalmente la gasolina y se les encuentra distribuidos

en el ambiente (Dipple *et al.*, 1990). El 1-nitropireno y sus metabolitos de la nitrorreducción son compuestos con potente actividad mutagénica y carcinogénica (King y Lewtas, 1993). Se les puede encontrar contaminando el ambiente, agua y alimentos.

En México la flor de jamaica (*H. sabdariffa*) se cultiva en los Estados de Guerrero, Oaxaca, Michoacán, Colima y Puebla, siendo el primero el principal productor de esta planta (Escalante, 1997a). Extractos acuosos obtenidos la flor de *H. sabdariffa* se han empleado con fines medicinales, ya que poseen actividades anticolesterolémica, antihiperlipémica y antihipertriglicémica (Jonadet *et al.*, 1990). Esos extractos han sido además utilizados como quimioprotectores contra la promoción de tumores y ciertos tipos de cáncer. El ácido protocatecuico, compuesto fenólico presente en la flor de jamaica posee actividades antioxidantes y antigenotóxicas contra mutágenos conocidos como el benzo(a)pireno (Tseng *et al.*, 1998).

El estudio de actividades antimutagénicas y anticarcinogénicas de elementos nutracéuticos o quimioprotectores se realiza con los mismos bioensayos para la detección de compuestos mutagénicos y carcinogénicos. Dentro de estos ensayos, se tiene la prueba de Ames, que es sencilla, económica, de alta sensibilidad y a corto plazo.

Dadas las bondades que presentan los compuestos fenólicos en la flor de jamaica (*H. sabdariffa*), y, a que hasta el momento no se ha informado sobre su posible actividad antimutagénica *in vitro*, resulta interesante conocer dicho potencial contra el 1-nitropireno, así como su posible mecanismo de acción, utilizando el ensayo de microsuspensión (modificación a la prueba de Ames).

## **II. ANTECEDENTES**

### **1. ALIMENTOS NUTRACÉUTICOS**

#### **1.1 Definición de alimentos funcionales o nutraceuticos**

En la actualidad existe una tendencia muy marcada a consumir y promover los alimentos naturales, así como los beneficios sobre la salud que ello conlleva. Estos alimentos que producen un beneficio adicional sobre la salud son denominados alimentos nutraceuticos.

El término "alimento nutraceutico" es definido como "alimentos o sustancias derivadas de los alimentos, que proveen beneficios medicinales y para la salud (Wild-Oats, 1998). Fan (1998) los define como "alimentos o extractos de plantas que son seguros, no tóxicos y saludables, que causan un cambio farmacológico benéfico en el organismo". Aún más, los alimentos nutraceuticos pueden ser definidos como "alimento o ingrediente alimenticio que provee beneficios medicinales o de salud, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades" (Culhane, 1995; Fox, 1998).

Esta categoría de alimentos ha alcanzado proporciones gigantescas en los Estados Unidos de América, en Japón y en los países Europeos; tanto la industria de alimentos como la farmacéutica están interesados en desarrollar este mercado en forma innovadora (Culhane, 1995).

La definición de alimentos funcionales propuesta por Robertfroid (1996) postula que "un alimento es funcional si contiene un componente alimenticio (sea un nutriente o no) con efecto selectivo sobre una o varias funciones del organismo, cuyos efectos positivos justifican su papel fisiológico o incluso saludable

La Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos ha definido los alimentos funcionales como alimentos que "engloban productos potencialmente saludables" en los que se incluye "cualquier alimento o ingrediente alimenticio modificado que pueda

proporcionar un beneficio para la salud además de los nutrientes tradicionales que contiene" (Thomas *et al.*, 1994).

De acuerdo a su definición, los alimentos nutraceuticos incluyen una amplia variedad entre los que se encuentran: suplementos dietéticos, sustitutos del azúcar y de grasa, alimentos enriquecidos con fibra, hortalizas, carnes magras, dietas bajas en calorías, bebidas refrescantes (por ejemplo agua de jamaica entre otras), tés de diferentes plantas, etc. (Culchane, 1995). De acuerdo con Fox (1998) no se trata de concentrados vitamínicos o de minerales, sino de alimentos altamente especializados que contribuyen con los requerimientos esenciales del cuerpo.

## **1.2 Propiedades de los alimentos nutraceuticos**

En los últimos años se ha comprobado que existe una gran cantidad de componentes en los alimentos que presentan un potencial benéfico para la salud y cada vez existe mayor evidencia científica del papel que juegan esos componentes de los alimentos (denominados también como elementos fitoquímicos y/o promotores de la salud en la prevención y tratamiento de enfermedades crónico degenerativas, como: el cáncer y cardiovasculares (De Flora *et al.* 1993; Guzmán-Maldonado y Paredes-López, 1998).

Guzmán-Maldonado y Paredes-López (1998) recientemente realizaron una revisión sobre propiedades que presentan algunas plantas indígenas de América Latina. Los autores señalan que para los Aztecas y los Incas, el amaranto y la quinoa jugaban un papel medicinal y algunas veces mágico. La ciencia moderna ha demostrado que estas dos semillas presentan un potencial medicinal gracias a su composición proteica y lipídica, así como su contenido en fibra, elementos fitoquímicos y compuestos menores (vitaminas y minerales entre otros). De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada por los autores citados, la composición en ácidos grasos de la quinoa sugiere que puede tener aplicaciones nutraceuticos, en tratamientos del sistema inmune, inflamación y cicatrización. Asimismo, la composición en minerales de estas semillas puede ayudar a prevenir problemas de osteoporosis, hipertensión y cáncer de colon. Los autores también mencionan los efectos

benéficos que presentan diferentes constituyentes menores de estas semillas, tales como pigmentos y compuestos fenólicos.

En el mismo documento, Guzmán-Maldonado y Paredes-Lopez (1998) revisaron algunas propiedades nutraceuticas del frijol común, de algunas frutas como el limón, guayaba, piña y capulín, que se han considerado como excelentes fuentes de azúcar y vitaminas, así como los componentes bioactivos de algunas verduras como la calabaza, el chile, aguacate y tomate. También mencionan que algunas hierbas y plantas como el nopal, el epazote, la árnica, la gobernadora, el cardo santo, el cabello de elote, aloe y cempasúchil, poseen dichas sustancias con propiedades nutraceuticas. A todos estos materiales se les ha reconocido por tener ciertos efectos biológicos y son usados en problemas relacionados con el mal de estómago, como analgésicos, en úlceras, problemas urinarios, fiebre, diabetes, laxante, cálculos renales, estimulantes y antiinflamatorios.

Los taninos son un grupo de compuestos fenólicos que se encuentran comúnmente en los alimentos de origen vegetal y recientemente han recibido atención por la comunidad científica, particularmente porque algunos compuestos presentan características con actividades anticancerígenas. Sin embargo, estos compuestos también presentan otras propiedades como actividad antinutricional, carcinogénesis, antimutagénesis y actividad antimicrobiana y existe una gran divergencia entre los investigadores sobre sus efectos benéficos, los cuales son dependientes de la dosis (Weisburger *et al.*, 1996; Chung y Wei, 1997; Franke, 1997).

Por otro lado, han sido incorporados a los alimentos ingredientes con conocido efecto anticancerígeno como carotenoides, flavonoides, antioxidantes naturales de frutas y hortalizas o como extractos concentrados de éstos últimos (Zammer, 1995). Asimismo, se han elaborado alimentos como las bebidas refrescantes de materias primas que contienen en forma natural componentes del tipo nutraceutico, tales como las flores de jamaica (*H. sabdariffa*), las cuales son ricas en elementos fitoquímicos entre los que destacan. antocianinas, flavonoides, compuestos fenólicos simples y esteroides. Estos últimos compuestos son considerados como seguros por su inocuidad en los humanos. Se les reconoce como sustancias biológicamente activas y se considera que pueden jugar un papel importante como antioxidantes naturales, pues pueden prevenir el daño oxidativo causado

por los radicales libres de oxígeno activo en los sistemas vivos. Se sabe también que las antocianinas pueden inhibir la peroxidación de los lípidos de las lipoproteínas de baja densidad (Lee *et al.*, 1997).

De acuerdo con Pszczola (1998) los ingredientes más empleados y propuestos para este año por la industria en la "1998 IFT Food Expo" son los ingredientes naturales con propiedades antioxidantes. Entre ellos se encuentran: componentes de la soya, vitaminas saborizantes y aromatizantes de humo, fracciones de aceites de cereales, miel de frambuesa, cereza, mostaza, polifenoles del té verde y negro, productos del tomate, jugos ricos en  $\beta$ -caroteno y compuestos fenólicos, entre otros, muchos de los cuales presentan propiedades nutracéuticas.

### **1.3 Mecanismo de acción**

Los ahora llamados elementos nutracéuticos se les conocía anteriormente como quimioprotectores, sustancias que disminuyen o inhiben los efectos genotóxicos provocados por agentes mutagénicos. A estas sustancias se les ha denominado antimutágenos y representan a una gran variedad de compuestos químicos como son polifenoles (flavonoides, flavonoles, fenoles simples, taninos), tocoferoles, ácidos grasos (ácidos grasos esenciales), tioles micronutrientes (minerales y vitaminas), algunos tipos de proteínas (inhibidores de proteasas, lectinas entre otras) abundantes en el reino vegetal y que aún no se ha determinado su caracterización bioquímica y biológica como agentes antimutagénicos.

El mecanismo de acción de los antimutágenos es bastante complejo, y su efectividad depende de muchos factores y condiciones, pudiendo ser el resultado de un simple evento o la acción simultánea de varios factores. Stavric (1994) clasificó a los antimutágenos según su mecanismo de acción en: dos categorías y establece que la actividad antimutagénica generalmente es la combinación de dos o más formas de actuar ya sea a nivel extra o intracelular (Cuadro 1).

## Cuadro 1. MECANISMOS DE ACCIÓN DE ANTIMUTÁGENOS

---

### 1. MECANISMO EXTRACELULAR

#### A. Durante la preparación de los alimentos

- Reduciendo (inhibiendo) la formación de M/C\*

#### B. Efecto en el intestino

- Formación de complejos no M/C
- Reducción en la biodisponibilidad
- Dilución con fibra dietaria
- Incremento en la adsorción de otros componentes alimentarios
- Aceleración del tránsito intestinal
- Protección de la barrera de la mucosa
- Modificación de la microflora
- Inhibición de la penetración de los M/C a las células

### 2. MECANISMO INTRACELULAR

- Incremento de las actividades enzimáticas involucradas en la desintoxicación de M/C
- Inhibición de las actividades enzimáticas involucradas en la formación de los metabolitos de M/C
- Atrapamiento de especies oxigenadas activas
- Inhibición de la activación metabólica
- Protección de los sitios nucleofílicos del ADN
- Inhibición del efecto deletéreo de procarcinógenos sobre el ADN

---

\*M = Mutágeno, C = Carcinógeno  
(Stavric, 1994).

Por otro lado, Ayrton *et al.* (1992) informaron que el ácido elálgico podría ejercer su actividad antimutagénica y anticarcinogénica a través de uno o más mecanismos entre los que están: inhibición de las enzimas responsables de la activación del carcinógeno, estimulando enzimas involucradas en la detoxificación; interacción entre el fenol con los intermediarios reactivos, inhibiendo así la formación de aductos; interacción de ácido elálgico con el ADN, disminuyendo con ello el número de sitios disponibles de interacción con los mutágenos.

Kudora y Hara (1999) informaron que la inhibición de la mutagenicidad y carcinogenicidad de los polifenoles presentes en extractos de té, cuyos estudios fueron realizados *in vitro* e *in vivo*, sugieren que los compuestos fenólicos podrían ejercer su acción a través de diferentes mecanismos intra y extracelulares, incluyendo la modulación del metabolismo enzimático, bloqueando o suprimiendo la interacción de los agentes mutagénicos, modulando la replicación y efectos de reparación del ADN; así como la promoción e invasión por metástasis e inducción de nuevos mecanismos.

Por otro lado, la cantidad de quimioprotectores o sustancias nutracéuticas en las diferentes categorías de alimentos puede variar considerablemente, aún cuando se trate del mismo tipo de alimento (Stavric, 1994).

## 2. COMPUESTOS FENÓLICOS EN ALIMENTOS

### 2.1 Generalidades

Los compuestos fenólicos son ubicuos en plantas comestibles y una cantidad considerable de ellos es consumida diariamente (1 g) por el humano (Ho, 1992). A los más comunes en alimentos se les puede clasificar en tres grandes grupos:

- A. Fenoles simples y ácidos fenólicos
- B. Derivados ácidos-hidroxicinámicos
- C. Flavonoides

El grupo más importante de compuestos fenólicos presentes en los alimentos son los flavonoides (como las catequinas, las proantocianinas, las antocianinas), flavonas, flavonoles y sus glucósidos. El flavonol biológicamente más activo y presente en la dieta es la quercetina. Se ha observado que los polifenoles juegan un papel dual en la carcinogénesis: reduciendo la biodisponibilidad del posible(s) carcinógeno(s), o bien interfiriendo con su biotransformación en el hígado (Ho, 1992; Leighton, 1992; Stavic, 1994).

A los compuestos fenólicos también se les ha asociado con cualidades antinutricionales y características sensoriales (como el color, el sabor, el aroma y la textura) tanto en alimentos frescos como en procesados. (Ho, 1992).

Algunos compuestos fenólicos han sido reconocidos como antioxidantes naturales. Los antioxidantes naturales de mayor importancia y comercialmente explotados son los tocoferoles, los que presentan la habilidad de inhibir la peroxidación lipídica *in vivo*, atrapando los radicales peróxilo, y que algunas veces retardan la oxidación lipídica inhibiendo la actividad lipooxigenasa (Ho, 1992).

## 2.2 Propiedades biológicas de los compuestos fenólicos

Huang y Ferraro (1992) informaron que la mayoría de los compuestos fenólicos presentes en los alimentos son los flavonoides provenientes de plantas. La mayoría de ellos poseen propiedades biológicas y químicas comunes, entre las que se puede citar:

- Actividad antioxidante
- Habilidad de captar especies oxigenadas activas
- Habilidad de captar especies electrofílicas
- Habilidad de inhibir nitrosación
- Habilidad de quelar metales
- Potencial de autooxidación, produciendo peróxido de hidrógeno en presencia de ciertos metales
- Capacidad de modular ciertas actividades enzimáticas

Se han realizado una serie de investigaciones donde proponen a los compuestos fenólicos como agentes antimutagénicos. Ferguson (1994) muestra que el ácido elágico (flavonoide) inhibe la genotoxicidad de una gran variedad de carcinógenos, compuestos N-nitrosos, aminas aromáticas y algunas micotoxinas.

En recientes investigaciones se ha demostrado que las bebidas como el té son ricas en flavonoides, particularmente catequinas y flavonoles, los cuales tienen la capacidad de atrapar radicales libres y especies de oxígeno reactivas (Graham, 1992; Salah *et al.*, 1995). Efectivamente los flavonoides estabilizan los electrones libres a través de varios mecanismos, incluyendo delocalización de electrones, formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares (van Acker *et al.*, 1996) y rearreglo de otras estructuras moleculares (Morel *et al.*, 1993, Miller *et al.*, 1996).

Hertog *et al.* (1993) y Blot *et al.* (1996), investigadores que muestran gran interés en los compuestos fenólicos, específicamente los flavonoides, establecen por diversos estudios epidemiológicos que existe una relación inversa entre el consumo de alimentos ricos en

flavonoides y el bajo riesgo de enfermedades crónicas degenerativas tales como padecimientos cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer. Las actividades antioxidantes de los flavonoides pueden ser benéficas sobre la salud. La ingesta de bebidas como el té contribuyen de una forma mayoritaria en la dieta el contenido de flavonoides totales por día, con potencialidades antioxidantes de mayor interés (Wiseman *et al.*, 1997). Estos autores mencionan también que una típica tasa de té contiene aproximadamente 600 mg de sólidos totales y 200 mg de flavonoides.

Por otro lado, cabe mencionar que a un grupo de los compuestos fenólicos también se les atribuyen propiedades antinutritivas. Los taninos pertenecen a este grupo y se encuentran principalmente en alimentos de origen vegetal (Chung y Wei, 1997), son solubles en agua con un peso molecular de 300-500 Da que enlazan proteínas para formar complejos solubles e insolubles (Hagerman *et al.*, 1992; Savelkouly *et al.*, 1992). Los taninos en la dieta de algunos mamíferos disminuyen la digestibilidad de la materia seca y proteínas.

De acuerdo a su estructura química los taninos se clasifican en: condensados (proantocianidinas) que son polímeros de antocianidinas e hidrolizables, a este grupo pertenecen el ácido gálico, el ácido hexahidroxidifénico, los ésteres de la glucosa y otros polioles (Hagerman *et al.*, 1992). Los taninos condensados son los más comunes en las plantas, se localizan principalmente en las cubiertas de los cereales y las leguminosas (Savelkoul *et al.*, 1992). El frijol común se encuentra entre las especies ricas en taninos y son más abundantes en las semillas de color oscuro. El remojo y la cocción extraen una gran proporción de los taninos presentes en la semilla reduciendo su efecto (Valle, 1991)

En un revisión realizada por Wiseman (1999) argumenta que los factores biodisponibles no nutritivos de las plantas son los flavonoides y los estrógenos, los cuales, tienen diversos efectos protectores contra enfermedades del corazón y diferentes tipos de cáncer. Los posibles mecanismos de acción de estos compuestos antinutritivos podrían ser explicados por sus potenciales antioxidantes *in vivo* e *in vitro*, y por la protección contra el daño oxidativo de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) implicadas en la aterogénesis.

