



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN

“EFECTO DEL LICOPENO SOBRE LA GENOTOXICIDAD Y
CITOTOXICIDAD DEL BENZO(a)PIRENO MEDIANTE LA
TÉCNICA DE MICRONÚCLEOS EN RATÓN CD1+.”

T E S I S

Que para obtener el título de

Licenciada en Nutrición

P R E S E N T A

LAURA GARCÍA SEGURA

Bajo la Dirección de:
Dra. Raquel Cariño Cortés

Codirector:
Dr. Eduardo Osiris Madrigal Santillán.



Pachuca, Hgo., febrero 2010.

El presente trabajo se realizó en los laboratorios del Área Académica de la Licenciatura en Nutrición, Farmacia, Medicina, así como en el Bioterio del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, en el Área de Ciencias Ambientales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional y en el Instituto de Investigación Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por apoyarme siempre, por ser el ejemplo de mi vida y la base de mis logros. **Los amo.**

A la Dra. Raquel Cariño Cortés, por su paciencia, apoyo y cariño; por compartir sus conocimientos, por sus consejos y su grandiosa forma de ser. Mi admiración y respeto.

Al Dr. Jorge Mendoza Pérez, por su disposición para ayudarnos, por su paciencia, por compartir sus conocimientos con nosotros sin los cuales no hubieramos podido concluir esta investigación y por su amistad. Mil gracias.

Al Dr. Eduardo Osiris Madrigal, por su apoyo para la realización y revisión de este trabajo.

Al M. en C. Omar Ríos Verny, al Dr. Sergio Odin del Instituto Politécnico Nacional y al Dr. Rafael Herrera Busio de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por su disposición y apoyo para la realización de las pruebas de identificación de licopeno sin las cuales no hubiera sido posible terminar la investigación.

Al personal de laboratorios y del bioterio, Dr. Ramón, Alex, Paty, Bárbara, Quím. Cerón, Héctor y Sr. Manuel, por su disposición y amabilidad durante mi estancia en la fase experimental de esta investigación.

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, por permitirme realizar mis estudios de Licenciatura en sus instalaciones.

Pero principalmente a Dios, por darme la vida y la oportunidad de encontrarme con tantas personas tan especiales que han hecho que mi camino sea más ligero.

DEDICATORIAS

A mi familia , por estar siempre a mi lado, por apoyarme en mis proyectos y alentarme a terminar cada uno de ellos. A mis padres por todo el esfuerzo que han hecho para que a mis hermanas y a mi nunca nos falte nada. Mil gracias. A mis hermanas Verónica y Maribel, por su amor, su compañía, sus consejos y palabras de aliento que siempre me dieron cuando lo necesité. En verdad LOS AMO.

Amis amigos, Josué, Faby, Elena, Ibeth, Hugo, Ruby, Nery, Mariana por estar siempre a mi lado, por su buen humor, por los momentos de estudio, trabajo, diversión y fiesta, sin cuya compañía y ánimo nunca hubiera terminado este trabajo.

A mis compañeras y ahora amigas , que conocí durante la elaboración de la tesis, Maricela, Anita, Lore y todos los que estuvieron animándome durante el tiempo que pase en la universidad.

Y a Alejandro Meneses, amigo que partió antes de ver terminado este trabajo, gracias por tu grandiosa forma de ser, por tener siempre una sonrisa para todos aunque por dentro te sintieras mal. Que Dios te bendiga donde quiera que estés.

ÍNDICE

1. RESUMEN	10
2. ABSTRACT	12
3. MARCO TEÓRICO	14
3.1. CAROTENOIDES Y LICOPENO	15
3.2. QUIMIOPREVENCIÓN	16
3.3. ANTECEDENTES EXPERIMENTALES DE LA OLEORRESINA DEL JITOMATE	17
3.4. BENZO(A)PIRENO	18
3.6. TÉCNICAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LICOPENO.	21
3.6.1. <i>Espectrofotometría infrarroja</i>	21
3.6.2. <i>Espectrofotometria de Uv-Vis</i>	21
3.6.3. <i>Espectrofotometría de fluorescencia</i>	22
3.6.4. <i>Espectrofotometría de masas</i>	22
3.6.5. <i>Cromatografía de gases</i>	22
3.6.6. <i>Resonancia magnética nuclear de Hidrógeno (RMNH)</i>	23
3.7. EVALUACIÓN GENOTÓXICA Y ANTIGENOTÓXICA	23
3.8. PRUEBA DE MICRONÚCLEOS	24
4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	25
5. JUSTIFICACIÓN	26
6. TIPO DE ESTUDIO	26
7. OBJETIVOS	26
7.1. OBJETIVO GENERAL	26
7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
8. HIPÓTESIS	27
9. DISEÑO EXPERIMENTAL GENERAL	28
10. METODOLOGÍA	30
10.1. ANIMALES, REACTIVOS Y EQUIPO	30
10.2. EXTRACCIÓN DEL LICOPENO.	31
10.3. IDENTIFICACIÓN DE LICOPENO	32
10.4. CUANTIFICACIÓN DEL LICOPENO	32
10.5. EVALUACIÓN GENOTÓXICA Y CITOTÓXICA DE LA OLEORRESINA DEL JITOMATE(LICOPENO)	33
10.6. POTENCIAL ANTEGENOTÓXICO Y ANTICITOTÓXICO DE LA OLEORRESINA DEL JITOMATE (LICOPENO)	33
10.6.1. <i>Organización de grupos experimentales</i>	34
10.6.2. <i>Toma de muestras</i>	34
10.6.3. <i>Análisis estadístico</i>	35
11. RESULTADOS	36
11.1. GRÁFICAS DE IDENTIFICACIÓN DE LICOPENO.	36
11.2. EVALUACIÓN GENOTÓXICA Y CITOTÓXICA	41
11.3. EVALUACIÓN ANTIGENOTÓXICA	43
12. DISCUSIÓN	46