Aun que existe evidencia que los compuestos fenólicos tienen efectos antinutricios de gran importancias, por ejemplo, en la inhibición de las enzimas que catabolizan las proteínas en el intestino, en la formación de complejos con los micronutrientes, desestabilización de vitaminas, los cuales tienen efectos secundarios en la nutrición y en la salud de las personas. Las actividades biológicas de los compuestos fenólicos también son de gran interés en las recientes investigaciones por presentar: propiedades antioxidantes, agentes quelantes, atrapadores de radicales libres, inhibidores de la lipoperoxidación, como agentes antivirales, inhibidores de la transcriptasa reversa del VIH, moduladores de enzimas que intervienen la mutagénesis y carcinogénesis entre otras. (Carmona, 1996; Hollman y Katan, 1997; Bravo, 1998; Croft, 1998; Arora *et al.*, 1999; Matthee *et al.*, 1999).

En resumen, las actividades biológicas de los compuestos fenólicos son bien conocidas, siendo quizás, la de mayor importancia, sus efectos inhibitorios sobre la mutagénesis y carcinogénesis (Ho, 1992).

### 3. LA FLOR DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)

#### 3.1 Origen

La jamaica es una planta de origen africano que se cultiva en las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. En América la introdujeron los esclavos provenientes de África hace varios siglos, y su cultivo no se ha extendido mucho (León, 1968). A pesar de ello, en México el extracto acuoso de la flor de jamaica se usa con fines medicinales contra algunos padecimientos estomacales y en ocasiones como simple bebida refrescante (Duke, 1983; Morton, 1987).

En México, el Estado de Guerrero es el principal productor de esta planta, además de Oaxaca, Michoacán, Colima y Puebla. Los municipios de Ayutla, Tecoaapa y Juan R. Escudero constituyen la zona jamaquera del Estado de Guerrero, contribuyen con el 92% de la producción nacional (Escalante, 1997a).

#### 3.2 Morfología general

*H. sabdariffa* (Malvaceae), es un arbusto hasta de 3 m de altura; las hojas miden 15 cm, en forma de mano. Las flores están en la unión del tallo y las hojas. La parte donde nacen los pétalos en forma de copa es de color rojo brillante y los pétalos son amarillos con una mancha roja oscura. Los frutos son una cápsula de 2 cm de largo y peludita (León, 1968).

En la Figura 1, se muestra la planta de *H. sabdariffa*. Su morfología es la siguiente: el tallo y las ramas son rojos, flexibles y lisos, la corteza que es rojiza y manualmente desprendible, al hacerlo se pueden ver las fibras blancas que constituyen al tallo y ramas, las cuales en algunos países las usan como sustituto del yute. Las hojas tienen diversas formas según su madurez, al iniciar su formación son ovaladas, las jóvenes son trilobuladas o tetralobuladas y las maduras son pentalobuladas, sus nervaduras principales y secundarias son rojas. Los primordios florales que son axilares, desarrollan una flor por hoja madura.



Figura 1. Planta y extractos de la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Las ramas se cargan de flores de la parte media hacia la punta, que son las partes más rojas y expuestas al sol, las flores son de corola gamopétala, amarilla con centro rojo, el cáliz y epicáliz son de color rojo y gamosépalos, el primero es pequeño, de consistencia un poco dura cuyos pétalos terminan en punta aguda, el epicáliz se desarrolla de mayor tamaño cubriendo al fruto en una sola pieza, al terminar de madurar es muy turgente, con sabor ácido. El fruto es seco, coriáceo y dehiscente con cinco lóbulos. Las semillas son reniformes y muy pequeñas, con aproximadamente 15 semillas por lóbulo (Duke, 1983; Morton, 1987; Escalante, 1997b).

### **3.3 Clasificación taxonómica**

La clasificación taxonómica de la variedad de jamaica se muestra en el Cuadro 2.

### **3.4 Composición química de las partes constituyentes de la planta de jamaica (*H. sabdariffa*)**

Tanto de las hojas como de los frutos y las semillas de la jamaica (*H. sabdariffa*) se ha obtenido un aceite esencial, con un componente monoterpénico común, el acetato de  $\alpha$ -terpenilo, así como otros monoterpenos: car-3-ene (aceites de hoja y semilla) y el 3-metil-butan-1-ol (hojas y frutos). En el aceite esencial de las hojas, se han detectado además los compuestos fenólicos anisaldehído y alcohol benzílico. Las flores contienen los flavonoides crisantemina, cianidina-3-sambibiósido, gosipetina, hibiscina, malvina, mirtiyina y sabdaretina, el compuesto fenólico ácido protocatecuico, y el esteroide  $\beta$ -sitosterol. Los frutos contienen los flavonoides gosipetina, quercetina, el compuesto fenólico simple ácido gálico y el esteroide  $\beta$ -sitosterol. Compuestos similares se han detectado en las hojas, y en el aceite obtenido de la semilla se han identificado los esteroides campesterol, colesterol, ergosterol,  $\alpha$ -espinasterol, estigmasterol (Duke, 1983; Morton, 1987; Argueta *et al.*, 1994).

**Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *Hibiscus sabdariffa* L.**

Reino:	Vegetal
División:	Antophyta
Subdivisión:	Angiosperma
Clase:	Dicotiledónea
Orden:	Malvales
Familia:	Malváceae
Subtribu:	Hibisceae
Género:	<i>Hibiscus</i>
Especie:	<i>sabdariffa</i>
Variedad	Linn

(Escalante, 1997b).

### 3.5 Usos y aplicaciones de los extractos de flor de jamaica

Se ha mostrado que extractos acuosos obtenidos de la flor de *H. sabdariffa* presenta actividad espasmolítica en músculo del diafragma y útero de rata, de recto abdominus de rana, cadena traqueal de cuyo y en aorta de conejo. El mismo extracto inhibió la movilidad intestinal en rata y perro. Contrario a esto, se detectó actividad espasmogénica en músculo del recto abdominus de rana y de útero e ileon de conejo. Con el mismo tipo de extractos, se observó una fuerte actividad diurética y uricosúrica en rata por vía nasogástrica, e hipotensora en rata, gato y perro; en los últimos dos la administración fue intravenosa (Ali *et al.*, 1991; Argueta *et al.*, 1994; Kirdpon *et al.*, 1994).

Las actividades antihipocolesterolemica, antihiperlipémica y antihipertrigliceridémica del cáliz de *H. sabdariffa* fueron demostradas en ratas cuando en su dieta se adicionó el cáliz en un 5% (Jonadet *et al.*, 1990). El extracto acuoso de este órgano también presentó una acción estrogénica en rata (inmadura) vía intraperitoneal a la dosis de 500 mg/kg. Un extracto etanólico de las flores fue citotóxico al ser probado en células de carcinoma de Ehrlich. El mismo extracto acuoso de las flores presentó una acción antiviral sobre los virus Herpes tipo 2, los de la viruela, la influenza A2 y el polivirus II (Argueta *et al.*, 1994). En el hombre, el extracto acuoso de las flores provocó efectos colerético, diurético y laxante, al ingerirse por vía oral, y la decocción del fruto tuvo una acción antiinflamatoria e inmunomodulador (Müller *et al.*, 1992; Argueta *et al.*, 1994).

Los estudios realizados por Tseng *et al.* (1998) muestran que el ácido protocatecuico (APC) extraído de flores secas de *H. sabdariffa* posee actividad quimioprotectora contra la promoción de tumores y cáncer; estas pruebas fueron evaluadas en piel de ratones hembra CD-1. Otras investigaciones realizadas por estos mismos autores en 1997 y en 1996 muestran que extractos de Hibiscus ricos en APC tienen efectos protectores contra la citotoxicidad y genotoxicidad en cultivos primarios de hepatocitos de rata inducidos por terbutilhidroperóxido (t-BHP) y sugieren que uno de los posibles mecanismos del efecto protector podría estar asociado con su propiedad de atrapamiento de radicales libres.

## 4. HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS NITRADOS

### 4.1 Generalidades

Entre los mutágenos y carcinógenos más potentes, se encuentran los nitroarenos, que se generan por la reacción de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) con óxidos de nitrógeno ( $\text{NO}_x$ ) en la combustión incompleta de materiales orgánicos (IARC, 1989). Estos compuestos se encuentran muy difundidos en el medio ambiente, por lo que se les puede considerar causa importante de algunos cánceres en humano (Heachg y El-Bayoumy, 1990; Möller *et al.*, 1993; El-Bayoumy *et al.*, 1999). Una consecuencia de este hecho es que gran parte de la investigación de la acción de los carcinógenos se ha centrado en torno a los HPA.

Algunos de los hidrocarburos policíclicos aromáticos nitrados (HPAN) son directamente emitidos a la atmósfera por la combustión incompleta de los derivados del petróleo. Los extractos provenientes de partículas del diesel y la gasolina, al ser evaluados en la Prueba de Ames, son potencialmente mutagénicos (Horikawa *et al.*, 1991). Se han desarrollado nuevos estudios para detectar los compuestos presentes en muestras ambientales y encontrar alternativas para disminuir el riesgo en poblaciones susceptiblemente expuestas. Asimismo, se han enfatizado diversas investigaciones en el análisis de otros agentes altamente mutagénicos que pueden derivarse del metabolismo del 1-nitropireno (Howard y Beland, 1999).

En los últimos años, se ha encontrado un número cada vez mayor de compuestos carcinógenos. De hecho, se ha sugerido que el cáncer es primordialmente una enfermedad no curable, causada por diferentes agentes, productos de la contaminación ambiental y que la dieta juega un papel importante en su desarrollo y/o prevención (Edenharder *et al.*, 1996).

#### 4.2 Origen e incidencia de los poliaromáticos nitrados

Los HPAN se encuentran principalmente en el aire, como subproductos de la combustión incompleta del diesel y la gasolina, en residuos incinerados de plantas tratadoras de agua, en sedimentos de origen industrial, humo de cigarro y toners de fotocopiadoras, así como en algunos alimentos de origen vegetal contaminados y en carnes asadas al carbón entre otros (Gibson, 1982; Rosenkranz *et al.*, 1980; Tokiwa *et al.*, 1985; Kinouchi *et al.*, 1986).

La combustión incompleta del diesel y algunos derivados del petróleo son las principales fuentes de HPAN en el medio ambiente. Más de 50 tipos diferentes de HPAN han sido identificados en muestras de partículas de la combustión incompleta del diesel. La sustancia de mayor abundancia en este tipo de muestras es el 1-nitropireno, aunque también se han encontrado algunos otros nitroderivados entre los que destacan el 3-nitrofluorantreno, 8-nitrofluorantreno, entre otros. Diversos investigadores se han enfocado en estudios de los mecanismos de formación a nivel atmosférico de los HPAN, su mutagenicidad y carcinogenicidad, así como el posible mecanismo de acción por el cual ejercen su efecto (IARC, 1989; El Bayoumy *et al.*, 1999).

#### 4.3 Efecto tóxico

Cuando los HPAN son analizados mediante la prueba de Ames, la mayoría ocasionan mutagenicidad a las cepas de prueba, sin necesidad de una previa activación metabólica. El 1-nitropireno y sus metabolitos 1,3-dinitropireno, 1,6-dinitropireno y el 1,8-dinitropireno son potentes agentes mutágenos en las pruebas con *S. typhimurium* y otros sistemas *in vitro*. La actividad biológica del 1-nitropireno ha sido demostrada como un agente mutagénico y/o carcinogénico. Se ha informado que su actividad mutagénica se debe a que se enlaza covalentemente con el ADN tanto *in vitro* como *in vivo* en presencia de la activación enzimática (Mather *et al.*, 1999; Stacey, 1999).

Los efectos tóxicos de los compuestos nitrados son atribuidos a la formación de radicales libres como resultado de la activación enzimática (Rosser *et al.*, 1996). La mutagenicidad de HPAN se ha demostrado que depende sobre todo de su reducción a sus correspondientes hidroxilaminoarenos seguido por la O-esterificación y formación de iones arilnitronio, los cuales reaccionan con el carbono ocho (C-8) de la guanina en el ADN para formar el aducto desoxiguanosinonitro-HAP (Smith *et al.*, 1995; Rosser *et al.*, 1996). En la Figura 2, se muestra la biotransformación del 1-NP y cuyo estudio se realizó empleando radioactividad [<sup>32</sup>P] (Gallagher *et al.*, 1990; Randerath *et al.*, 1995; El-Bayoumy *et al.*, 1999).

Los HPAN pueden entrar al cuerpo por inhalación, absorción a través de la piel o por el tracto gastrointestinal y son probablemente reducidos por las enzimas nitro-reductasas, cuyos metabolitos se enlazan en forma de metahemoglobina como derivados nitrosos, y N-hidroxilaminas (El-Bayoumy *et al.*, 1999). Sin embargo, estos intermediarios son además reducidos a los correspondientes compuestos aminas aromáticas, los cuales son excretados en la orina en forma libre o después de la acetilación (Rosser *et al.*, 1996).

Por otro lado, se han realizado investigaciones sobre la posible modulación de la carcinogenicidad y mutagenicidad de los nitroarenos por compuestos fenólicos (cumarinas, ácido elágico, quinonas, flavonoides, antocianinas, etc.), micronutrientes, carotenoides especialmente extraídos de semillas, frutos y vegetales comunes en la dieta y que tienen efectos antimutagénicos y anticarcinogénicos (Edenharder *et al.*, 1997; Loarca-Piña *et al.*, 1998; González de Mejía *et al.*, 1999).

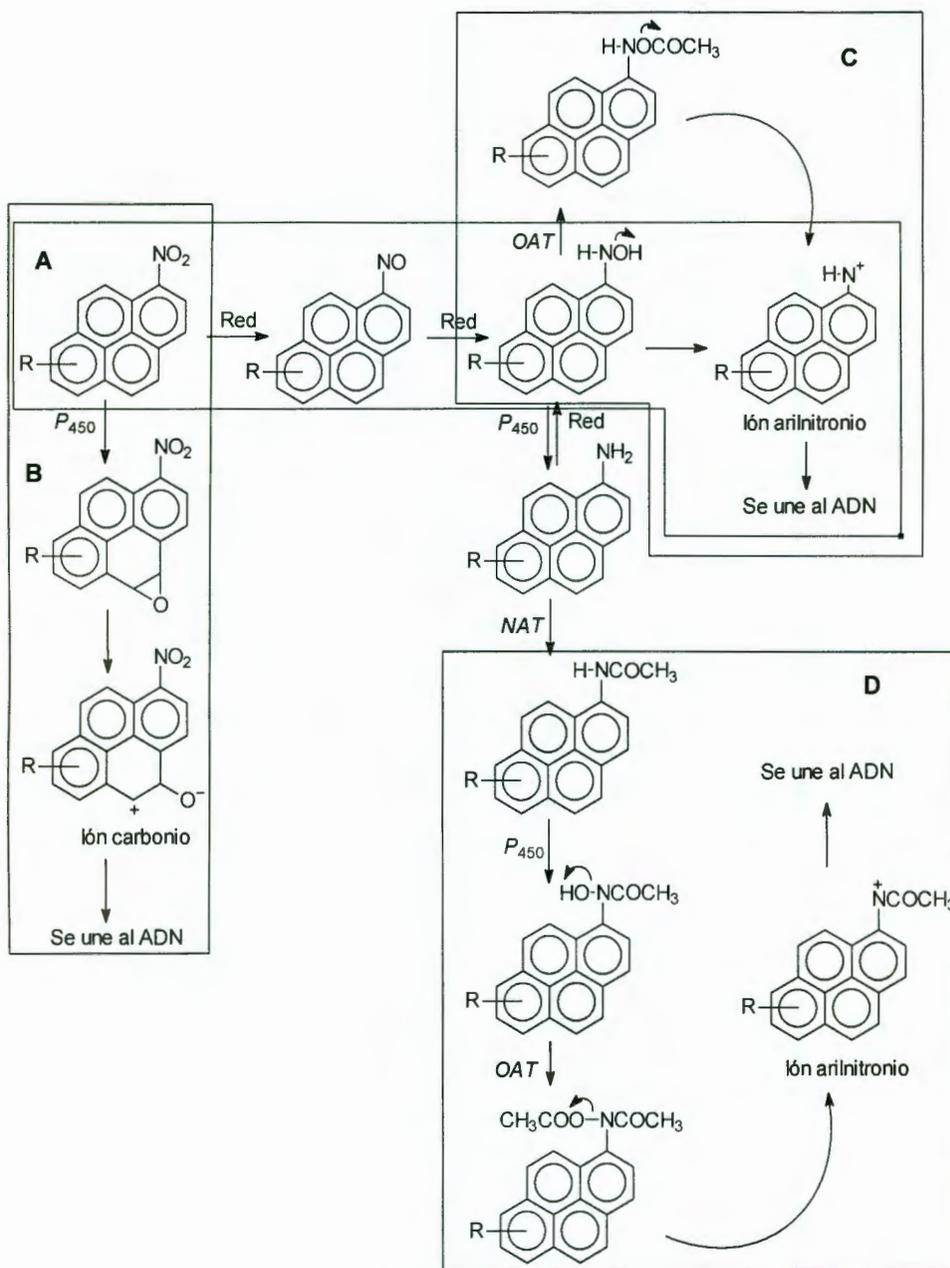


Figura 2. Biotransformación del 1-nitropireno (1-NP). Pasos propuestos para la activación del 1-NP y sus metabolitos. Los cuadros representan las posibles rutas. A. activación por simple nitrorreducción; B. activación por epoxidación; C. potenciación de la genotoxicidad de un intermediario hidroxilamina por O-acetilación; D. activación de una arilacetamida. Las enzimas son indicadas por letras itálicas: *Red*, nitroreductasa;  $P_{450}$ , citocromo P450; *NAT*, N-acetiltransferasas; *OAT*, O-acetiltransferas. R = H en 1-nitropireno o OH en metabolitos fenólicos.