13. CONCLUSIONES	52
14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXOS	58

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Estructura de licopeno.	14
Figura 2. Estructura química del benzo(a)pireno.	19
Figura 3. Biotransformación del B(a)P.	20
Figura 4. Formación de micronúcleos.	25
Figura 5. Esquema general de trabajo.	29
Figura 6. Curva experimental donde se muestra la presencia de licopeno asociado a las mediciones de absorbancia con un espectrofotómetro (Estrechamiento C-H, doble enlace conjugado: $3,000\text{ cm}^{-1}$) (Silverstein, 1991).	36
Figura 7. Curva experimental donde se muestra la presencia de licopeno asociado a las mediciones de barrido con espectrofotometría de UV-Vis.	37
Figura 8. Curva experimental donde se muestra la presencia de licopeno a una longitud de onda de 3000 nm asociado a las mediciones de absorbancia con un espectrofotómetro de fluorescencia.	38
Figura 9. Espectro de tándem iónico del Ion radical m/z 536.43 del licopeno con el modo NICl (ionización química del Ion negativo) y el pico base a m/z 467.40.	39
Figura 10. Gráfica experimental que muestra la presencia de licopeno por la técnica de Cromatografía de gases.	40
Figura 11. Espectro de RMN- ^1H (protón) utilizando CDCl_3 (cloroformo deuterado) como disolvente. Se observa a campo alto las señales de metilos y a campo bajo los grupos conjugados.	40
Figura 12. Evaluación de la genotoxicidad de la oleorresina del jitomate (licopeno) en sangre periférica de ratones CD1+.	41
Figura 13. Evaluación de la citotoxicidad de la oleorresina del jitomate (licopeno) en sangre periférica de ratones CD1+.	42
Figura 14. Evaluación de la antigenotoxicidad de la oleorresina del jitomate	43

(licopeno) en sangre periférica de ratones CD1+.	
Figura 15. Evaluación de la anticitotoxicidad de la oleorresina del jitomate (licopeno) en sangre periférica de ratones CD1+.	44
Figura 16. Jitomate y jugo.	62
Figura 17. Secado de la pulpa de jitomate.	62
Figura 18. Secado de la pulpa de jitomate.	62
Figura 19. Extracción Soxhlet.	62
Figura 20. Hexano.	63
Figura 21. Evaporación del hexano.	63
Figura 22. Administración de la oleorresina.	63
Figura 23. Elaboración de frotis sanguíneo.	63
Figura 24. Tinción de los frotis.	64
Figura 25. Eritrocito normocrómico micronucleado.	64
Tabla 1. Distribución de grupos experimentales de antigenotoxicidad y anticitotoxicidad de la oleorresina del jitomate.	34
Tabla 2.- Contenido de licopeno en los principales alimentos que contribuyen a su ingesta en la dieta.	58
Tabla 3.- Contribución del tomate y sus productos procesados a la ingesta de licopeno en la dieta. (Adaptado de NGUYEN y SCHWARTZ 1999).	58

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
B(a)P	Benzo(a)pireno
CDCI₃	Cloroformo deuterado
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
ENC	Eritrocitos normocrómicos
ENCMN	Eritrocitos Normocrómicos Micronucleados
EPC	Eritrocitos Policromáticos
EPCMN	Eritrocitos Policromáticos Micronucleados
FAO	Food and Agriculture Organization
HAP	Hidrocarburo Aromático Policíclico
HgCl₂	Cloruro de mercurio
IPCS	Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas
IR	Radiación Infrarroja
KOH	Hidróxido de potasio
MN	Micronúcleos
NICI	Ionización química del Ión negativo
OMS	Organización Mundial de la Salud
RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
SCF	Comité Científico de la Comisión Europea sobre Alimentación Humana
Uv-vis	Ultravioleta visible

1. RESUMEN

El benzo(a)pireno (B(a)P) es un hidrocarburo aromático policíclico (HAP) cuyos efectos deletéreos sobre el material genético son un factor que contribuye al incremento de mutaciones y al desarrollo de cáncer de vías respiratorias y gastrointestinales en el humano.

La quimiopreención con fitoquímicos contenidos en alimentos constituye una alternativa terapéutica contra los daños provocados por B(a)P, entre estos se encuentra el licopeno, principal caroteno que aporta coloración rojiza o anaranjada a diversos vegetales. La mayoría de los antecedentes indican que tiene actividad antioxidante y antitumoral en diferentes modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*, sin embargo, hasta el momento no hay información respecto a su efecto sobre la estabilidad del material genético de células hemáticas o su capacidad quimioprotectora contra el daño producido por el B(a)P en un modelo *in vivo*. Por lo que este estudio propone la obtención, identificación y la evaluación del efecto de la oleoresina del jitomate (licopeno) sobre la genotoxicidad del B(a)P mediante la prueba de micronúcleos. Para lo cual, se realizó la siguiente metodología: Inicialmente se extrajo la oleoresina del jitomate a través de un equipo Soxhlet utilizando hexano como medio de arrastre; para su identificación se utilizaron técnicas de cromatografía de gases, espectroscopía de infrarrojo, resonancia magnética nuclear de hidrógeno, espectrofotometría de fluorescencia y barrido con espectrofotometría de UV-Vis. Posteriormente, se procedió a la evaluación antigenotóxica en un modelo subcrónico, mediante la administración a cinco lotes conformados por siete animales cada uno de la siguiente manera: tres lotes administrados con la oleoresina (3, 10 y 30 mg/kg) más el mutágeno (200 mg/kg); un lote control (aceite de maíz) y un grupo de animales administrado solo con B(a)P en la dosis ya mencionada. La quimioprotección del caroteno se evaluó mediante extracción de sangre y elaboración de un frotis sanguíneo cada 24 horas durante 3 semanas, siendo la primera semana de tratamiento y las posteriores de recuperación. Posteriormente, se realizó la tinción y cuantificación de micronúcleos en células normocrómicas como medida de genotoxicidad y antigenotoxicidad asimismo se determinó la relación de eritrocitos policromáticos con respecto a los normocrómicos como indicativo de citotoxicidad. Finalmente,

los datos obtenidos se analizaron mediante las pruebas de ANOVA y la comparación múltiple de Tukey Kramer en el programa Sigma-Stat ver 2.03.