## 5. ENSAYO DE MUTAGENICIDAD Y ANTIMUTAGENICIDAD

Las pruebas de genotoxicidad a corto plazo, son una herramienta útil en el conocimiento de los mecanismos de acción de compuestos tóxicos, en la detección de compuestos xenobióticos en el medio ambiente, alimentos, en muestras biológicas y tejidos tanto de humanos como de animales.

Una de las pruebas de genotoxicidad a corto plazo más utilizada es la de Ames, prueba que utiliza a la *S. typhimurium* como organismo detector. La versión de la prueba de Ames más utilizada en el escrutinio de sustancias con actividad mutagénica o antimutagénica es el método de incorporación en placa, que consiste en combinar la cepa de prueba (*S. typhimurium*), la fracción microsomal S9 o la mezcla de cofactores y el agente químico (con potencial mutagénico o antimutagénico). Por medio de esta prueba se han estudiado más de 300 agentes químicos, muchos de ellos descritos como mutágenos y carcinógenos. Este ensayo es relativamente de fácil manejo, bajo costo y rápido (Shelef y Chin, 1980; Maron y Ames, 1983; San y Chan, 1987; Bala y Grover 1989; Francis *et al.*, 1989; Grimmer *et al.*, 1992).

Por otro lado, el método de microsuspensión descrito por Kado *et al.* (1983 y 1986) el cual es una modificación a la prueba de Ames, tiene ventajas sobre el de incorporación en placa en cuanto a la sensibilidad (10 veces mayor). La modificación consiste en incrementar la concentración de células bacterianas de  $1 \times 10^9$  a  $1 \times 10^{10}$  bacterias/ml, y la adición de éstas a la fracción S9 o mezcla de cofactores, evitando con ello la posible difusión, o dilución del mutágeno o sus metabolitos, o del agente antimutagénico como sucede en el ensayo de incorporación en placa. Además, la mayor concentración de bacterias incrementa el número de blancos disponibles para interactuar con los mutágenos o antimutágenos; así como el transporte de intermediarios reactivos hacia la bacteria.

La cepa de prueba YG1024 de *S. typhimurium* fue desarrollada a partir de la TA98 y se caracteriza por presentar un alto nivel de actividad N-hidroxilamina O-acetil transferasa, enzima que juega un papel importante en la activación mutagénica de nitroarenos y

arilaminas, lo cual le confiere la capacidad de ser altamente sensible a las acciones mutagénicas de N-hidroxiarilaminas derivadas de aminas aromáticas y nitroarenos (Ames *et al.*, 1975; Watanabe *et al.*, 1990; Einistö *et al.*, 1991).

En el presente trabajo se utilizó el ensayo de microsuspensión para estudiar el posible potencial antimutagénico de algunos compuestos fenólicos presentes en extractos de la flor de jamaica (*H. sabdariffa*) contra la mutagenicidad inducida por 1-nitropireno (1-NP) así como su posible mecanismo de acción.

### III. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existe una tendencia muy marcada a consumir y promover los alimentos naturales, por los efectos benéficos que ello conlleva. Estos alimentos por producir un beneficio adicional sobre la salud son denominados nutraceuticos. También se ha definido como nutraceuticos a extractos de plantas (grupo de compuestos fitoquímicos heterogéneos) que son inocuos, no tóxicos y saludables, que poseen la capacidad de causar cambios farmacológicos en el organismo y en la salud, incluyendo la prevención, tratamiento de enfermedades crónico degenerativas como algunos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares.

En la dieta humana, particularmente la mexicana, existen muchos alimentos de origen vegetal que contienen grandes cantidades de elementos fitoquímicos. Sin embargo, no se ha realizado aun su caracterización bioquímica y los estudios de sus efectos biológicos, como es el caso de la flor de jamaica consumida en forma de bebidas refrescantes, maceraciones e infusiones y en la elaboración de extractos hidroalcohólicos; por ello, se propuso evaluar el efecto antimutagénico *in vitro* de los compuestos fenólicos presentes en la flor de jamaica (*H. sabdariffa*) contra la mutagenicidad inducida por el 1-nitropireno mediante el ensayo de microsuspensión.

Esta investigación pretende abrir nuevas oportunidades de estudio con respecto a los efectos biológicos de los compuestos fenólicos presentes en las plantas que permitan aclarar mejor los procesos de mutagenicidad y su inhibición, así como el papel que ejercen en su modulación.

## IV. HIPÓTESIS

Los compuestos fenólicos presentes en la flor de jamaica (*H. sabdariffa*) poseen actividad antimutagénica contra el 1-nitropireno.

## V. OBJETIVOS

### 1. Objetivo general

Determinar la actividad antimutagénica y el posible mecanismo de acción de los compuestos fenólicos presentes en la flor de jamaica (*H. sabdariffa*) contra la mutagenicidad inducida por el 1-nitropireno mediante el ensayo de microsuspensión.

### 2. Objetivos específicos

- 2.1 Extraer y cuantificar los compuestos fenólicos presentes en flor de jamaica (*H. sabdariffa*)
- 2.2 Determinar el potencial mutagénico del 1-nitropireno en el ensayo de microsuspensión usando la cepa YG1024 de *S. typhimurium*
- 2.3 Establecer el potencial antimutagénico de los compuestos fenólicos presentes en la flor de jamaica (*H. sabdariffa*) contra la mutagenicidad inducida por el 1-nitropireno mediante el ensayo de microsuspensión.
- 2.4 Sugerir el posible mecanismo de acción de los compuestos fenólicos sobre la actividad mutagénica del 1-nitropireno.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Material

#### 1. Compuestos Químicos

Dimetilsulfóxido, 1-nitropireno, ácido protocatecuico se obtuvieron en SIGMA Chemical & Co. y en Aldrich Chemical & Co. Los reactivos químicos necesarios para el bioensayo de microsuspensión y para la extracción de los compuestos fenólicos fueron adquiridos en J. T. Baker. El caldo y el agar nutritivo No. 2 se compraron en Oxoid Ltd., Hants, England.

#### 2. Material Biológico

Cepa YG1024 de *S. typhimurium*: fue proporcionada por el Dr. Javier Espinosa Aguirre del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Las flores de jamaica (*H. sabdariffa*) fueron adquiridas en el Mercado de Abastos de la ciudad de Querétaro y provienen del Estado de Guerrero de la cosecha de 1998.

La cepa YG1024 de *S. typhimurium*, se caracteriza por presentar mayor sensibilidad en la detección de aminas aromáticas mutagénicas y nitroarenos ambientales como el 1-nitropireno (1-NP). Esta cepa fue desarrollada a partir de la TA98 de *S. typhimurium* y tiene un alto nivel de actividad N-hidroxiarilamina O-acetiltransferasa, enzima que juega un papel importante en la activación mutagénica de nitroarenos y arilaminas, lo cual le confiere la capacidad de ser altamente sensible a las acciones mutagénicas de N-hidroxiarilaminas derivadas de aminas aromáticas y nitroarenos (Watanabe *et al.*, 1990; Einistö *et al.*, 1991). Se ha informado que la sensibilidad de la cepa YG1024 para detectar actividad mutagénica es de 30:2 con respecto a la TA98 de *S. typhimurium* (Scheepers *et al.*, 1991). Watanabe *et al.* (1993) demostró la alta sensibilidad de la cepa YG1024 en la detección de la actividad mutagénica de algunos aminoaromáticos y nitroarenos ambientales con otras cepas de

*S. typhimurium* creadas también para incrementar la actividad de la N-hidroxiarilamina O-acetiltransferasa.

Los nitroarenos y las aminas aromáticas son activadas metabólicamente para dar los correspondientes arilhidroxilaminas a través de la reducción u oxidación de sus grupos funcionales y la enzima acetil-Co-A (N-hidroxiarilamino O-acetil-transferasa) está involucrada en la activación intracelular de arilhidroxilaminas derivadas de nitroarenos y aminas aromáticas (McCoy *et al.*, 1983).

La cepa YG1024 de *S. typhimurium* contiene diferentes tipos de mutaciones en el operón de histidina, propiedad que permite la detección de mutágenos. Además de la mutación en el operón de histidina (hisD3052) que detecta mutaciones por corrimiento de fase, la cepa YG1024 contiene otras mutaciones, las que incrementan su habilidad a detectar mutágenos. Una de ellas es la mutación (rfa), que causa la pérdida parcial de polisacáridos de pared celular, incrementando con ello la permeabilidad a moléculas de tamaño mas o menos grande (como el benzo[a]pireno y el 1-nitropireno) que en condiciones normales no pueden atravesar la pared celular. La otra mutación es una deleción en el gen (urvB), gen que codifica para el sistema de reparación por escisión de ADN, incrementando también con ello la habilidad de detección a muchos otros mutágenos. Finalmente el factor-R, un plásmido que confiere resistencia a ampicilina (Ames *et al.*, 1975).

## **B. Métodos**

### **1. Curva de calibración del ácido protocatecuico (APC)**

Para determinar la cantidad de compuestos fenólicos presentes en los extractos de la flor de jamaica (*H. sabdariffa*), se realizó una curva de calibración del compuesto puro sintético (ácido protocatecuico, APC) de SIGMA P5630 empleando como solvente metanol de J T Baker. Se preparó una solución patrón de  $1 \times 10^{-3}$  M de APC de la cual se realizaron diversas diluciones hasta  $1 \times 10^{-5}$  y se midieron sus absorbencias a 258.2 nm en un

espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2S. L. Se obtuvo la ecuación lineal a partir del cálculo de la regresión lineal, además, su ordenada al origen y correlación lineal, con el fin de verificar su linealidad.

## **2. Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos en la flor de jamaica (*H. sabdariffa*)**

### **2.1 Preparación de los extractos de *H. sabdariffa* y fraccionamiento**

Las flores de jamaica (*H. sabdariffa*) fueron limpiadas para eliminar los frutos, las semillas, flores dañados, polvo y basura. Se secaron en un Horno SHEL LAB Serie HAFO 1600, a una temperatura de 37°C durante 12 horas aproximadamente; después, las flores se molieron en un mortero hasta pulverización.

La extracción se realizó de acuerdo a la metodología que propone Tseng *et al.* (1996). Brevemente consiste en poner 20.0 g de polvo de flor de jamaica por dos litros de etanol 95% en agitación constante por una a dos semanas a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Después de este período, el solvente se evaporó con el rotavapor Büchi R-114 y se llevó a cabo un fraccionamiento con cloroformo y acetato de etilo. El extracto hidroalcohólico fue designado como HSEc y mezclado con cloroformo hasta obtener una fracción soluble (HSEc-C) y una fracción insoluble (HSEc-Ci). HSEc-Ci fue entonces extraído con acetato de etilo hasta obtener una fracción soluble (HSAE) y otra insoluble (HSAEi); después los solventes orgánicos fueron evaporados. Los extractos HSEc y HSAE se secaron en una liofilizadora LABCONCO modelo 12 a -40°C y  $33 \times 10^3$  M Bar. Los extractos liofilizados se pasaron a un frasco ámbar, se sellaron y fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

## **2.2 Cuantificación de los compuestos fenólicos en los extractos de *H. sabdariffa***

La cuantificación de los compuestos fenólicos de *H. sabdariffa* expresados como mg equivalentes de ácido protocatecuico (APC) se realizó una vez que los extractos (HSEc y HSAE) se eluyeron por una columna cromatográfica (1.5 X 30 cm) empacada con gel de sílice J.T. Beker (60-200 mallas) mediante una curva de calibración utilizando al APC como estándar. Muestras de 0.1 g de los extractos liofilizados (HSEc y HSAE) de *H. sabdariffa* se adsorbieron en 0.3 g de gel de sílice con 2.0 ml de metanol, el solvente se evaporó por agitación constante bajo una campana de extracción; las muestras se adsorbieron previamente antes de empacar la columna, debido a que después de cierto tiempo mostraban fracturas y esto interviene en la elución. La columna cromatográfica se empacó con 5.0 g de gel de sílice adsorbida en eter-hexano (75:25). La muestra de los extractos adsorbida en gel de sílice se integró a la columna y después se adicionó 1.0 g de sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). La columna se eluyó con cloroformo, cloroformo/metanol (85:15), cloroformo/metanol (70/30) y metanol. Los eluatos se evaporaron a sequedad y se resuspendieron en 5.0 ml de metanol; inmediatamente después, se leyeron sus absorbencias a 258.2 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2S. La concentración de los compuestos fenólicos se calculó en base a una curva de calibración de ácido protocatecuico (APC) el cual se utilizó como estándar.

## **3. Ensayo de microsuspensión (Modificación a la Prueba de Ames)**

### **3.1 Propagación de la bacteria**

La cepa YG1024 *S. typhimurium* se creció en medio nutritivo Oxoid No. 2 (Oxoid Ltd., Hants, England), hasta alcanzar una densidad de  $1 \times 10^9$  bacterias/ml, aproximadamente entre 16-18 horas, en un baño con agitación constante a una temperatura de 37°C. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 4500 r.p.m., 4°C, 15 min. Posteriormente las bacterias se resuspendieron en una solución de fosfatos de sodio y potasio (0.15 M PBS, pH 7.4) y fueron concentradas a  $1 \times 10^{10}$  bacterias/ml.

### 3.2 Preparación de la mezcla de cofactores

La mezcla de cofactores se preparó siguiendo el procedimiento de Ames *et al.* (1975). Se adicionaron los ingredientes en el siguiente orden: agua, solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.2 M pH de 7.4 (NaP), mezcla de cloruro de magnesio 0.4 M y de cloruro de potasio 1.65 M (MgCl<sub>2</sub>/KCl), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP<sup>+</sup>) 0.1 M y glucosa-6-fosfato (G6P) 1 M.

### 3.3 Preincubación

En tubos de ensayo estériles de 12 X 17 mm colocados en un baño de hielo, se adicionaron los ingredientes en el siguiente orden: 100 µl de mezcla de cofactores, 100 µl de bacteria concentrada en solución salina amortiguadora de sodio y fosfato (1 X10<sup>10</sup> bacterias/ml PBS), 10 µl de solución de HSEc (125, 250 y 500 µg/tubo), HSAE (125, 250 y 500 µg/tubo) de *H. sabdariffa* ó APC (25, 50 y 125 µg/tubo), 10 µl de 1-nitropireno (1-NP), en diferentes concentraciones a evaluar, ó 10 µl de dimetilsulfóxido (DMSO). Las concentraciones de los extractos (HSEc y HSAE) fueron 125, 250 500 µg/tubo, para el APC de 25, 50, 125 µg/tubo y para 1-NP fueron de 2, 4, 6, 8, 10 y 16 ng/tubo. Las mezclas se incubaron a 37°C con agitación por 90 min, los tubos se colocaron sobre un baño de agua a 4°C hasta el momento de adicionar el agar de superficie.

### 3.4 Preparación del agar de superficie y vaciado a cajas Petri

El agar de superficie se preparó siguiendo la técnica de Ames *et al.* (1975), con 90 nmoles de histidina y biotina. Se transfirieron 2 ml del agar a tubos de ensayo estériles y se mantuvieron a 45°C. A cada una de las mezclas después de los 90 min de incubación, se les adicionaron los 2 ml de agar de superficie, se agitaron vigorosamente en un mezclador y se distribuyó en cajas Petri con medio mínimo de Vogel-Boner. Las cajas se dejaron solidificar a temperatura ambiente, se incubaron a 37°C en la obscuridad por 48 h y al final de la

incubación se contaron las colonias mediante un contador de colonias automático BIOTRAN II modelo NBS C111 (New Brunswick Scientific & Co. INC. Edison N. J. USA). De acuerdo al protocolo que propone Ames *et al.* (1975), en cada experimento se verificaron los marcadores genéticos y la frecuencia de reversión espontánea:

\* El marcador genético “rfa” (modificación de la pared celular), se verificó por la sensibilidad al cristal violeta que presenta la cepa YG1024. Una zona clara de inhibición alrededor de una gota (5 µl) de cristal violeta, después de la incubación a 37°C por 24 h en medio completo, indica la presencia de la mutación.

\* Presencia del plásmido o Factor-R. Se comprobó por su resistencia a la ampicilina, después de incubar las cepas con el antibiótico a 37°C por 24 h en medio suplementado con histidina.

\* Frecuencia de la reversión espontánea. Se conoce como el número de colonias que son capaces de revertir en forma “espontánea”, es decir sin la inducción de algún mutágeno, que para la cepa YG1024 generalmente se encuentra en un intervalo de 40 a 90 colonias revertantes por caja.

#### **4. Potencial mutagénico del 1-nitropireno en la cepa de prueba YG1024 de *S. typhimurium***

Siguiendo la metodología descrita en los incisos anteriores y con el propósito de obtener las curvas dosis-respuesta se probaron varias concentraciones del agente mutagénico: 2, 4, 6, 8, 10, 16 ng de 1-nitropireno/tubo. Se define como un resultado positivo el incremento por más de dos veces la frecuencia en la reversión espontánea.

## **5. Efecto de los extractos de la flor de jamaica (*H. sabdariffa*) sobre la cepa YG1024**

Con el propósito de saber si los extractos hidroalcohólico (HSEc) y la fracción soluble de acetato de etilo (HSAE) de la flor de jamaica (*H. sabdariffa*) no ocasionaban mutagenicidad o toxicidad a la cepa de prueba YG1024, se realizaron ensayos siguiendo la misma metodología anteriormente descrita, donde se evaluaron los extractos a concentraciones de 125, 250 y 500  $\mu\text{g}/\text{tubo}$ , empleando como vehículo el DMSO.

## **6. Potencial antimutagénico de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de la flor de jamaica (*H. sabdariffa*)**

Los extractos HSEc y HSAE de la flor de jamaica *H. sabdariffa* a las concentraciones de 125, 250 y 500  $\mu\text{g}/\text{tubo}$  se evaluaron contra la mutagenicidad inducida por el 1-NP (4 y 8  $\text{ng}/\text{tubo}$ ). En el Cuadro 3 se muestra el diseño experimental.