Palabras clave: Licopeno, benzo(a)pireno, micronúcleos, antioxidante, genotóxico, citotóxico.

2. ABSTRACT

Benzo (a) pyrene (B (a) P) is a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) which deleterious effects on genetic material are a factor that contributes to the increase of mutations and to the development of lung and gastrointestinal cancer due to its high risk of genotoxicity in human beings.

Chemoprevention by using phytochemicals contained in food is a therapeutic alternative against damages caused by such agent. Included in these is lycopene, the principal carotenoid that gives the redish or orange color to different vegetables. Evidence found so far indicates that this has antioxidant and antitumor activity in different experimental models *in vitro*, as well as *in vivo*. However, there is no information regarding its effect on DNA stability in blood cells and its chemopreventive effect against damage produced by benzo (a) P in a model that evaluates the genotoxicity and cytotoxicity *in vivo*. Because of this, the present study proposes the collection, identification and evaluation of the effect of tomato oleoresin over B (a) P genotoxicity by using the micronucleus test in CD1+ mice. In order to achieve this, the following methodology is proposed: as a first step, the extraction oleoresin of lycopene through soxhlet equipment using hexane as a means of dragging was performed. For identification purposes, thin layer chromatography, gas chromatography infrared spectroscopy, hydrogen nuclear magnetic resonance and UV fluorescence spectrophotometry techniques were used. After this, the antigenotoxic evaluation was performed in a subchronic model using five groups of animals with seven animals per group, as follows: three los were administered tomato oleoresin (3, 30 and 100mg/kg; B (a) P (200 mg/kg), another group was administered corn syrup as a control group and lycopene in the highest dose (100 mg/kg). Toxicity was assessed by drawing blood every 24 hours for 2 weeks, being the first week for treatment and the second week for recovery. After this, staining and counting of micronucleous in normocromatic cells was performed as a measure for genotoxicity and the relation of policromatic and normocromatic erythrocytes, as indicative of toxicity in cells. Finally, the data was analyzed using a Sigma-Stat 2.03, using variance analysis (ANOVA) and Turkey-Kramer test for comparing measurements.

Key words: lycopene, benzo (a) pyrene, micronucleous, antioxidant, genotoxic, citotoxic.

3. MARCO TEÓRICO

Los agentes químicos ambientales, incluyendo los factores dietéticos influyen de manera considerable en la aparición de distintos tipos de cáncer, siendo éste la tercera causa de morbi-mortalidad a nivel mundial y nacional y considerado uno de los mayores problemas de salud pública en nuestro país (1).

El cáncer es una alteración en el proceso básico de crecimiento celular, comienza por formar masas (neoplasia) que invaden tejidos vecinos y que puede alcanzar lugares distantes al punto de origen (metástasis), su etiología es multifactorial, sin embargo la principal causa es la mutación cromosómica y génica; estas mutaciones afectan las principales funciones celulares responsables de la proliferación y el desarrollo de los organismos vivos. Estas alteraciones se presentan en dos tipos de genes, los protooncogenes, que al mutar producen la oncogénesis y con esto el desarrollo de cambios malignos en la célula; y los genes supresores que impiden el desarrollo del tumor regulando los genes participantes en el desarrollo celular (2).

La mortalidad por cáncer ha aumentado considerablemente en el mundo, en hombres es mayor que en mujeres debido a que los cánceres más frecuentes en las mujeres tienen un mejor pronóstico ya que si se diagnostican oportunamente son curables (mama y cérvix). Los tipos de cáncer que afectan con más frecuencia a los hombres son el de pulmón, próstata, estómago y el colorrectal. Afortunadamente la mayoría de las neoplasias pueden prevenirse, los cánceres con mejor pronóstico (con más del 70% de supervivencia) son los de próstata, mama y útero, y entre los de menor pronóstico (con menos del 20% de supervivencia) se pueden mencionar los de pulmón, esófago, estómago e hígado (3).

Entre los carcinógenos químicos encontramos al B(a)P (componente esencial del tabaco) que es capaz de producir cáncer de páncreas, cérvix, vejiga, mama, esófago y tracto respiratorio (oral, faringe y pulmón) (3).

El cáncer de pulmón es el más frecuente en el mundo, con aproximadamente 1 millón 400 mil nuevos casos al año representando el 16.6% de todos los tumores en hombres y el 7.6% entre las mujeres. Del 2000 al 2007 la principal causa de

mortalidad por neoplasia fue la presencia de tumores malignos de tráquea, bronquios y pulmón (3).

En la actualidad no existe un tratamiento ideal para el cáncer, ya que una vez que se presenta la neoplasia se utiliza la quimioterapia como tratamiento principal, desafortunadamente este tratamiento tiene efectos colaterales que afectan al paciente por lo que una alternativa para la prevención de esta enfermedad es el consumo de alimentos ricos en antioxidantes tales como el jitomate, una fuente importante de licopeno, un agente natural capaz de inactivar a los radicales libres. (3)

3.1. Carotenoides y licopeno

Los carotenoides son los pigmentos más distribuidos en la naturaleza y según la coloración que aporten se clasifican en carotenos o xantofilas.

Las xantofilas denotan la coloración amarillenta y actúan como protectores frente a la radiación solar; dentro de este grupo se puede mencionar a la Zeaxantina, luteína y capsantina. Los carotenos se encuentran hidrocarbonados, aportan una coloración rojiza o anaranjada y son los principales precursores de la vitamina A; dentro de éstos se encuentra el α -caroteno, el β -caroteno y el licopeno (4).

El término licopeno proviene del nombre científico del jitomate (*Lycopersicum esculentum*) fruto del cual fue aislado. Este caroteno es acíclico y de estructura sencilla con una cadena alifática de 40 átomos de carbono, altamente lipofílico y que posee un gran número de dobles enlaces conjugados (Fig. 1) (4, 5).

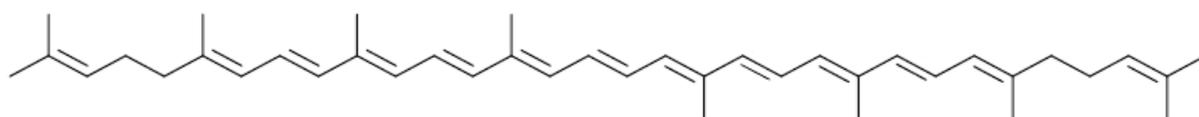


Figura1. Estructura del Licopeno.

Generalmente el licopeno se encuentra contenido en una oleorresina, la cual es producto originado de la extracción por disolventes. Su aspecto es de un aceite viscoso, de coloración variable que depende del vegetal del que se extraiga (verde, roja o marrón oscuro). El proceso para obtener la oleorresina incluye

troceado, secado, y extracción sólido – líquido, mediante la destilación por arrastre de vapor (4).

Los alimentos que contienen este caroteno son los que presentan colores rojizos o anaranjados intensos como la papaya, la sandía y el jitomate siendo este último el alimento que lo contiene en mayor cantidad cuando está completamente maduro (arriba del 80%), también se encuentra en los subproductos de éste (Salsas, jugo, pizza, jitomate frito, etc.) (6,7).

El licopeno se considera un antioxidante debido a que impide la oxidación de sustancias químicas, ocasionadas en las reacciones metabólicas o producidas por factores exógenos, en otras palabras, el licopeno es un nutriente con propiedades antioxidantes porque es capaz de neutralizar la acción oxidante de la molécula inestable de un radical libre sin perder su propia estabilidad electroquímica (8).

Este antioxidante del jitomate ha sido reconocido como uno de los más importantes presentes en el plasma y tejidos del organismo. Los lípidos juegan un papel importante en la disolución de los carotenoides y su absorción en el estómago y duodeno, como resultado de la acción de las sales biliares y lipasas pancreáticas, el licopeno ingresa al duodeno y forma vesículas lipídicas que son transferidos a la célula mediante difusión pasiva. En los humanos, los principales sitios de almacenamiento de carotenoides son el tejido adiposo y el hígado, además de una gran concentración en glándulas suprarrenales y en los testículos (4). Por tal motivo se ha planteado su posible acción quimiopreventiva efectiva en dichos tejidos.

3.2. Quimiopreención

La quimiopreención se refiere a la utilización de sustancias químicas, naturales o sintéticas que ayuden a revertir, detener o prevenir el proceso carcinogénico. Por lo tanto, pueden actuar en diferentes fases del proceso (iniciación, promoción o progresión). Dentro de las sustancias fitoquímicas encontradas en los alimentos destacan las vitaminas C, E y A; así como el selenio por su capacidad antioxidante (9). Distintos compuestos de familias químicas como las vitaminas, iones metálicos, tocoferoles, proteínas entre otros han demostrado que poseen actividad antimutagénica. Además, se ha observado que los agentes químicos

ambientales presentan un importante riesgo en la aparición y desarrollo del cáncer en humanos (10).

Un agente antimutagénico se caracteriza por reducir la frecuencia de mutaciones y por lo tanto de disminuir la aparición y/o desarrollo del cáncer en humanos. Estos antimutágenos se clasifican según la etapa en donde intervengan: en la primera actúan inactivando mutágenos exógenos evitando el daño al ADN extracelularmente. En la segunda los antimutágenos actúan evitando que compuestos genotóxicos dañen sitios críticos de la célula, esto es a nivel intracelular, y en la tercera etapa intervienen los que se encargan de inhibir la progresión tumoral, así como la invasión y metástasis (11).

3.3. Antecedentes experimentales de la oleorresina del jitomate

Se han realizado varios estudios tanto *in vivo* como *in vitro* para evaluar el efecto antioxidante, citotóxico, antimutagénico y anticarcinogénico del licopeno y la oleorresina del jitomate en diversos modelos animales y cultivos celulares (9). Entre dichos estudios destacan los siguientes:

Al evaluar la capacidad antioxidante del licopeno sobre la nefrotoxicidad producida por cloruro de mercurio ($HgCl_2$) en ratas, se observó que disminuyó la peroxidación lipídica, aumentó la actividad de enzimas antioxidantes, pero no redujo la falla renal (13). En otro estudio, el licopeno fue administrado como suplemento alimenticio, en ratas Wistar para prevenir la oxidación inducida por la doxorrubicina en células cardíacas, donde en dosis de 5mg/kg administrados por 7 días por vía oral, se encontró un efecto protector contra el daño oxidativo al ADN (14).

También se ha evaluado el efecto antigenotóxico y antimutagénico del licopeno en células ováricas de hámster chino tratadas con peróxido de hidrógeno, metil metanosulfonato y 1-óxido 4-nitroquinolina mediante la prueba de micronúcleos y ensayo cometa *in vitro*. Los resultados demostraron una disminución de las aberraciones cromosómicas en forma dosis dependiente, lo cual confirma la actividad quimiopreventiva de licopeno *in vitro* (15).

Sin embargo, en un estudio realizado en ratones LacZ con daño renal, prostático y pulmonar inducido con B(a)P, la oleorresina del jitomate rica en licopeno demostró que este inhibió ligeramente la mutagénesis inducida en próstata y aumento el daño observado en colon y pulmón, esto indica que cualquier efecto antimutagénico de la oleorresina puede ser órgano específica (16). Al respecto, se encontró que el licopeno previene la toxicidad inducida por la adriamicina sobre el daño provocado en la función testicular (17).

El licopeno ha sido usado para reducir el daño producido por la ciclosporina A, fármaco inmunosupresor con un estrecho margen terapéutico, que puede producir efectos a largo y corto plazo como nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, hipertensión arterial y estrés oxidativo; estudios realizados en ratas administradas con licopeno por vía oral indicaron que reduce el daño por estrés oxidativo y nefrotoxicidad producida por la ciclosporina A (18, 19).

Existen antecedentes de que el licopeno tiene efecto protector contra la radiación gamma por lo que se ha considerado un efectivo radioprotector durante radioterapias (20).