## **7. Potencial antimutagénico del ácido protocatecuico (APC)**

El ácido protocatecuico (APC) se tomó como control de antimutagenicidad y las concentraciones probadas fueron 25, 50 y 125  $\mu\text{g}/\text{tubo}$ . El diseño experimental es semejante al Cuadro 3.

## **8. Ensayo de microsuspensión con dos incubaciones (Mecanismo de acción)**

Con la finalidad de explorar el posible mecanismo de acción de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de flor jamaica (*H. sabdariffa*) sobre la mutagenicidad inducida por el 1-nitropireno, se utilizaron dos incubaciones en el ensayo de microsuspensión descrito por Loarca-Piña *et al.* (1996) (Cuadro 4)

En el Cuadro 5 se muestra el diseño experimental para el APC como control de antimutagenicidad.

**Cuadro 3. Diseño experimental para estudiar la mutagenicidad inducida por 1-nitropireno y la actividad antimutagénica de compuestos fenólicos presentes en los extractos de la flor de jamaica (*H. sabdariffa*)**

Tratamiento	DMSO	[1-NP] <sub>a,b</sub>	Extractos		
			[C] <sub>1</sub>	[C] <sub>2</sub>	[C] <sub>3</sub>
Control Negativo	+				
Control Positivo		+			
YG1024 + [1-NP] <sub>a,b</sub>		+	+	+	+

DMSO Dimetilsulfoxido, 10 µl/tubo

1-NP 1-nitropireno: [1-NP]<sub>a</sub> = 4 ng/tubo, [1-NP]<sub>b</sub> = 8 ng/tubo

[C] Concentraciones de los extractos (HSEc y HSAE) de *H. sabdariffa* evaluadas.

[C]<sub>1</sub> = 125 µg/tubo, [C]<sub>2</sub> = 250 µg/tubo, [C]<sub>3</sub> = 500 µg/tubo

**Cuadro 4. Diseño experimental para estudiar los posibles mecanismos de acción de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de la flor de jamaica (*H. sabdariffa*) contra la mutagenicidad inducida por 1-NP**

Serie Experimental	Primera Incubación <sup>a</sup>	Segunda Incubación <sup>b</sup>	Efecto Esperado
1	DMSO	DMSO	Control negativo
2	1-NP	DMSO	Control de mutagenicidad
3	1-NP + Extractos	DMSO	Extracelular Acomplejamiento
4	1-NP	Extractos	Intracelular Reparación
5	DMSO	1-NP	Control de mutagenicidad
6	DMSO	1-NP + Extractos	Extracelular Acomplejamiento
7	Extractos	1-NP	Intracelular Quimioprotección

<sup>a</sup> Primera Incubación: YG1024 + DMSO, YG1024 + 1-NP, YG1024 + 1-NP + Extractos, YG1024 + Extractos; fueron incubados a 37°C con la mezcla de cofactores por 90 min, lavados con PBS, resuspendidos en PBS y se les adicionó mezcla de cofactores fresco.

<sup>b</sup> Segunda incubación. DMSO, Extractos 1-NP, 1-NP + Extractos; fueron adicionados e incubados posteriormente por 90 min.

[HSEc y HSAE] = 500 ng/tubo, [1-NP] = 8 ng/tubo

**Cuadro 5. Diseño experimental para estudiar los posibles mecanismos de acción del ácido protocatecuico (APC) contra la mutagenicidad inducida por 1-NP**

Serie Experimental	Primera Incubación <sup>a</sup>	Segunda Incubación <sup>b</sup>	Efecto Esperado
1	DMSO	DMSO	Control negativo
2	1-NP	DMSO	Control de mutagenicidad
3	1-NP + APC	DMSO	Extracelular Acomplejamiento
4	1-NP	APC	Intracelular Reparación
5	DMSO	1-NP	Control de mutagenicidad
6	DMSO	1-NP + APC	Extracelular Acomplejamiento
7	APC	1-NP	Intracelular Quimioprotección

<sup>a</sup> Primera Incubación: YG1024 + DMSO, YG1024 + 1-NP, YG1024 + 1-NP + APC, YG1024 + APC; fueron incubados a 37°C con la mezcla de cofactores por 90 min, lavados con PBS, resuspendidos en PBS y se les adicionó mezcla de cofactores fresco.

<sup>b</sup> Segunda incubación: DMSO, APC, 1-NP, 1-NP + APC; fueron adicionados e incubados posteriormente por 90 min

[APC] = 125 ng/tubo, [1-NP] = 8 ng/tubo

## **9. Análisis cualitativo de HSAE por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

El extracto HSAE se analizó de una forma cualitativa por técnicas de HPLC, para realizar un escrutinio de los compuestos fenólicos (elementos fitoquímicos) ahí presentes. Se inyectaron 20 µl de una alícuota de HSAE disuelto en metanol al HPLC equipado con una columna analítica Water Nova Pak HR C<sub>18</sub> 60 Å, 6 µm, (3.9 X 300 mm). Se usó como fase móvil agua grado HPLC con un flujo de 0.5 ml/min, la muestra se analizó con un detector de UV a una longitud de onda de 250 nm. En las mismas condiciones, se inyectó el ácido protocatecuico (APC) empleado como estándar. Se compararon los tiempos de retención del APC estándar y HSAE.

## **10. Análisis Estadístico**

La cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó por triplicado en experimentos independientes obteniéndose la media y la desviación estándar como medida de dispersión.

Para los ensayos de microsuspensión se realizaron dos experimentos independientes con tres repeticiones para cada concentración del agente mutagénico y extractos evaluados.

La diferencia estadística entre el control correspondiente y los tratamientos se analizó utilizando el método estadístico de Dunnett. Asimismo, para comparar estadísticamente los diferentes tratamientos se utilizó la prueba de Tukey (Montgomery, 1991). Todos los datos fueron analizados mediante el paquete estadístico SAS.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Curva de calibración del ácido protocatecuico (APC)

En la Figura 3 se muestra la curva de calibración del APC, la ecuación que se obtuvo fue  $Y = -0.02085 + 0.08851X$  con un coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de 0.99824. Esta curva se realizó con la finalidad de cuantificar los compuestos fenólicos presentes en los extractos de la flor de jamaica (*H. sabdariffa*), expresados como mg equivalentes de APC por 20 g de flor seca. El APC es uno de los compuestos fenólicos simples mayoritarios presentes en la fracción de acetato de etilo (HSAE) de acuerdo como lo informa Tseng *et al.* (1996).

Por otro lado, Kinsella *et al.* (1993) reportan el contenido de fenoles totales en vinos tintos ricos en: flavonoides, catequinas, antocianinas y taninos expresados como mg equivalentes de ácido gálico (compuesto fenólico simple), empleado como estándar para la cuantificación.

### 2. Cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en la flor de jamaica (*H. sabdariffa*)

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la cuantificación de los compuestos fenólicos de la flor de jamaica (*H. sabdariffa*), para el extracto hidroalcohólico (HSEc) y la fracción soluble en acetato de etilo (HSAE). El contenido de compuestos fenólicos resultó ser de  $420.98 \pm 50.40$  y  $152.42 \pm 29.10$  mg equivalentes de ácido protocatecuico (APC) respectivamente por 20 g de flor seca.

Duke *et al.* (1983) y Pouget *et al.* (1990) mencionan que los cálices secos de la jamaica contienen mezclas complejas de compuestos fitoquímicos como el ácido málico, ácido cítrico, dos tipos de antocianinas: gopipetina (hidroxiflavona) e hibiscina en un 13%, de ácido hisbisco 15.3% y de ácido ascórbico 0.004-0.005%. Por otro lado, en una revisión realizada por Argueta *et al.* (1994) comentan que los elementos fitoquímicos presentes en

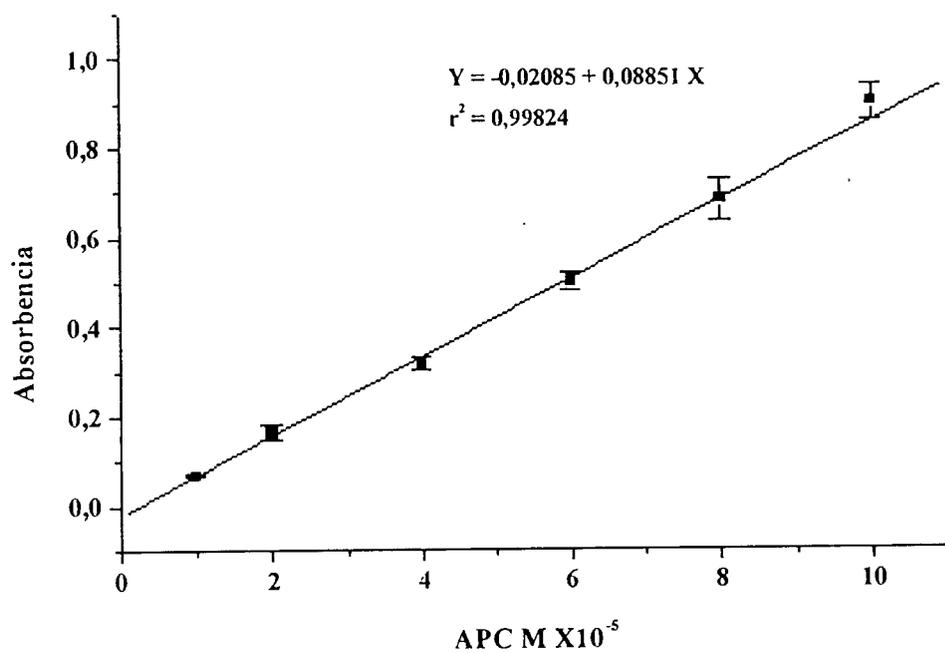


Figura 3. Curva de calibración estándar del ácido protocatecuico (APC) en metanol a  $\lambda=258.24$  nm. Cada punto representa la media de cinco experimentos independientes con dos repeticiones  $\pm$  DS.

Tabla 1.

Contenido de compuestos fenólicos presentes en los extractos HSEc y HSAE de la flor de jamaica (*H. sabdariffa*) expresados como mg equivalentes de APC por 20 g de flor seca.

Naturaleza	Cantidad analizada (mg)	Equivalentes de APC (mg) <sup>a</sup>	%
Material Vegetal seco	20100 ± 157.7		
HSEc	6195.7 ± 252.1	420.98 ± 50.4	6.79
HSAE	2235.4 ± 245.3	152.42 ± 29.1	6.82

<sup>a</sup> Cada valor representa la media de tres experimentos independientes ± DS.

los cálices secos de la jamaica son flavonoides: crisantemina, cianidina-3-sambubiosido, gossipetina, hibiscina, malvina, mirtiina y sabdaretina, un compuesto fenólico simple: ácido protocatecuico. Estos autores no expresan la concentración de compuestos fenólicos totales en los cálices secos de *H. sabdariffa* sólo mencionan que el APC está presente en los extractos crudos como en extractos parcialmente purificados y los identificaron cualitativamente por métodos espectrofotométricos y HPLC.

Morton *et al.* (1987) informaron que extractos de cálices secos de *H. sabdariffa* son ricos en una gran variedad de compuestos fenólicos, pertenecientes al grupo de los flavonoides y ácidos fenólicos, pero no especifican en qué concentración. Además estos autores argumentan que los elementos fitoquímicos que se encuentran en los extractos presentan poca toxicidad, sin mencionar el bioensayo en el cual fueron evaluados.

Los compuestos fenólicos son ubicuos en las plantas medicinales, frutos, vegetales y semillas. Se estima que el consumo promedio de compuestos fenólicos en la dieta humana es de 1-2 g/día. El ácido protocatecuico (APC) es un ácido fenólico simple que se encuentra distribuido en las plantas como metabolito secundario y está presente en pequeñas cantidades (Spanos *et al.*, 1992). Tanaka *et al.* (1994) mencionan que 10 g de lechuga o fresas contienen de 10 - 40 mg de APC/100 g del vegetal y muestran también que el consumo de alimentos con bajos niveles de compuestos fenólicos pueden ser efectivos en la inhibición de tumorigénesis.

### **3. Potencial mutagénico de 1-NP sobre la cepa de prueba YG1024**

Con el propósito de seleccionar la dosis de 1-nitropireno (1-NP) que diera más de dos veces el número de colonias que revierten espontáneamente de la cepa prueba YG1024 de *S. typhimurium*, se desarrolló una curva dosis-respuesta para el agente mutagénico

En la Figura 4 se muestra la curva dosis-respuesta del 1-nitropireno (1-NP) para la cepa YG1024. Las concentraciones evaluadas 2, 4, 6, 8, 10 y 16 ng de 1-NP/tubo dieron  $216 \pm 24$ ,  $376 \pm 12$ ,  $478 \pm 24$ ,  $557 \pm 46$ ,  $681 \pm 38$  y  $1020 \pm 95$  colonias revertantes por caja respectivamente, siendo la reversión espontánea de  $43 \pm 3$ .

Los resultados obtenidos requieren sólo de ng/tubo del 1-NP, comparados con los trabajos de Watanabe *et al.* (1990) y Scheepers *et al.* (1991), donde las dosis se requiere en el orden de µg/tubo en la modalidad de incorporación de placa, demostrando una vez más la sensibilidad del ensayo de microsuspensión.

Por otro lado, González de Mejía *et al.* (1997 a,b; 1998 y 1999) evaluaron la actividad mutagénica del 1-NP y sus metabolitos en la cepa YG1024 a las concentraciones de 0.01, 0.03, 0.06 y 0.10 µg de 1-NP/tubo, empleando el método de incorporación de placa. Las dosis son diez veces mayores en comparación con las que se utilizaron en esta investigación, al utilizar el ensayo de microsuspensión.

Al realizar el análisis estadístico y aplicando la prueba de Dunnett, se encontró que existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre el número de colonias revertantes del control negativo (10 µl de DMSO/tubo, solvente utilizado como vehículo) con respecto a las revertantes obtenidas por cada una de las concentraciones evaluadas de 1-NP (2, 4, 6, 8, 10 y 16 ng de 1-NP/tubo); además, la mutagenicidad inducida por el 1-NP en la cepa YG1024 es dependiente de las dosis probadas.

A partir de los resultados obtenidos, se eligieron las concentraciones de 4 y 8 ng de 1-NP/tubo, que muestran más de dos veces la mutación espontánea de la cepa YG1024 para realizar los ensayos de antimutagénesis.

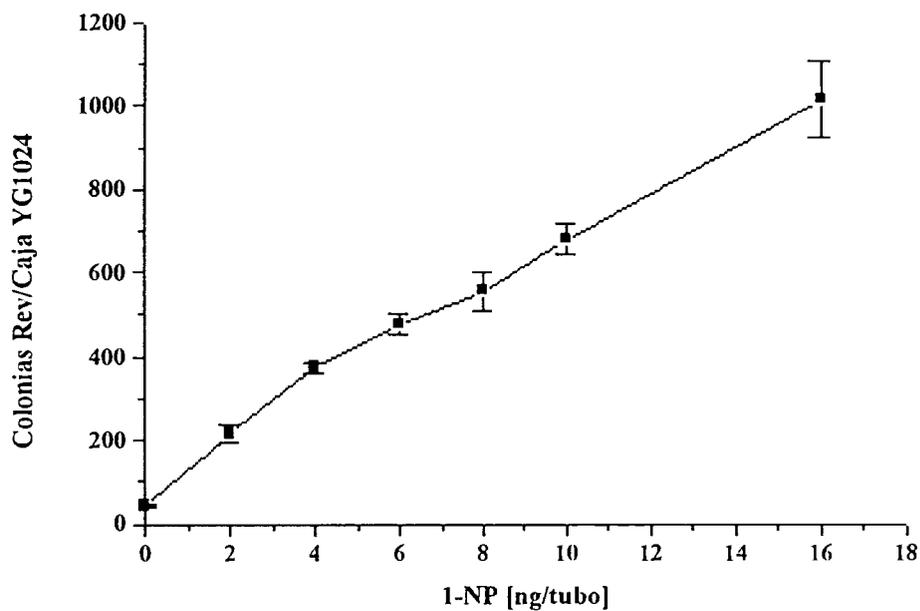


Figura 4. Curva dosis-respuesta del 1-nitropireno (1-NP) como agente mutagénico en la cepa YG1024 de *S. typhimurium*. Cada punto representa la media de dos experimentos independientes con tres repeticiones  $\pm$  DS. La reversión espontánea fue de  $43 \pm 3$ .

#### 4. Efecto de los extractos (HSEc y HSAE) de *H. sabdariffa* en la cepa YG1024

Con el propósito de estudiar el efecto de los extractos hidroalcohólico (HSEc) y la fracción soluble de acetato de etilo (HSAE) de la flor de jamaica (*H. sabdariffa*) sobre la mutagenicidad o toxicidad en la cepa de prueba YG1024, se llevaron a cabo ensayos en los cuales se evaluaron los extractos (HSEc y HSAE) a concentraciones de 125, 250 y 500 µg/tubo.

En la Figura 5, se muestra el efecto de los extractos (HSEc y HSAE) sobre la cepa YG1024 mediante el ensayo de microsuspensión. Los resultados obtenidos muestran que HSEc y HSAE con un promedio de 69 y 78 colonias revertantes/caja respectivamente no sobrepasan el doble de colonias que revierten espontáneamente en la cepa YG1024 (73 rev/caja). En otras palabras, los extractos (HSEc y HSAE) a las concentraciones evaluadas no son ni mutagénicos ni tóxicos para la cepa.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Morton *et al.* (1987), donde a pesar de no especificar el bioensayo utilizado concluyen que los extractos de la flor de jamaica no ejercen toxicidad.

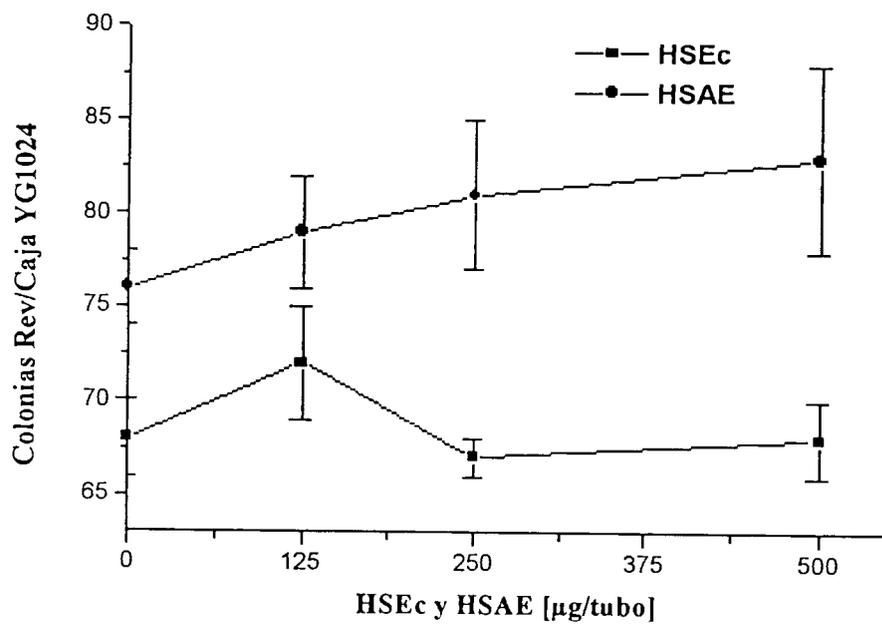


Figura 5. Curva dosis-respuesta de la toxicidad de los extractos (HSEc y HSAE) de la flor de jamica (*H. sabdariffa*) mediante el ensayo de microsuspensión. Cada punto representa la media de dos experimentos independientes con tres repeticiones  $\pm$  DS. La reversión espontánea promedio fue de  $62 \pm 3$

## 5. Potencial antimutagénico de los extractos de *H. sabdariffa* contra la mutagenicidad inducida por el 1-NP

### 5.1 Actividad antimutagénica de HSEc

La mezcla compleja de compuestos fenólicos heterogénea presente en el extracto hidroalcohólico (HSEc) de *H. sabdariffa* mostró inhibición de la mutagenicidad inducida por el 1-NP en la cepa YG1024 de *S. typhimurium* independientemente de las concentraciones del extracto crudo evaluadas (125, 250, 500 µg/tubo) Figura 6; la inhibición de la mutagenicidad resultó en promedio de 65 y 79% al utilizar 4 y 8 ng/tubo de 1-NP como se puede apreciar en la Tabla 2.

La inhibición de la mutagenicidad inducida por el 1-NP ha sido estudiada para algunos otros compuestos antimutagénicos, como el estudio realizado por González de Mejía *et al.* (1997b), utilizando el ensayo de incorporación en caja donde, observaron que la inhibición de la mutagenicidad inducida por el 1-NP (0.06 µg/tubo) en la cepa YG1024 por las xantofilas presentes en la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) fue del 66% en una concentración evaluada de 0.2 µg/tubo de un pigmento extraído de la flor de cempasúchil utilizado para consumo humano, expresado como equivalentes de luteína. En otro estudio realizado por los mismos autores (1998) donde se evaluó la inhibición de la mutagenicidad inducida por el 1-NP y sus metabolitos en la cepa YG1024, informaron que el efecto inhibitorio del 1-NP (0.05 µg/tubo) por los carotenoides extraídos de chile verde (*Capsicum spp.*) fue de un 98% a una concentración de 34 nmol/tubo de carotenoides expresados como equivalentes de trans-β-caroteno. La dosis de 1-NP empleada en este estudio fue aproximadamente 25 veces mayor que la mínima utilizada en nuestra investigación por medio del ensayo de microsuspensión.

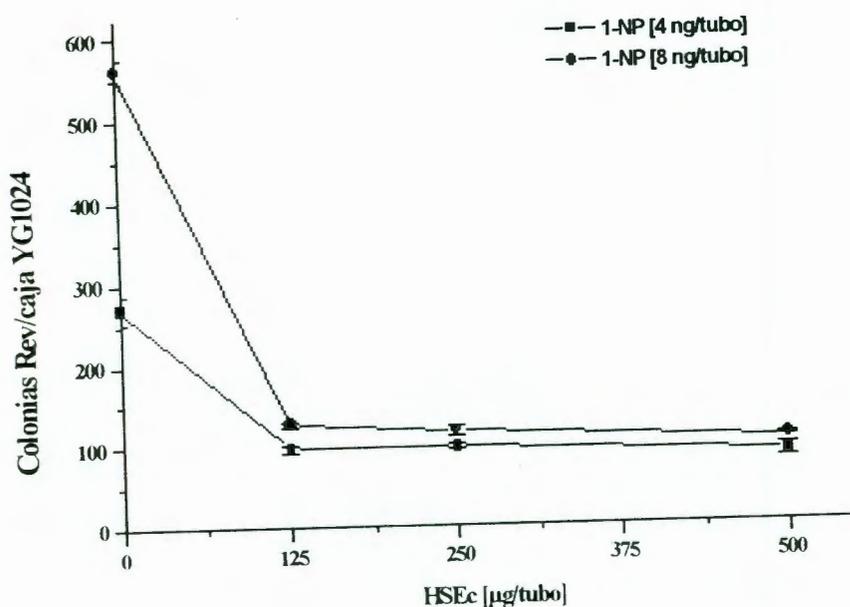


Figura 6. Actividad antimutagénica del extracto hidroalcohólico (HSEc) de la flor de jamaica (*H. sabdariffa*) contra 1-NP a 4 y 8 ng/tubo. Cada punto representa la media de dos experimentos independientes con tres repeticiones  $\pm$  DS. La reversión espontánea fue de  $62 \pm 4$ .

Tabla 2.

Actividad antimutagénica (% inhibición) de los compuestos fenólicos presentes en el extracto HSEc de la flor de jamaica (*H. sabdariffa*) contra 1-NP (4 y 8 ng/tubo), mediante el ensayo de microsuspensión empleando la cepa YG1024 de *S. typhimurium*.

Tratamiento	Antimutágeno ( $\mu\text{g}/\text{tubo}$ )	Número Revertantes			% Inhibición
			*D	**T	
1-NP (4 ng/tubo)	0	269 $\pm$ 17	a	a	
HSEc	125	97 $\pm$ 4	b	b	64 $\pm$ 2
	250	97 $\pm$ 3	c	b	64 $\pm$ 1
	500	87 $\pm$ 8	d	b	68 $\pm$ 2
1-NP (8 ng/tubo)	0	561 $\pm$ 14	a	a	
HSEc	125	127 $\pm$ 4	b	b	77 $\pm$ 1
	250	116 $\pm$ 5	c	b	79 $\pm$ 1
	500	106 $\pm$ 2	d	b	82 $\pm$ 1

Cada valor representa la media de dos experimentos independientes con tres repeticiones  $\pm$  DS. La reversión espontánea fue de 62  $\pm$  4

Letras diferentes expresan diferencia significativa con  $p < 0.05$ , prueba de Dunnett (\*D) y Tukey (\*\*T)

González de Mejía *et al.* (1999), empleando el ensayo de Ames en su modalidad de incorporación en caja, evaluaron la actividad antimutagénica de compuestos fenólicos presentes en la cascarilla de frijol (*Phaseolus vulgaris*) contra 1-NP en la cepa YG1024 y reportaron que el efecto inhibitorio sobre el 1-NP (0.1 µg/tubo) fue de un 35% a una concentración de 500 µg/tubo de compuestos fenólicos expresados como mg equivalentes de (+)-catequina.

Por otro lado, se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre el número de colonias revertantes del control de mutagenicidad (1-NP 4 y 8 ng/tubo) con respecto a las revertantes obtenidas para cada una de las dosis de HSEc a concentraciones de 125, 250, 500 µg/tubo, que se evaluaron de una forma simultánea (HSEc+1-NP). Para las concentraciones de HSEc no se observó diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre la inhibición de la mutagenicidad obtenida por las dosis de 1-NP (4 y 8 ng/tubo) evaluadas; esto sugiere que debido a que el HSEc, es un extracto heterogéneo completamente crudo contiene una gran variedad de fitoelementos donde destacan los compuestos fenólicos y algunos polisacáridos de acuerdo a lo que reporta Müller *et al.* (1992) es decir, podrían existir efectos sinérgicos, antagónicos o potenciadores entre los fitoconstituyentes del extracto y el agente mutagénico. Edenharder *et al.* (1996), Tang y Edenharder (1997), evaluaron la antimutagenicidad de compuestos químicos presentes en frutas, vegetales y plantas, observando efectos potenciadores y antogónicos contra la mutagenicidad inducida por el 1-nitropireno (1-NP) y 2-nitrofluoreno (2-NF) en la prueba de Ames. Espinosa-Aguirre *et al.* (1993), quienes trabajaron con extractos de chile también observaron una potenciación de la mutagenicidad inducida por 1-NP y dinitropireno (DNP) en la misma prueba empleando a la cepa YG1024, pero en la modalidad de incorporación en caja.

## 5.2 Actividad antimutagénica de HSAE

En base a los resultados obtenidos por los autores anteriormente citados y bajo las recomendaciones de Kaur *et al.* (1998) y Tseng *et al.* (1996), se llevaron a cabo una serie de extracciones parciales de HSEc con diferentes solventes orgánicos de acuerdo a su

coeficiente de partición con cloroformo y acetato de etilo; obteniéndose así del HSEc una fracción soluble en acetato de etilo (HSAE), fracción rica en APC, a la cual también se le considera como un extracto parcialmente crudo.

Los compuestos fenólicos presentes en HSAE de *H. sabdariffa* mostraron inhibición de la mutagenicidad inducida por el 1-NP en la cepa YG1024, independientemente de las concentraciones evaluadas (125, 250 y 500 µg/tubo). La inhibición de la mutagenicidad resultó en promedio 68 y 74% contra 4 y 8 ng/tubo de 1-NP respectivamente (Figura 7, Tabla 4).

Se observó que existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre el número de colonias revertantes del control de mutagenicidad (1-NP 4 y 8 ng/tubo) con respecto a las revertantes obtenidas por cada una de las concentraciones de HSAE (125, 250 y 500 µg/tubo), evaluadas de forma simultánea (HSAE+1-NP). De igual forma que el extracto HSEc, el extracto HSAE no mostró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre la inhibición de la mutagenicidad obtenida por las concentraciones de 4 y 8 ng/tubo de 1-NP. Esto puede ser explicado debido a que los extractos utilizados en el bioensayo presentan una gran variedad de elementos fitoquímicos y por lo tanto, no se obtenga diferencia significativa entre cada uno de los tratamientos, dado que los compuestos biológicamente activos podrían estar desempeñando varios efectos a diferentes niveles dependiendo del tipo de compuesto, estructura química y forma de acción (Stavric, 1994; Edenharder *et al.*, 1997).

Se conocen otros compuestos fenólicos extraídos de algunas frutas y plantas, cuya extracción se lleva a cabo con etanol y acetato de etilo. Kaur *et al.* (1998), estudiaron una fracción rica en taninos, compuestos fenólicos condensados (TC-E) de la pulpa seca del fruto de *Terminalia chebula*, obtenida por extracciones sucesivas con alcohol etílico 95% y acetato de etilo, de esta forma evaluaron el potencial antimutagénico de la fracción contra dos mutágenos directos 4-nitro-o-fenilenediamina (NPD) y 4-nitroquinolina-N-óxido (4NQNO), asimismo, contra un mutágeno indirecto 2-aminofluoreno (2-AF) utilizando la cepa TA98 de *S. typhimurium*, en su modalidad de incorporación de placa.

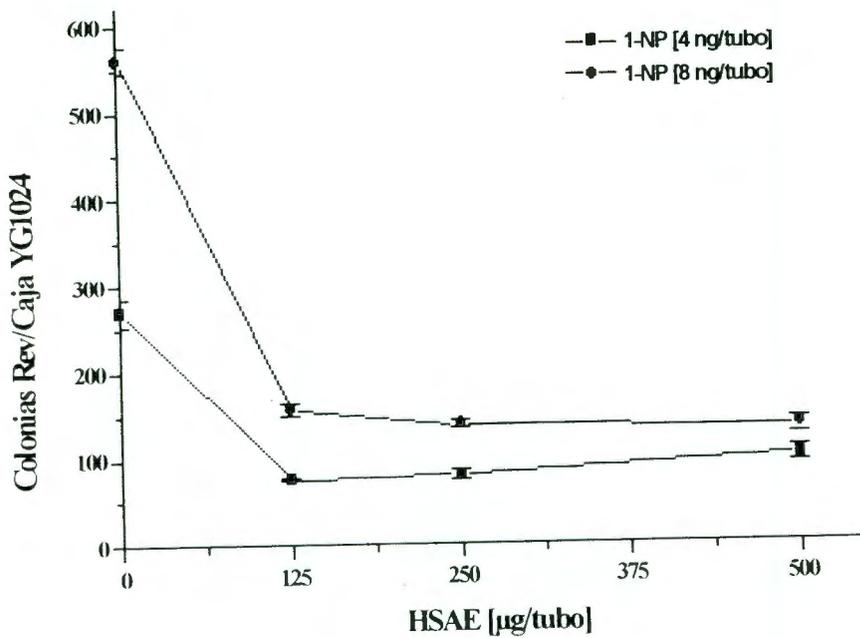


Figura 7. Actividad antimutagénica del extracto de acetato de etilo (HSAE) de la flor de jamaica (*H. sabdariffa*) contra 1-NP a 4 y 8 ng/tubo. Cada punto representa la media de dos experimentos independientes con tres repeticiones  $\pm$  DS. La reversión espontánea fue de  $62 \pm 4$ .

Tabla 3.

Actividad antimutagénica (%inhibición) de los compuestos fenólicos presentes en el extracto HSAE de la flor de jamaica (*H. sabdariffa*) contra 1-NP (4 y 8 ng/tubo), mediante el ensayo de microsuspensión empleando la cepa YG1024 de *S. typhimurium*.

Tratamiento	Antimutágeno ( $\mu\text{g}/\text{tubo}$ )	Número Revertantes			% Inhibición
			*D	**T	
1-NP (4 ng/tubo)	0	269 $\pm$ 17	a	a	
HSAEc	125	76 $\pm$ 2	b	b	72 $\pm$ 3
	250	80 $\pm$ 6	c	b	70 $\pm$ 1
	500	101 $\pm$ 9	d	c	63 $\pm$ 1
1-NP (8ng/tubo)	0	561 $\pm$ 14	a	a	
HSAE	125	155 $\pm$ 5	b	b	72 $\pm$ 2
	250	138 $\pm$ 3	c	c	75 $\pm$ 1
	500	134 $\pm$ 8	d	c	76 $\pm$ 1

Cada valor representa la media de dos experimentos independientes con tres repeticiones  $\pm$  DS. La reversión espontánea fue de 62  $\pm$  4

Letras diferentes expresan diferencia significativa con  $p < 0.05$ , prueba de Dunnett (\*D) y Tukey (\*\*T)

Estos estudios revelaron que el extracto con taninos oligoméricos de ácido gálico (TC-E), inhibió significativamente la mutagenicidad inducida por el 2-AF (mutágeno dependiente de S9). Sin embargo, (TC-E) fue antagonista contra NPD pero no contra 4NQNO.

### 5.3 Actividad antimutagénica del ácido protocatecuico (APC)

El APC mostró inhibición de la mutagenicidad inducida por 1-NP en la cepa YG1024, independientemente de las concentraciones evaluadas (25, 50 y 125 µg/tubo). La inhibición de la mutagenicidad resultó en promedio de 60 y 56% al utilizar 4 y 8 ng/tubo de 1-NP respectivamente (Figura 8, Tabla 4).

Cabe mencionar que las concentraciones de APC evaluadas son mucho menores que las empleadas con los extractos (HSEc y HSAE) de *H. sabdariffa*, la concentración más alta fue de 125 µg/tubo de APC, mínima utilizada para los extractos de la flor de jamaica.

Se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre el número de colonias revertantes del control de mutagenicidad (1-NP 4 y 8 ng/tubo) con respecto a las revertantes obtenidas para cada una de las dosis de APC a concentraciones de 25, 50 y 125 µg/tubo, evaluados de una forma simultánea (APC+1-NP). Por otro lado, no se observó diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre la inhibición de la mutagenicidad obtenida por las concentraciones de 4 y 8 ng/tubo de 1-NP para el APC.

En un estudio realizado por González de Mejía *et al.* (1999) donde evaluaron la actividad antimutagénica del ácido elágico (compuesto fenólico) (50, 125, 250 y 500 µg/tubo) contra la mutagenicidad inducida por el 1-NP en la cepa YG1024 encontraron que el efecto inhibitorio sobre el 1-NP (0.1 µg/tubo), fue 83% a una concentración de 300 µg/tubo de ácido elágico, dosis empleada como control de antimutagénesis. Las concentraciones del ácido elágico utilizadas en esta investigación son semejantes a las de nuestro trabajo pero el bioensayo que utilizaron fue el de incorporación en placa.