Finalmente, el tomate y el ajo se han usado como protectores de cáncer de colon producido por el azoximetano, obteniendo buenos resultados (21).

3.4. Benzo(a)pireno

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP), son sustancias químicas formadas durante la incompleta incineración del carbón, el petróleo, el gas, la madera, la basura y demás sustancias orgánicas como las carnes asadas al carbón y el humo del tabaco. En su forma pura estas sustancias se encuentran como sólidos incoloros, blancos o verdes amarillosos pálidos con olor leve y agradable, no se disuelven fácilmente en agua, en el aire se encuentran como vapores o adheridos a las superficies de pequeñas partículas sólidas y en el suelo es más probable que se adhieran firmemente a partículas (22). Están formados por dos anillos de benceno que se presentan en mezclas complejas. (23).

Se han considerado 15 HAP importantes pues se cree que son más dañinos y que exhiben efectos nocivos que son representativos de este tipo de compuestos,

entre los que se encuentra el Benzo(a)pireno, que ha demostrado evidencias de agente mutagénico en estudios realizados *in vivo*, por lo que se consideran como potencialmente carcinógenos y genotóxicos; además de producir alteraciones en la reproducción (23).

El B(a)P está formado por 2 o más anillos de benceno (Fig. 2), su fórmula química es $C_{20}H_{12}$, tiene una masa molecular de 252,31 g/mol; su punto de fusión es a 179°C y el de ebullición a 495°C (25).

Los HAP han sido evaluados por el Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas (IPCS), el Comité Científico de la Comisión Europea sobre Alimentación Humana (SCF) y el Comité Mixto FAO-OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos; así también la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) realizó un estudio de la presencia de HAPs en alimentos y demostró que el benzo(a)pireno está en cerca del 50% de las muestras (23).

Las vías de exposición de esta sustancia son por inhalación, a través de la piel y por ingestión. Por evaporación de esta sustancia a 20°C se puede alcanzar muy rápidamente una concentración nociva en el aire (24-25).

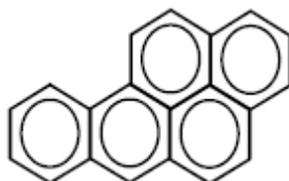


Figura 2. Estructura química del benzo(a)pireno.

3.5. Biotransformación del B(a)P

Los productos del metabolismo del B(a)P son más tóxicos que la molécula original ya que se producen especies químicas altamente reactivas con gran afinidad por moléculas nucleofílicas como los ácidos nucleicos, proteínas o lípidos motivo por el cual es considerado carcinógeno (24).

Por acción de isoenzimas CyP-450 y epóxido hidrolasas, el B(a)P, se transforma en metabolitos reactivos que tienden a unirse covalentemente a zonas nucleófilas del ADN formando aductos, (complejo que se forma cuando un compuesto químico se une a una molécula biológica como ADN o proteínas) si estos aductos no se reparan adecuadamente mediante los mecanismos de defensa del organismo, puede llevar a que en la duplicación del ADN se produzcan errores de copia, provocando mutaciones que se transmiten a las generaciones celulares (Fig. 3). Los aductos de ADN son formas de ADN que resultan de una exposición a carcinogénicos (en el caso de los fumadores, estos serían los carcinogénicos presentes en el humo de tabaco). Un aducto de ADN, una vez formado, puede repararse, esto significa una vuelta a la estructura original de ADN. También puede ser mal reparado, lo que resulta en una mutación (26).

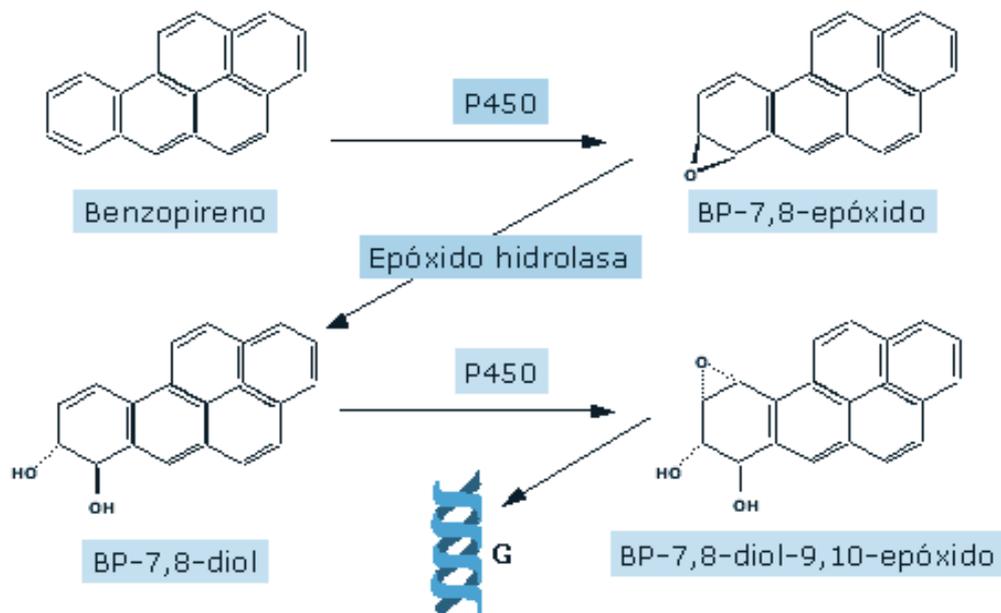


Figura 3. Biotransformación del B(a)P.

3.6. Técnicas espectrofotométricas para la identificación de licopeno.

La mayoría de las técnicas espectrofotométricas se basan en aplicar alguna forma de energía a la muestra y medir el efecto que se obtiene de las interacciones entre ambas. Basándose en los resultados se identifica la sustancia o se determina su concentración, en este caso se utilizaron para identificar la presencia de licopeno en la oleorresina y descartar la presencia de impurezas en la muestra (27).

3.6.1. Espectrofotometría infrarroja

Es un tipo de espectrometría de absorción que utiliza la región infrarroja del espectro electromagnético, es utilizada para identificar un compuesto o investigar la composición de una muestra, se basa en el hecho de que los enlaces químicos de las sustancias tienen frecuencias de vibración específicas, que corresponden a los niveles de energía de la molécula. Estas frecuencias dependen de la forma de la superficie de energía potencial de la molécula, la geometría molecular, las masas atómicas y, posiblemente, el acoplamiento vibracional (27).

Si la molécula recibe luz con la misma energía de esa vibración, entonces la luz será absorbida si se dan ciertas condiciones. Para que una vibración aparezca en el espectro infrarrojo, la molécula debe someterse a un cambio en su momento dipolar durante la vibración. Los enlaces pueden vibrar de seis maneras: estiramiento simétrico, estiramiento asimétrico, tijeras, rotación, giro y "wag".

3.6.2. Espectrofotometría de Uv-Vis

La espectrometría de Uv-Vis mide la intensidad de luz que pasa a través de una muestra comparada con la intensidad de luz antes de pasar a través de la misma y se fundamenta en la ley de Beer-Lambert que establece que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración de la solución. Por tanto, la espectrometría Uv-Vis puede usarse para determinar la concentración de una solución (27).

3.6.3. Espectrofotometría de fluorescencia

Es un tipo de espectroscopia electromagnética que analiza la fluorescencia de una muestra, utiliza un haz de luz, generalmente luz ultravioleta; que excita los electrones de las moléculas de ciertos compuestos y provoca que emitan luz de una menor energía, principalmente de la región de luz visible (27).

3.6.4. Espectrofotometría de masas

La espectrometría de masas se fundamenta en la separación de partículas moleculares o atómicas por su diferente masa; es una técnica usada para identificar compuestos desconocidos, para cuantificar compuestos conocidos, y para mostrar la estructura y propiedades químicas de moléculas. La detección de compuestos puede ser llevada a cabo con cantidades realmente pequeñas de muestra y obtener información característica como el peso y algunas veces la estructura del analito. En todos los casos, alguna forma de energía es transferida a las moléculas a analizar para afectar la ionización. En la técnica clásica de impacto electrónico algunas de las moléculas ionizadas del analito explotan en una variedad de fragmentos ionizados, el patrón de fragmentación resultante, así como los iones residuales constituyen el espectro de masas (27).

3.6.5. Cromatografía de gases

Es un método de análisis para la separación e identificación de sustancias orgánicas volátiles y análisis cualitativo y cuantitativo de los componentes de una mezcla. La muestra se inyecta por un puerto que se encuentra a una temperatura más alta que la de ebullición de las sustancias que contiene. El vapor pasa a una columna que está dentro de un horno de temperatura regulada, donde ocurre la separación. A la salida de la columna hay un detector y su señal se envía a una computadora para obtener el cromatograma. El tiempo de análisis varía de menos de un minuto a 1-2 horas (27).

3.6.6. Resonancia magnética nuclear de Hidrógeno (RMNH)

Es una técnica que explota las propiedades magnéticas de ciertos núcleos. Las aplicaciones más importantes para su uso en química orgánica son la espectrometría RMN- ^1H y RMN- ^{13}C . En principio, la resonancia es aplicable a cualquier núcleo que posea espín de un electrón desapareado.

Cuando se sitúan dentro de un campo magnético, los núcleos activos de RMN (como el ^1H , o el ^{13}C) absorben a una frecuencia característica del isótopo. La frecuencia de resonancia, la energía de la absorción y la intensidad de la señal son proporcionales a la fuerza del campo magnético (27).

Una vez realizadas las pruebas espectrofotométricas es necesario evaluar el comportamiento del extracto en un organismo vivo para lo cual existen ensayos en los que se determina si una sustancia es dañina o bien, tiene capacidad protectora contra agentes capaces de inducir alteraciones.

3.7. Evaluación genotóxica y antigenotóxica

Las pruebas de genotoxicidad son ensayos que evidencian las alteraciones causadas al material genético, de manera directa o indirecta, por agentes ambientales, tanto en células somáticas como germinales. El primer paso para realizar los estudios de evaluación genotóxica es la realización de ensayos *in vitro* que permiten evaluar el potencial mutagénico de los compuestos químicos en un tiempo corto. Estos ensayos de genotoxicidad a corto plazo son de gran utilidad porque permiten detectar mutaciones génicas, aberraciones cromosómicas, daño primario a la estructura del ADN, transformaciones celulares u otros cambios, los cuales son inducidos por compuestos químicos o físicos que abundan en el ambiente. La evaluación genotóxica para compuestos de nueva síntesis y fitoquímicos es de carácter obligatorio a nivel internacional. La diversidad de efectos deletéreos a los que está expuesto el material hereditario es imposible de detectar a través de un único sistema de ensayo. La amplia gama de mutaciones que pueden originarse no sería abarcada en un ensayo aislado y ofrecería un

resultado poco preciso. Resulta imprescindible usar un grupo de ensayos *in vitro* e *in vivo*, que permitan una correcta extrapolación del efecto genotóxico de la sustancia de interés para poder predecir con certeza un posible efecto carcinogénico del compuesto en estudio y realizar una adecuada aplicación de los hallazgos detectados, al hombre. La evaluación antigenotóxica de algún compuesto, se refiere a la capacidad que éste tiene para reducir los daños que han sido causados al material genético por la exposición a compuestos químicos o físicos presentes en el ambiente, existen diferentes tipos de pruebas encaminadas a la evaluación de la genotoxicidad y antigenotoxicidad, tal es el caso de la prueba cometa y de micronúcleos que permiten evaluar el daño producido en el material genético (28).

3.8. Prueba de Micronúcleos

Se ha comprobado que la prueba de Micronúcleos (MN) es útil para la evaluación de la seguridad toxicológica de nuevos productos farmacéuticos mediante la determinación del daño cromosómico en células anucleadas como los eritrocitos, o bien en el citoplasma de células nucleadas como los linfocitos o las espermatogonias (29, 30).