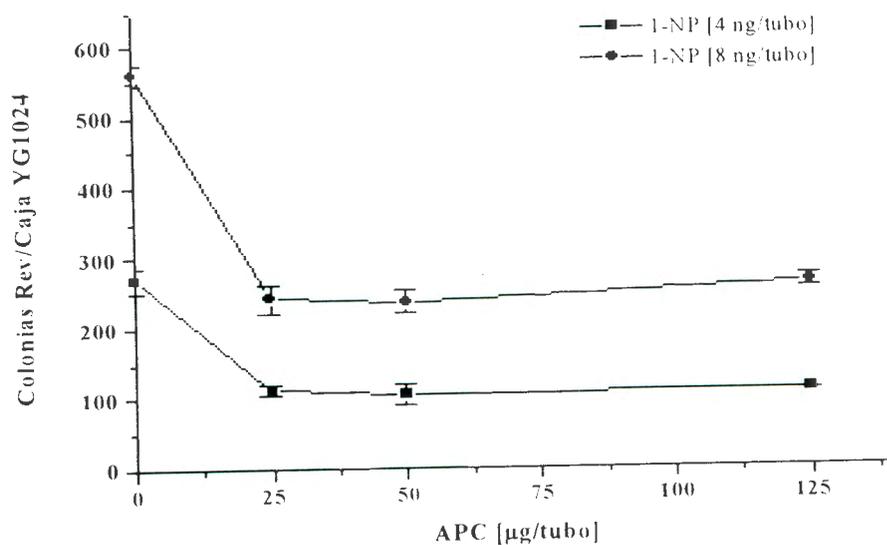


Figura 8. Actividad antimutagénica del ácido protocatecuico (APC) como control de antimutagenicidad contra 1-NP a 4 y 8 ng/tubo. Cada punto representa la media de dos experimentos independientes con tres repeticiones  $\pm$  DS. La reversión espontánea fue de  $62 \pm 4$ .

Tabla 4.

Actividad antimutagénica (%inhibición) del APC incluido como control de antimutagénesis contra 1-NP (4 y 8 ng/tubo), mediante el ensayo de microsuspensión empleando la cepa YG1024 de *S. typhimurium*.

Tratamiento	Antimutágeno ( $\mu\text{g}/\text{tubo}$ )	Número Revertantes			% Inhibición
			*D **T		
1-NP (4 ng/tubo)	0	269 $\pm$ 17	a	a	
APC	25	112 $\pm$ 9	b	b	58 $\pm$ 3
	50	105 $\pm$ 9	c	b	61 $\pm$ 1
	125	108 $\pm$ 1	d	b	60 $\pm$ 1
1-NP (8 ng/tubo)	0	561 $\pm$ 14	a	a	
APC	25	243 $\pm$ 20	b	b	57 $\pm$ 3
	50	237 $\pm$ 16	c	b	58 $\pm$ 2
	125	263 $\pm$ 8	d	c	53 $\pm$ 2

Cada valor representa la media de dos experimentos independientes con tres repeticiones  $\pm$  DS. La reversión espontánea fue de  $62 \pm 4$

Letras diferentes expresan diferencia significativa con  $p < 0.05$ , prueba de Dunnett (\*D) y Tukey (\*\*T)

## 6. Ensayo de microsuspensión con dos incubaciones

### 6.1 Mecanismos de acción de los extractos de *H. sabdariffa* y el APC sobre la mutagenicidad inducida por el 1-NP

Con el propósito de sugerir los posibles mecanismos de acción de antimutagenicidad de los compuestos fenólicos presentes en los extractos (HSEc y HSAE) de *H. sabdariffa* y del ácido protocatecuico (APC) como control de antimutagénesis, se llevó a cabo el ensayo de microsuspensión con dos períodos de incubación para la cepa YG1024 de *S. typhimurium* propuesto por Loarca-Piña *et al.* (1996).

En las Tablas 5, 6 y 7 se muestran los porcentajes de inhibición de la mutagenicidad inducida por el 1-NP en la cepa YG1024 bajo diferentes condiciones experimentales: extracto hidroalcohólico (HSEc), fracción soluble en acetato de etilo (HSAE) de la flor de jamaica (*H. sabdariffa*) y el ácido protocatecuico APC. Cuando se incubó la cepa de prueba YG1024 con la mezcla 1-NP+HSEc, 1-NP+HSAE, 1-NP+APC (Series 3 y 6; Tabla 5, 6 y 7); se obtuvo una inhibición en promedio del 65, 53 y 40% respectivamente, la inhibición fue independiente cuando se aplicó en la primera o segunda incubación.

Los resultados obtenidos sugieren que la inhibición de la mutagenicidad inducida por el 1-NP es una combinación de un posible acomplejamiento de los compuestos de los extractos (HSEc y HSAE) y APC con el mutágeno, reduciendo con ello su biodisponibilidad; pero también por una posible quimioprotección de éstos contra el 1-NP (Serie 7, Tablas 5, 6 y 7)

Diferentes autores han propuesto que la inhibición de la mutagenicidad por fitoconstituyentes de frutos y vegetales de la dieta contra mutágenos del ambiente [1-nitropireno (1-NP), dinitropireno (DNP) y benzo[a]pireno (B[a]P)] se da por una posible modulación enzimática o acomplejamiento entre fitoclementos y los mutágenos (Kudora

Tabla 5.

Inhibición de la mutagenicidad del 1-NP en la cepa YG1024 de *S. typhimurium* bajo diferentes condiciones experimentales con el extracto hidroalcohólico (HSEc) de la flor de jamaica (*H. sabdariffa*).

Serie Experimental	Primera Incubación	Segunda Incubación	Número Revertantes	% Inhibición	Efecto Esperado
1	DMSO	DMSO	66 ± 8		Control negativo
2	1-NP	DMSO	316 ± 20 <sup>a</sup>		Control de mutagenicidad
			*D **T		
3	1-NP + HSEc	DMSO	105 ± 21 <sup>b</sup>	67 ± 2	Extracelular Acomplejamiento
4	1-NP	HSEc	208 ± 24 <sup>c</sup>	34 ± 4	Intracelular Reparación
5	DMSO	1-NP	309 ± 28 <sup>a</sup>		Control de mutagenicidad
6	DMSO	1-NP + HSEc	107 ± 14 <sup>b</sup>	65 ± 3	Extracelular Acomplejamiento
7	HSEc	1-NP	126 ± 10 <sup>c</sup>	59 ± 3	Intracelular Quimioprotección

Primera incubación: YG1024 + DMSO, YG1024 + 1-NP, YG1024 + 1-NP + HSEc y YG1024 + HSEc; fueron incubados a 37°C con la mezcla de cofactores por 90 min., lavados con PBS, resuspendidos en PBS y se les adicionó mezcla de cofactores fresco.

Segunda incubación: DMSO, 1-NP, HSEc, 1-NP + HSEc; fueron adicionados e incubados posteriormente por 90 min.

[HSEc] = 500 ng/tubo, [1-NP] = 8 ng/tubo.

Cada valor representa la media de dos experimentos independientes con tres repeticiones ± DS. La reversión espontánea fue de 66 ± 8.

Letras diferentes expresan diferencia significativa con p<0.05, prueba de Dunnett (\*D) y Tukey (\*\*T)

Tabla 6.

Inhibición de la mutagenicidad del 1-NP en la cepa YG1024 de *S. typhimurium* bajo diferentes condiciones experimentales con el extracto de acetato de etilo (HSAE) de la flor de jamaica (*H. sabdariffa*).

Serie Experimental	Primera Incubación	Segunda Incubación	Número Revertantes	% Inhibición	Efecto Esperado
1	DMSO	DMSO	66 ± 8		Control negativo
2	1-NP	DMSO	316 ± 20 <sup>a</sup>		Control de mutagenicidad
3	1-NP + HSAE	DMSO	133 ± 13 <sup>b</sup>	58 ± 1	Extracelular Acomplejamiento
4	1-NP	HSAE	221 ± 17 <sup>c</sup>	30 ± 3	Intracelular Reparación
5	DMSO	1-NP	309 ± 28 <sup>a</sup>		Control de mutagenicidad
6	DMSO	1-NP + HSAE	162 ± 8 <sup>b</sup>	48 ± 1	Extracelular Acomplejamiento
7	HSAE	1-NP	119 ± 7 <sup>c</sup>	62 ± 1	Intracelular Quimioprotección

Primera incubación: YG1024 + DMSO, YG1024 + 1-NP, YG1024 + 1-NP + HSAE y YG1024 + HSAE; fueron incubados a 37°C con la mezcla de cofactores por 90 min., lavados con PBS, resuspendidos en PBS y se les adicionó mezcla de cofactores fresco.

Segunda incubación: DMSO, HSAE, 1-NP, 1-NP + HSAE, fueron adicionados e incubados posteriormente por 90 min.

[HSAE] = 500 ng/tubo, [1-NP] = 8 ng/tubo.

Cada valor representa la media de dos experimentos independientes con tres repeticiones ± DS. La reversión espontánea fue de 66 ± 8.

Letras diferentes expresan diferencia significativa con  $p < 0.05$ , prueba de Dunnett (\*D) y Tukey (\*\*T)

Tabla 7.

Inhibición de la mutagenicidad del 1-NP en la cepa YG1024 de *S. typhimurium* bajo diferentes condiciones experimentales con el ácido protocatecuico (APC) como control de antimutagenicidad.

Serie Experimental	Primera Incubación	Segunda Incubación	Número Revertantes	% Inhibición	Efecto Esperado
1	DMSO	DMSO	66 ± 8		Control negativo
2	1-NP	DMSO	316 ± 20 <sup>a</sup>	*D **T	Control de mutagenicidad
3	1-NP + APC	DMSO	185 ± 23 <sup>b</sup>	b	Extracelular Acomplejamiento
4	1-NP	APC	232 ± 19 <sup>c</sup>	c	Intracelular Reparación
5	DMSO	1-NP	309 ± 28 <sup>a</sup>	a	Control
6	DMSO	1-NP + APC	166 ± 6 <sup>b</sup>	b	Extracelular Acomplejamiento
7	APC	1-NP	127 ± 13 <sup>c</sup>	d	Intracelular Quimioprotección

Primera incubación: YG1024 +DMSO, YG1024 + 1-NP, YG1024 + 1-NP + APC, YG1024 + APC; fueron incubados a 37°C con la mezcla de cofactores por 90 min., lavados con PBS, resuspendidos en PBS y se les adicionó mezcla de cofactores fresco.

Segunda incubación: DMSO, 1-NP, APC, 1-NP + APC; fueron adicionados e incubados posteriormente por 90 min.

[APC] = 125 ng/tubo, [1-NP] = 8 ng/tubo.

Cada valor representa la media de dos experimentos independientes con tres repeticiones ± DS. La reversión espontánea fue de 66 ± 8.

Letras diferentes expresan diferencia significativa con p<0.05, prueba de Dunnett (\*D) y Tukey (\*\*T)

y Hara, 1999; Weisburger *et al.*, 1999). Tachino *et al.* (1994) informaron que el mecanismo de acción de la clorofilina (CHL) contra de B[a]P es debido a la formación de un complejo entre CHL y el epóxido de B[a]P. Asimismo, González de Mejía *et al.* (1997b) sugieren que el principal mecanismo de acción de la luteína contra 1-NP en la cepa YG1024 se debe a la formación de un complejo entre la luteína y el 1-NP, que puede limitar la biodisponibilidad del agente mutagénico. Hammons *et al.* (1999) argumentan que los fitoconstituyentes de la dieta entre los que destacan los polifenoles, modulan o inhiben la bioactivación de aminas aromáticas (arilaminas) desempeñándose como uno de principales mecanismos de los quimioprotección.

Con la finalidad de estudiar el posible efecto de reparación de los extractos HSEc, HSAE y del APC, se realizó una primera incubación de YG1024 en presencia del 1-NP y una segunda incubación con el extractos HSEc, HSAE y APC, (previa remoción del 1-NP con PBS; Serie 4; Tabla 5, 6 y 7), la inhibición de la mutagenicidad fue de 34, 30 y 27% respectivamente, estos resultados sugieren que algunos de los compuestos fenólicos presentes en HSEc y HSAE pueden tener un efecto sobre el sistema de reparación del material genético de la bacteria. González de Mejía *et al.* (1997a) informaron resultados muy semejantes al trabajar con luteína (10 µg/tubo) y AFB<sub>1</sub> (0.5 µg/tubo) en YG1024, obtuvieron un 31% de inhibición en el ensayo de preincubación con AFB<sub>1</sub>. Mientras que Loarca-Piña *et al.* (1996) obtuvieron un 36% de inhibición al dañar TA98 con AFB<sub>1</sub> primeramente y después al adicionar ácido eláxico (AE), por lo que sugieren que el efecto inhibitorio podría estar mediado por una interacción entre AE y ADN alterado por AFB<sub>1</sub> de la cepa de prueba. En otro estudio realizado por González de Mejía *et al.* (1997b) en donde evaluaron a la cepa YG1024 en una primera incubación con 1-NP y después a la luteína, observaron que la luteína no presentó efecto sobre el sistema de reparación del ADN bacteriano.

Por otro lado, con el propósito de estudiar el efecto quimioprotector de los extractos HSEc, HSAE y APC se realizó una primera incubación de YG1024 en presencia de HSEc, HSAE y APC después una segunda en presencia de 1-NP (previa remoción de HSEc, HSAE y APC

con PBS, Serie 7; Tabla 5, 6 y 7), la inhibición de la mutagenicidad fue de 59, 62 y 59%. Estos porcentajes de inhibición pueden deberse principalmente a la presencia de uno o varios compuestos fenólicos de los extractos que posiblemente tengan afinidad por el sitio de unión de los iones arilnitronio (forma metabólicamente activa del 1-NP) al ADN (Smith *et al.*, 1995; Rosser *et al.*, 1996), con lo que se disminuye el número de sitios disponibles; otra opción es que los fitoelementos de HSEc, HSAE de *H. sabdariffa* y el APC modulen o inhiban las enzimas involucradas en la activación del 1-NP (nitrorreductasas y O-acetiltransferasas) que sobreproduce la cepa YG1024, disminuyendo así la mutagenicidad de los agentes mutagénicos aún cuando estas actividades enzimáticas no fueron evaluadas en nuestros resultados. Ioannides *et al.* (1990) mencionan que los retinoides inhiben las nitrorreductasas y transferasas bacterianas necesarias para la activación metabólica del 2-NF, 1-NP y 3-NFA. Kou *et al.* (1992) informaron que la epigenina fue capaz de inhibir las enzimas reductasas encargadas de activar a los nitropirenos causantes de la mutagenicidad en las cepas de prueba de *S. typhimurium* sobre productoras de OAT. Wall *et al.* (1990) mencionan que los flavonoides presentes en extractos de frutas y otros alimentos reducen la mutagenicidad de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (2-NF, 3-NFA y 1-NP) por la inhibición de las nitrorreductasas y/o O-transferasas bacterianas, debido a que los nitroarenos a través de estas enzimas requieren de su reducción del grupo nitro a un intermediario hidroxiamina y esterificación del (OH) funcional por varias transferasas, especialmente las O-acetiltransferasas a metabolitos que se forman espontáneamente a un ion arilnitronium reactivo con el ADN (formando aductos de ADN), induciendo así la mutagenicidad (Smith *et al.*, 1995; Rosser *et al.*, 1996; Maher *et al.*, 1999; Howard y Beland., 1999).

Dashwood *et al.* (1999) informaron que los polifenoles del té negro y verde [galato de (-)-epigallocatequina (EGCG), catequinas, epicatequina (EC), entre otros] inhibieron la mutagenicidad inducida por aminas heterocíclicas en el ensayo de Ames en un 90%, debido a la modulación de enzimas involucradas en su activación y que existen otros mecanismos alternativos de inhibición de una forma minoritaria como atrapamiento de moléculas electrofílicas, acomplejamiento de los polifenoles y los mutágenos. Cabe mencionar también

que Loarca-Piña *et al.* (1996) informaron que el ácido elágico, mediante el ensayo de microsuspensión con dos incubaciones, inhibe un 36% la mutagenicidad de AFB<sub>1</sub> en TA98, sugiriendo que tiene un efecto quimioprotector.

Por otro lado, en una revisión realizada por Kudora y Hara (1999), estos autores informaron que la inhibición de la mutagenicidad y carcinogenicidad de los polifenoles presentes en extractos de té: epicatequina (EC), galato de epicatequina (ECG), epigallocatequina (EGC), galato de (-)-epigallocatequina (EGCG) y teofilinas (TFs) cuyos estudios fueron realizados *in vitro* e *in vivo*, podrían ejercer su actividad a través de diferentes mecanismos intracelulares y extracelulares, incluyendo la modulación del metabolismo enzimático, bloqueando o suprimiendo la interacción de los agentes mutagénicos o sus metabolitos, modulando la replicación y efectos de reparación del ADN, promoviendo o inhibiendo la invasión de metástasis e induciendo nuevos mecanismos en el sistema biológico de prueba.

Los resultados de esta investigación indican que la inhibición de la mutagenicidad inducida por el 1-NP en la cepa de prueba YG1024 puede explicarse tanto por un posible acomplejamiento de los extractos (HSEc y HSAE) y el APC con el mutágeno, como por una considerable participación de los mecanismos intracelulares de quimioprotección y reparación. Ayrton *et al.* (1992) informaron que el ácido elágico (AE) podría ejercer su actividad antimutagénica y anticarcinogénica a través de uno o más de los siguientes mecanismos: inhibiendo las enzimas responsables de la activación del carcinógeno, estimulando enzimas involucradas en la detoxificación de intermediarios reactivos, por una interacción del polifenol con los intermediarios reactivos inhibiendo así la formación de aductos y mediante la interacción del compuesto fenólico con el ADN, reduciendo el número de sitios disponibles de interacción con los agentes mutagénicos.

## 7. Análisis cualitativo de HSAE por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

En el transcurso de esta investigación surgió la inquietud de analizar de una forma cualitativa el extracto parcialmente crudo (HSAE) de *H. sabdariffa* mediante técnicas de HPLC para realizar una elucidación de los compuestos fitoquímicos presentes en HSAE dado que Tseng *et al.* (1996) informaron que el compuesto fenólico simple mayoritario en Hibiscus fue APC pero no muestran evidencias.