En el caso de la eritropoyesis se presentan varias divisiones celulares para la formación del eritrocito. En etapas finales del proceso se pueden observar dos tipos de células, los eritrocitos policromáticos (EPC) y eritrocitos normocrómicos (ENC), las primeras son células inmaduras que contienen ARN que al terminar su síntesis de hemoglobina, disminuyen de tamaño y terminan su maduración convirtiéndose en eritrocitos normocrómicos (ENM). Durante las etapas previas a la formación de estos dos tipos de eritrocitos, el material genético de las células sanguíneas puede ser alterado por xenobióticos o compuestos clastogénicos y sufrir lesiones cromosómicas que se manifiestan como MN, los cuales permanecen en el eritrocito, aun cuando el núcleo principal se haya expulsado por

lo que si se incrementa el número de MN se considera un parámetro de genotoxicidad de los compuestos (Fig. 4) (31 - 33).

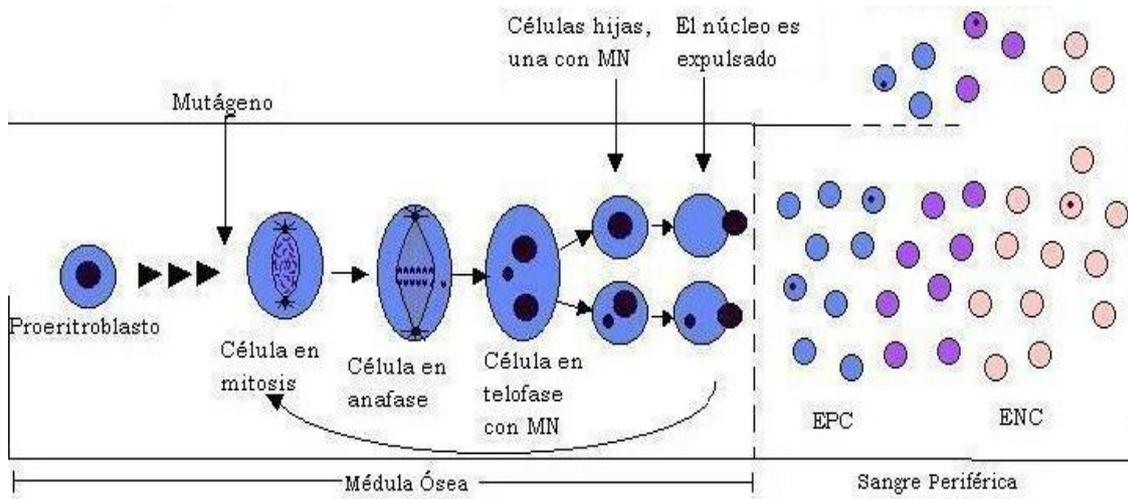


Figura 4. Formación de micronúcleo durante el proceso de eritropoyesis y su observación microscópica en sangre periférica. Modificado de Madrigal y cols., 2002.

4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Diversos estudios han indicado que el licopeno posee efectos antioxidantes, cardioprotectores, antimutagénicos frente a diversos agentes genotóxicos, protección contra el daño renal, cáncer gástrico y de colon *in vivo*; sin embargo, no se ha estudiado en un modelo genotóxico de micronúcleos *in vivo* frente a agentes formadores de aductos en el ADN como el B(a)P, lo cual contribuiría a considerar la conveniencia de utilizarlo en programas de quimioprevención en humanos. Por lo tanto, la pregunta de investigación en el presente estudio sería ¿El licopeno actuará como agente quimioprotector contra el daño producido con el B(a)P *in vivo*?

5. JUSTIFICACIÓN

La quimiopreención es una alternativa contra diversos agentes que provocan daño en el material genético, lo cual contribuye a disminuir del riesgo del proceso carcinogénico. El licopeno representa una opción quimiopreventiva ya que se ha evaluado en diversos estudios epidemiológicos y experimentales tanto *in vivo* como *in vitro*, los cuales orientan a la posibilidad de encontrar efectos protectores contra el daño provocado contra el B(a)P en un modelo de genotoxicidad y citotoxicidad *in vivo*. Esta propuesta constituye un diseño original para evaluar el efecto combinado en un modelo subcrónico lo cual contribuirá a fortalecer las evidencias para la incorporación de licopeno en la dieta humana, y de esta manera sugerirlo como sustancia protectora para fumadores activos y pasivos.

6. TIPO DE ESTUDIO

Es un estudio prospectivo, transversal, experimental.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del licopeno sobre la genotoxicidad y citotoxicidad del benzo(a)pireno mediante la técnica de micronúcleos.