En la Figura 9, se muestra un perfil cromatográfico del análisis cualitativo de HSAE, que se llevó a cabo inyectando 20  $\mu$ l de una alícuota de HSAE (disuelta en metanol grado HPLC) al HPLC equipado con una columna analítica Water Nova Pak HR C<sub>18</sub>, 60 Å, 6  $\mu$ m, (3.9 X 300 mm), usando como fase móvil agua grado HPLC con un flujo de 0.5 ml/min. La muestra se analizó con un detector de UV a una longitud de onda de 250 nm.

En el cromatograma se puede observar un pico mayoritario con tiempo de retención (Rt) de 4.940 min, este pico se comparó con un estándar del compuesto fenólico simple (ácido protocatecuico, APC), inyectando al HPLC en las mismas condiciones que HSAE, se obtuvo un pico a un tiempo de retención (Rt) de 5.623 min con unidades arbitrarias de absorbencia superiores que el extracto. En base a estos resultados se elucidó que el APC puede estar presente en HSAE de una forma mayoritaria. Dado que el tiempo de retención resultó menor que el estándar, puede atribuírsele que se encuentra en una mezcla compleja de compuestos fitoquímicos. Asimismo el perfil cromatográfico de HSAE presentó varios picos con tiempos de retención entre 9 y 40 min, los cuales confirman la heterogeneidad de los compuestos presentes en el extracto.

Estos resultados, sugieren que para poder escrutar qué tipo de compuestos existen en HSAE se deberán elegir nuevas condiciones y diferentes eluyentes para de esta forma tener una buena resolución en cada uno de los picos, comparando siempre con estándares.

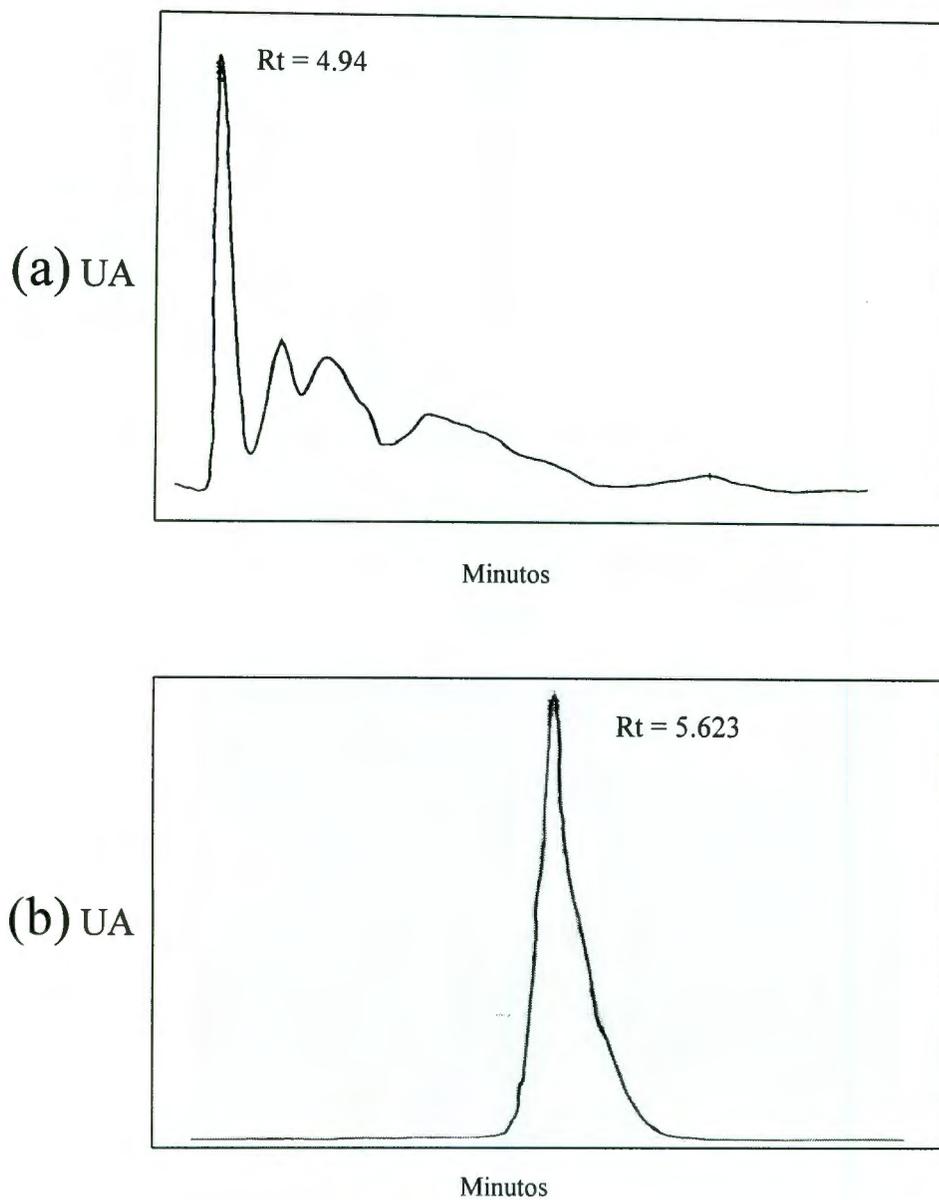


Figura 9. (a) Perfil cromatográfico del extracto HSAE de la flor de jamaica (*H. sabdariffa*) y (b) cromatograma del ácido protocatecuico, compuesto puro utilizado como estándar.

En una revisión realizada por Beecher *et al.* (1999), estos autores informan que una de las metodologías de mayor uso para la cuantificación de polifenoles totales, compuestos fitoquímicos parcialmente purificados, metabolitos excretados por bacterias y líneas celulares a sus medios de cultivo y muestras biológicas de humanos, es por medio de HPLC. Estos autores mencionan también que se han cuantificado flavonoides, teoflavinas, catequinas y quercetinas en extractos de té y muestras biológicas (plasma y orina de humanos), en comparación con otros métodos de cuantificación colorimétricos, las técnicas de HPLC presentan mayor sensibilidad. Escarpa *et al.* (1999) analizaron compuestos fenólicos de frutas por HPLC y sugieren como gradientes de elución mezclas de ácido fosfórico-metanol, así como ácido fosfórico-acetonitrilo para una separación completa de los polifenoles de interés. Tseng *et al.* (1998) mencionan que de la fracción soluble en acetato de etilo (HS-E) de *H. sabdariffa* aislaron por medio de técnicas de cromatografía en columna el compuesto fenólico simple ácido protocatecuico.

Los resultados obtenidos en esta investigación indican que el ensayo de microsuspensión es una herramienta útil para la detección de compuestos mutagénicos y antimutagénicos presentes en la dieta. Los compuestos fenólicos de los extractos HSEc y HSAE de flor de jamaica, así como el APC presentaron un potencial antimutagénico contra la mutagenicidad inducida por el 1-NP en la cepa YG1024, independientemente de las concentraciones evaluadas. Mediante el ensayo de microsuspensión con dos períodos de incubación, se sugiere que los posibles mecanismos de acción de los extractos y del APC podrían ser explicados por la combinación de los efectos extracelulares (acomplejamiento) e intracelulares (quimioprotección y reparación). Para el HSEc, el efecto mayoritario fue a nivel extracelular, mientras que para HSAE y el APC, el efecto de relevancia fue a nivel intracelular (quimioprotección).

## VIII. CONCLUSIONES

De la curva dosis-respuesta del 1-nitropireno (1-NP), las concentraciones de 4 y 8 ng/tubo fueron seleccionadas para evaluar la antimutagenicidad de los extractos de la flor de jamaica (*H. sabdariffa*), así como del ácido protocatecuico (APC) incluido como control positivo de antimutagénesis.

El contenido de compuestos fenólicos presentes en el extracto hidroalcohólico (HSEc) y de la fracción soluble en acetato de etilo (HSAE) fué de  $420.98 \pm 50.40$  y  $152.42 \pm 29.10$  mg equivalentes de ácido protocatecuico (APC) respectivamente por cada 20 g de flor seca de *H. sabdariffa*.

Los compuestos fenólicos presentes en el extracto hidroalcohólico (HSEc), la fracción soluble en acetato de etilo (HSAE) de *H. sabdariffa* (125, 250 y 500  $\mu\text{g}$ /tubo) y el APC (25, 50 125  $\mu\text{g}$ /tubo) no presentaron toxicidad ni mutagenicidad en la cepa YG1024 de *S. typhimurium* a las concentraciones evaluadas.

Los compuestos fenólicos presentes en los extracto hidroalcohólico (HSEc), la fracción soluble en acetato de etilo (HSAE) de *H. sabdariffa* y el ácido protocatecuico (APC) inhibieron parcialmente la mutagenicidad inducida por el 1-nitropireno (1-NP) en la cepa YG1024, independientemente de las concentraciones evaluadas.

Los resultados sugieren que los posibles mecanismos de acción de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de *H. sabdariffa* podrían ser explicados por la combinación de los efectos extracelulares (acomplejamiento) e intracelulares (quimioprotección y reparación). Para el HSEc, el efecto mayoritario fue a nivel extracelular (acomplejamiento), mientras que para HSAE y el APC el efecto de relevancia fue a nivel intracelular (quimioprotección).

## IX. PERSPECTIVAS

En el presente trabajo de investigación los compuestos fenólicos de extractos de la flor de jamaica (*H. sabdariffa*) presentaron un potencial antimutagénico contra la mutagenicidad inducida por el 1-nitropireno en la cepa de prueba YG1024 de *S. typhimurium*, independientemente de las concentraciones evaluadas mediante el bioensayo de microsuspensión. Asimismo, con dos períodos de incubación, se sugiere que los posibles mecanismos de acción de estos compuestos podrían ser explicados por la combinación de los efectos extracelulares (formación de un complejo que disminuye la biodisponibilidad del agente mutagénico) e intracelulares (quimioprotección y reparación).

Para poder precisar el y/o los posibles mecanismos de acción por el que los fitoelementos de los extractos de la flor de jamaica ejercen la inhibición de la mutagenicidad se deben considerar las siguiente propuestas:

1. Purificación parcial de los compuestos fenólicos mayoritarios presentes en el extracto crudo (HSEc) y la fracción soluble en acetato de etilo (HSAE).
2. La elucidación estructural de los compuestos fenólicos mayoritarios presentes en el extracto crudo y cada una de las fracciones.
3. Bioensayos de microsuspensión comparativos con cada una de las fracciones y compuestos químicos purificados contra diferentes agentes mutagénicos y cepas de prueba [dependientes e independientes de la activación metabólica (fracción S9)]. De esta forma evaluar si la inhibición de la mutagenicidad inducida esta dada por un conjunto de las actividades de los fitoconstituyentes que podrían ejercer interacciones antagónicas y/o sinérgicas, es decir que los compuestos pudiesen interactuar a diferentes niveles y estar confundiendo los efectos

Además de evaluar los compuestos químicos purificados *in vitro* como el bioensayo de microsuspensión, se debería evaluar en otros sistemas, por ejemplo su efecto en diversas líneas celulares y en cultivo de hepatocitos. Finalmente desarrollar experimentos *in vivo* por ejemplo, en ratones y ratas así de esta forma tener suficiente evidencia de la actividad de los principios activos purificados e identificados sobre diversos sistemas biológicos.

Los resultados que pudieran desprenderse de estas investigaciones, contribuirían de alguna manera en el tratamiento de diversas enfermedades crónico degenerativas y asimismo, abrir nuevas oportunidades de estudio con respecto a los efectos biológicos de los compuestos fenólicos o principios activos presentes en las plantas que permitan aclarar mejor los procesos de mutagenicidad y su inhibición, así como el papel que desempeñan en su modulación.

## X. BIBLIOGRAFIA

- Ali M.B., Salih W.N., Mohamed A.H. Homeida A.M. 1991. Investigation of the antispasmodic potential of Hibiscus sabdariffa calyces. *J Ethnopharmacol* 31(2): 249-257.
- Ames B.N., Cann J., Mc and Yamasaki E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *salmonella*/mamalian microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 31: 347-364.
- Argueta Villama A., Cano Asseleih LM., Rodarte M.E. 1994. Atlas de las Plantas Medicinales Mexicana. Instituto Nacional Indigena. *Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana* Tomo II. pp 849-850.
- Aorora A., Nair M.G., Strasburg G.M. 1998. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic Biol Med* 24(9): 1355-63.
- Ayrton A.D., Lewis D.F.V., Walker -R. and Ionannies C. 1992. Antimutagenicity of ellagic acid towards the food mutagen IQ: investigation into possible mechanisms of action. *Food and Chemistry Toxicology* 30: 289-295
- Bala S. and Grover I.S. 1989. Antimutagenicity of some citrus fruits in Salmonella typhimurium. *Mutat Res* 22(3): 141-8.
- Beecher G.R., Warden B.A., Merken H. 1999. Analysis of tea polyphenols. *Proc Soc Exp Biol Med* 22(4): 267-70.
- Beland F.A. 1999. How do Chemicals in Diesel Engine Exhaust Damage DNA?. The Health Effects Institute. <http://www.healtheffects.org/st46.html>
- Blot W.J., Chow W.H. and McLaughlin J.K. 1996. Tea and cancer: a review of the epidemiologic evidence. *Eur. J. Cancer Prevent* 5: 425-438.
- Bravo L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56(11): 317-33.
- Carmona A. 1996. Tannins: thermostable pigments which complex dietary proteins and inhibit digestive enzymes. *Arch Latinoam Nutr* 44 (4 Supple 1): 31S-35S.

- Chung, K.T. and Wei, Ch.I. 1997. Food tannins and human health: a doubl-edged sword? *Food Technology* 51(9): 124.
- Culhane C. 1995. Nutraceuticals/Functional Foods. International Food Focus Limited. For Agriculture and Agri-Food Canada. <http://www.foodnet.fic.ca/trends/enutr.html>.
- Croft K.D. 1998. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann N Y Acad Sci* 20;854: 435-42.
- Dashwood R.H., Xu M., Hernaez J.F. Hasaniya N., Youn K., Razzuk A. 1999. Cancer chemopreventive mechanisms of tea against hetrocyclic amine mutagens from cooked meat. *Proc soc Exp Biol Med* 220(4): 239-43.
- De flora S., Izzotty A. And Bennicelli, C. 1993. Mecahnism of antimutagenesis and anticarcinogenesis: role in primary prevention. Chap. Mechanistic apoproaches to antimutagenesis and anticarcinogenesis. *In Antimutagenesis and Anticarcinogenesis mechanisms III*. G. Bronzaetti, Hayatsu, H., S. De Flora, M.D. Water and D.M. Sgabjek (Eds), Plenun Press, New York and London. pp 39-45.
- Dipple A., Cheng S.C. and Bigger C.A. 1990. Polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogens. Inç: mutagens and carcinoges in the diet. M.W. Pariza J.S. Felton, H.U. Aeschbacher & S. Sato. Eds. Wiley-Liss Inc., New York. pp 109-127.
- Duke J.A. 1983. Hibiscus sabdariffa L. Handbook of Energy Crops. <http://www.hort.purdue.edu/newcorp/duke-energy/Hibisucus-sabdariffa.html>.
- Edenharder R., Speth C., Decker M., Kolodziej H., Kayser O., ad Platt K. L. 1996. Inhibition of mutagenesis of 2-amino-3-methylimidazo[4,5]quinoline (IQ) by coumarins and furanocoumarins, chromanones and furanochromanones. *Mutat Res* 345, 57-71.
- Edenharder R. and Tang X. 1997. Ihibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by flavonoids, coumarins quinones and other phenolic compounds. *Food Chem Toxicol* 35(3-4): 357-372.
- Edenharder R., Speth C., Decker M., Kolodzierj H., Kayser O. and Platt K.L. 1996. Inhibition of mutagenesis of 2-mino3-methylimidazo (4,5-f)quinoline (IQ) by coumarins and furanocoumarin, chromanones and furanochromanones. *Mutat Res* 345:57-71.

- Einistö P., Nohmi T., Watanabe M. and Inshidate M. 1990. Sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1024 to urine mutagenicity caused by cigarette smoking. *Mutat Res* 245: 87-92.
- El-Bayoumy K. 1992. Environmental carcinogens that may be involved in human breast cancer etiology. *Chemical Research in Toxicology* 5, 585-590.
- El-Bayoumy K., Jonhson B.E., Roy A.K., Upadhyaya P. and Partian S.J. 1999 The Health Effects Institute. <http://www.healtheffects.org/st64.html>
- Escalante Estrada Y.I. 1997(a). Contribución al conocimiento del cultivo de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en el Estado de Guerrero. Instituto de Investigación Científica. Ciencias Naturales. UAG. pp 77.
- Escalante Estrada Y.I. 1997(b). Descripción botánica y taxonómica de la variedad de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) que se siembra en la Costa Chica del Estado de Guerrero. Instituto de Investigación Científica. Ciencias Naturales. UAG. pp 76.
- Escarpa A. Gonzalez M.C. 1999. Fast separation of (poly)phenolic compounds from apples and pears by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *J Chromatogr A* 15; 839(2): 301-9.
- Espinosa-Aguirre J. J., Reyes R.E., Rubio J., Ostrosky-Wegman P., and Martinez G. 1993. Mutagenic activity of urban air samples and its modulation by chilli extracts. *Mutat Res* 303, 55-61.
- Fan D. 1998. What is a nutraceutical?. <http://www.vivanetwork.com/nutraceutical.htm>
- Ferguson L.R. 1994. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutat Res* 307: 395-410.
- Franke, W. 1997. Tannins article draw response. *Food Technology* 51(12): 168.
- Francis A.R., Shetty T.K. and Bhattacharya R. K. 1989. Modifyting role of dietary factors on the mutagenicity of aflatoxin B(1): in vitro effect of plant flavonoids. *Mutat Res* 222: 393-401.
- Fox E. 1998. Nutraceuticals 101. <http://www.lilligre.com/health/nutra101.htm>.

- Gallagher J.E., Jackson M., George G., and Lewtas J. 1990. Dose-related differences in DNA adduct levels in rodent tissues following skin application of complex mixtures from air pollution sources. *Carcinogenesis* 11: 63-68.
- Gary D., Stoner, PhD., and Hasan Mukhtar, PhD. 1995. Polyphenols as Cancer Chemopreventive Agents. *J Cell Bioch*, S 22: 169-180.
- Gibson, T.L. 1982. Nitroderivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne and source particulate matter. *Atmos Environ* 16, 2037-2040.
- González de Mejía E., Castaño-Tostado E. and Loarca-Piña G. 1999. Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans. *Mutat Res* 26: 1-9.
- González de Mejía E., Ramos-Gómez M. and Loarca-Piña G. 1997(a). Antimutagenic activity of natural xanthophylls against aflatoxin B(1) in *Salmonella typhimurium*. *Mutagenesis* 30: 346-353.
- González de Mejía E., Loarca-Piña G., Ramos-Gómez M. 1997(b). Antimutagenicity of xanthophylls present in Aztec Marigold (*Tagetes erecta*) against 1-nitropyrene. *Mutat Res* 389:219-226.
- González de Mejía E., Quintanar-Hernández J.A. and Loarca-Piña G. 1998. Antimutagenic activity of carotenoids in green peppers against some nitroarenes. *Mutat Res* 416: 11-19.
- Goodman G.E. 1993. Cancer prevention: chemoprevention vs dietary modifications. *Preventive Medical* 22(5): 689-692.
- Graham H.N. 1992. The polyphenols of tea biochemistry and significance -a review *Bulletin de Liason-Grupe Polyphenols* 16(2): 32-43.
- Grimmer H.R., Parbhoo E. and Mcgrath R.M. 1992. Antimutagenicity of polyphenol-rich fractions from *Shorghum bicolor* grain. *J. Sci Food Agric* 59: 251-256.
- Guzmán-Maldonado, S.H. and Paredes-López, O. 1998. Functional products of plants indigenous to Latin America: amaranth, quinoa, common beans, and botanicals. In *Functionals foods, biochemical and processing aspects*. Mazza, A. Ed Technomic Publishing Co., Inc Lancaster, PA- pp 293-328.
- Hagerman A.E., Robbins C.T., Weerasuryya Y., Wilson T.C., y McCarthur C. 1992. Tannin chemistry in relation to digestion. *J. Range Management* 45: 57-62.

- Hammons G.J., Fletcher J.V., Stepps K.R. Smith E.A. Balentine D.A. Harbowy M.E. Kadlubar F.F. 1999. Effects of chemoprotective agents on the metabolic activation of the carcinogenic arylamines PhIP and 4-aminobiphenyl in human and rat liver microsomes. *Nutr Cancer* 33(1): 46-52.
- Heacht S.S. and El-Baoumy K. 1990. The possible role of nitroarenes in human cancer. In *The Occurrence Metabolism, and Biological Impact of Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Edited by P.C Howard, S.S. Heacht and F.A. Beland. 309-316. Plenum Press, New York. pp 555-578.
- Hergot M.G., Feskens E.J., Hollman P.C., Katan M.B., and Kromhout D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and the risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet* 342: 1007-1011.
- Ho C. 1992. Phenolic compounds in food. Chap. 1, *In Phenolic Compounds in Food and their Effects on Health I. Analysis Occurrence & Chemistry*, C. Ho, CY. Lee and M. Huang (Eds) American Chemical Society, Washington, DC. pp 2-7.
- Hollman P.C., and Katan M.B. 1997. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Abiomed Pharmacolther* 51(8): 305-10.
- Horikawa K: Sera N., Otofujii T., Murakawi K., Tokiwa H., Iwagawa M., Izumi K. and Otsuka H. 1991. Pulmonary carcinogenicity of 3,9 and 3,7-dinitrofluoranthene, 3-nitrofluoranthene and benzo[a]pirene in F344 rats. *Carcinogenesis* 12, 1003-1007.
- Howard P.C. and Beland F.A. 1999. Interactive effects of nitropyrene in diesel exhaust. The Health Effects Institute. <http://www.healtheffects.org/st66.html>
- Huang M. and Ferraro T. 1992. Phenolic compounds in food cancer prevention. Chap 2, *In phenolic compounds in food and their effects on Health II. Antioxidants & Cancer Prevention*, Huang MC. Ho and CY. Lee, (Eds), American Chemical Society, Washington DC. pp 8-34.
- IARC. 1989. Monograph on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans 33: 209-222.
- Ioannides C., Aytron A.D., Keele A., Lewis D.F.V., Flatt P. R., and Walker. 1990. Mechanism of the in vitro antimutagenic action of retinol. *Mutagenesis* 5, 257-262.

- Ishidate M.J. 1991. Regulatory aspects of food mutagens including food additives and contaminants. In: *Mutagens in food: Detection and prevention*. Hikoya Haytsu (Eds), *CRC Press, Inc* pp 259-270.
- Jonadet M., Bastide J., Bastide P., Bayer B., Carnat A.P., Lamaison J.L. 1990. In vitro enzyme inhibitory and in vivo cardioprotective activities of hibiscus. *J Pharm Belg* 45(2): 120-124.
- Kado N.Y., Langley D. and Eisenstadt, E. 1983. A simple modification of the Salmonella liquid incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutat Res* 121: 25-32.
- Kado N.Y., Guirguis G.N., Fleseel C.P., Chan R.C., Chang K. And Wselowski, J.J. 1986. Mutagenicity of fine (<2.5 microm) airborne particles: diurnal variation in community air determined by a Salmonella micro preincubation (Microsuspension) procedure. *Environment Mutagenesis* 8: 53-66.
- Kaur S., Grover I.S., Singh J. Kaur S. 1998. Antimutagenicity of hydrolyzable tannins from terminalia chebula in Salmonella typhimurium. *Mutat Res* 9; 419(1-3): 169-79.
- Kelloff G.J., Boone C.Q, Crowell J.A, Steele V.E., Lubet R., Sigman C.C. 1994. Chemopreventive drug development: Prospectives and progress. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3: 85-98.
- King L.C. and Lewtas J. 1993. An evaluation of the comparative metabolism and kinetics of 1-nitropyrene by rabbit, rat and hamster tracheal epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 122: 149-158.
- Kinouchi T., Tsutsui, H, and Ohnishi Y. 1986. Detection of 1-Nitropyrene in yakitori (grilled chicken). *Mutat Res* 171: 105.
- Kinsella J.E., Frankel E., German B. and Kanner J. 1993. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology* 4: 85-89.
- Kirdpon S., Nakorn S.N., Kirdpon W. 1994. Changes in urinary chemical composition in healthy volunteers after consuming roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn) juice. *J Med Assoc Thai* 77(6): 314-321.
- Kuo S.M. 1997. Dietary flavonoid and cancer prevention: evidence and potential mechanism. *Crit Rev Oncog* 8(1): 47-69.

- Kuo M.L., Lee K.C. and Lin L.K. 1992. Genotoxicities of nitropyrenes and their modulation by apigenin, tannic acid, ellagic acid and indole-3-carbinol in the Salmonella and CHO systems. *Mutat Res* 270, 87-95.
- Kuroda Y., Hara Y. 1999. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutat Res* 436 (1): 69-97.
- Leighton T., Ginther C., Fluss L., Harter W.K., Cansado J. and Notario V. 1992. Molecular characterization of quercetin and quercetin glycosides in Allium vegetable. Chap. 16, *In Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II. Antioxidants & Cancer Prevention*, M. Huang, C. Ho and C.Y. Lee (Eds) American Chemical Society, Washington., D.C. pp 220-238.
- Lee L.S., Chang E.U., Rhim J.W. Ko B.S. and Choi S.W. 1997. Isolation and identification of anthocyanins from purple sweet potatoes *J. Food Sci. Nutr* 2(2): 83-88.
- Leon J. 1968. Fundamentos Botánicos de los Cultivos tropicales. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A., Costa Rica. pp 163-164.
- Loarca-Piña G., Kuzmicky P.A., Gonzalez de Mejía E. Kado N.Y. 1998. Inhibitory effects of ellagic acid on the direct-acting mutagenicity of aflatoxin B1 in the Salmonella microsuspension assay. *Mutat Res* 26; 398(1-2): 183-187.
- Loarca-Piña G., Kuzmicky P.A., González de Mejía E., Kado N.Y. and Hsieh D.P.H. 1996. Antimutagenicity of ellagic acid against aflatoxin B(1) in the Salmonella microsuspension assay. *Mutat Res* 360: 15-21.
- Maher V.M., Bhattacharyya N.P., Mah C.M., Boldt J., Yang J.L. and McCormick J.J. 1999. Relationship of nitropyrene-derived DNA adducts to carcinogenesis. The Health Effects Institute. <http://www.healtheffects.org/st55.html>.
- Mathee G., Wright A.D. König G.M. 1999. HIV reverse transcriptase inhibitors of natural origin. *Planta Med* 65(6): 493-506.
- Maron D. and Ames B.N. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 113: 173-215.
- McCoy, E.C., Anders M., Rosenkranz H.S. 1983. The basis of the insensitivity of *Salmonella typhimurium* strain TA98/1,8-DNP6 to the mutagenic action of nitroarenes. *Mutat Res* 263: 41-46.

- Miller N.J., Castelluccio C., Tijburg L., and Rice-Evans C. 1996. The antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters-radicals scavengers or metal chelators? *FEBS Lett* 392: 40-40.
- Morel I., Lescoat G., Cogrel P., Sergent O., Padeloup N., Brissot P., Cillard P., and Cilliard J. 1993. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem. Pharmacol.* 45: 13-19.
- Möller L., Lax I., Torndal U. -B. And Eriksson L. C. 1993. Risk assessment of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Risk Analysis* 13, 291-299.
- Montgomery, D.C. 1991. Diseño y Analisis de Experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica, México, pp. 60.
- Morse M.A, and Stoner G.D. 1993. Cancer chemoprevention: principles and prospects. *Carcinogenesis* 14: 1737-1746.
- Morton J.F. 1987. Roselle. *Hibiscus sabdariffa* L. Fruits of warw climates. 281-286. [wysiwyg://25/http://www.hort.purdue.edu/newcorp/morton/roselle.html](http://www.hort.purdue.edu/newcorp/morton/roselle.html)
- Müller B.M., Franz G. 1992. Chemical structure and biological activity of polysaccharides from *Hibiscus sabdariffa*. *Planta Medical* 58(1): 60-67.
- Pouget M.P., Vannat B. Lejeune B., Pourrat A. 1990. Identification of anthocyanins of *Hibiscus sabdariffa* L. *Lebensmittel-Wissenschaft-und-Technologie* 23(2) 101-102.
- Pszczola D.E. 1998. Products & Technologies Ingreditens. Antioxidants take center stage. *Food Technology* 52(5) 140-153.
- Randerath K., Putman K.L., Mauderly J.L., Williams P., and Randerath R. 1995. Pulmonary toxicity of inhaled diesel exhaust and carbon black in chronically exposed rats Part II: Diesel exhaust and DNA damage. Health Effects Institute Research Report. Cambridge, M.A.
- Robertfroid M.B. 1996. Functional effects of food components and the gastrointestinal system: chicory fructooligosaccharides. *Nutr Rev* 54(11): 538-542.
- Rosser P.F., Ramachandran P., Sangaiah R., Austin R.N., Gold, A., and Ball L.M. 1996. Role of O-acetyltransferase in activation of oxidised metabolites of the genotoxic environmental pollutant 1-nitropyrene. *Mutat Res* (369 ) 209-220.

- Rosenkranz H.S., McCoy E.C., Sanders D.R., Butler D.R., Ririadzides and Mermelstein R. 1980. Nitropyrenes: isolation, identification and reduction of mutagenic impurities in carbon black and toners, *Science* 209, 1039-1043.
- Salah N., Miller N., Paganga G., Tijburg L., Bolwell G.P. and Rice-Evans C. 1995. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* 322: 339-346.
- San R.H.C., and Chan R.I.M. 1987. Inhibitory effects of phenolic compounds on aflatoxin B(1) metabolism and induced mutagenesis, *Mutat Res* 244: 185-188
- Shelef L.A. and Chin B. 1980. Effect of phenolic antioxidants on the mutagenicity of aflatoxin (B)1, *Applied and Environmental Microbiology* 40(6): 1039-1046.
- Scheepers P.T.J., Thewus J.L.G., and Bos R.P. 1991. Mutagenicity of urine from rats after 1-nitropyrene and 2-nitrofluorene administration using new sensitive *Salmonella typhimurium* strains YG 1012 and YG 1024. *Mutat Res* 260:393-399.
- Smith B.A., Fullerton N.F., Heflich R.H., Beland F.A. 1995. DNA adduct formation and T-lymphocyte mutation induction in F344 rats implanted with tumorigenic doses of 1,6-dinitropyrene. *Cancer Res* 55, 2316-2324.
- Spanos G.A. and Wrolstad R.E. 1992. Phenolic of apple, pear and white grape juices and their changes with processing and storage -a review. *J. Agric. Food Chem* 40, 1478-1487.
- Smith B.A., Fullerton N.F., Heflich R.H., Beland F.A. 1995. DNA adducts formation and T-lymphocyte mutation induction in F344 rats implanted with tumorigenic doses of 1,6-Dinitropyrene. *Cancer Res* 55, 2316-2324.
- Stacey N. 1999. DNA adducts from polyaromatic hydrocarbon.  
<http://www.worksafe.gov.au/worksafe/pamphlet/d/004000.html>.
- Stavric B. 1994. Antimutagens and anticarcinogens in foods. *Food of Chemical Toxicology* 32: 79-90.
- Stoner G.D., Mukhjar H. 1995. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *J. Cell Biochem Suppl* 22: 169-80.

- Tang X. and Edenharder R. 1997. Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by vitamins, porphyrins and related compounds, and vegetable and fruit juices and solvent extracts. *Food Chem toxicol* 35(3-4): 373-378.
- Tanaka T., Yojima T., Kawamori T., Mori H. 1995. Chemopreventive of digestive organs carcinogenesis by natural product protocatechuic acid. *Cancer supplement* 75(6): 1433-9.
- Tachino N.D., Gou W.M. Dashwood S. Yamane R. Larsen and R. Dashwood. 1994. Mechanisms of the in vitro antimutagenic action of chlorophyllin against benzo[a]pyrene: Studies of enzyme inhibition molecular complex formation and segregation of the ultimate carcinogen. *Mutat Res* 308. 191-203.
- Thomas P.R. Earls R. 1994. Enhancing the food supply. In Opportunities in the Nutrition and Food Sciences. Washington D.C. *National Academy Press* 98-142
- Tokiwa H. Nakagawa R. and Horikawa K. 1985. Mutagenic/carcinogenic agents in indoor pollutants, the dinitropyrenes generated by kerosene heaters and fuel gas and liquefied petroleum gas burners. *Mutat Res* 157, 39-47.
- Tseng T.H., Hsu J.D., Lo M.H., Chu C.Y., Chou F.P., Huang C.L., Wang C.J. 1998. Inhibitory effect of Hibiscus protocatechuic acid on tumor promotion in mouse skin. *Cancer Letters* 126:199-207.
- Tseng T.H., Wang C.J., Kao E.S., and Chu H.Y. 1996. Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chemico Biological Interactions* 101: 137-148.
- Tseng T.H., Kao E.S., Chu C.Y., Chou F.P., Lin W.H., and Wang C.J. 1997. Protective effects of dried flower extracts of Hibiscus sabdariffa L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology* 35:1159-1164.
- van Acker S.A., van den Berg D.J., Tromp M.N., Griffioen D.H., van Bennekom W.P., van der Vijgh W.J. and Bast A. 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad Biol Med* 20: 331-342
- van der Hoeven, N., Kooijman, S.A., and de Raat W.K. 1990. Salmonella test: relation between mutagenicity and number of revertant colonies. *Mutat Res* 234: 289-302
- Wall M.E. Wani M.C., Hughes T.J. and Taylor H. 1990. Plant antimutagens. *Basic Life Science* 52, 61-79

- Walters, M.D. Brany A.L., Stack H.F. and Brockman H.E. 1990. Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutat Res* 238: 57-85.
- Watanabe, M. Motoi I., and Nohmi R. 1990. Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of *Salmonella thyphimurium* tester strains possessing elevated O-acetyltransferase levels. *Mutat Res* 234: 337-348.
- Watanabe M., Sofuni T. and Nohmi T. 1993. Comparison of the sensitivity of *Salmonella thyphimurium* strains YG1024 and YG1012 for detecting the mutagenicity of aromatic amines and nitroarenes. *Mutat Res* 301: 7-12.
- Weisburger J.H. 1999. Tea and health: the underlying mechanisms. *Proc Soc Exp Biol Med* 220(4): 271-5.
- Weisburger J.H., Hara Y., Dolan L., Luo. F.Q., Pittman B., Zang E. 1996. Tea polyphenols as inhibitors of mutagenicity of major classes of carcinogens. *Mutat Res* 4:371 (1-2): 57-63.
- Wild-Oats. 1998. Nutrition Glossary-NS. <http://www.wildoats.com/know/glossary/n.html>.
- Wiseman H. 1999. The bioavailability of non-nutrient plant factors: dietary flavonoids and phyto-oestrogens. *Proc Nutr Soc* 58(1): 139-46.
- Wiseman S.A., Balentine D.A. and Frei B. 1997. Antioxidants in Tea. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 37(8): 705-718.
- Zammer C.M. 1995. Gun puffed vegetable snacks: a new way to eat your veggies. *Food Technology* 49(10): 64-65.