7.2. Objetivos específicos

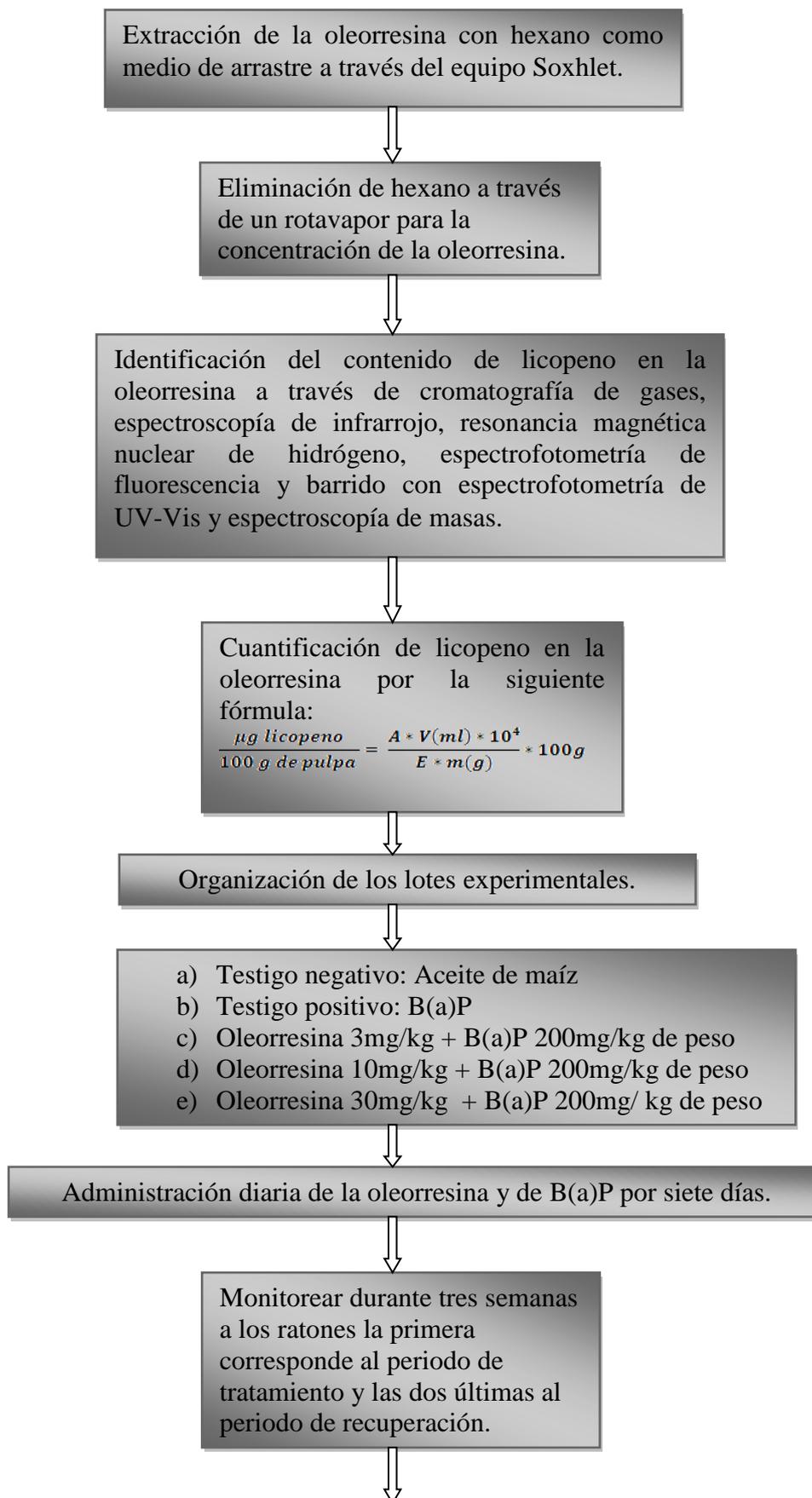
- Extraer la oleoresina del jitomate mediante extracción hexánica en Soxhlet.
- Identificar el licopeno en la oleoresina mediante cromatografía de gases, espectroscopía de infrarrojo, resonancia magnética nuclear de hidrógeno, espectrofotometría de fluorescencia y de barrido con espectrofotometría de UV-Vis.
- Evaluar la el potencial genotóxico y citotóxico del licopeno contenido en la oleoresina mediante la técnica de micronúcleos.

- Estudiar la capacidad antigenotóxica de la oleorresina de licopeno contra el daño producido por el Benzo(a)Pireno en un modelo subcrónico mediante la cuantificación de ENCMN.
- Determinar el potencial anticitotóxico de la oleorresina de licopeno contra el daño producido por B(a)P mediante la cuantificación de células jóvenes (EPC) con respecto a los eritrocitos maduros(ENC).

8. HIPÓTESIS

Si la oleorresina del jitomate rica en licopeno funciona como agente antigenotóxico y anticitotóxico frente al daño producido por el B(a)P, entonces disminuirá el número de células normocrómicas micronucleadas y normalizará la relación entre eritrocitos policromáticos/normocrómicos con respecto al grupo tratado únicamente con el mutágeno en sangre periférica de ratón CD1+.

9. DISEÑO EXPERIMENTAL GENERAL



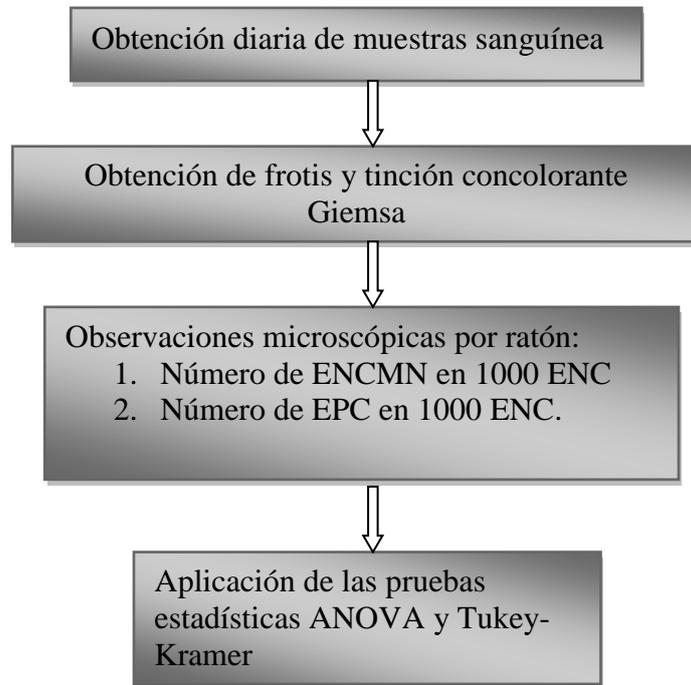


Figura 5. Esquema general de trabajo

10.METODOLOGÍA

10.1. Animales, reactivos y equipo

Animales:

Ratones macho cepa CD1+ obtenidos del bioterio del Instituto de Ciencias de la Salud de la UAEH, con un peso aproximado de 20 ± 2 g, mantenidos bajo condiciones controladas de temperatura 22°C, humedad 45%, ciclos luz-oscuridad de 12X12 h, mantenidos con alimento Harlan Teklad global para roedores 18% proteína, esterilizable 2018S.

Reactivos: Benzo(a)Pireno (Sigma-Aldrich), hexano (J.T. Baker), agua destilada, aceite de maíz, Fosfato de Sodio monobásico y dibásico (J.T Baker), Giemsa (Merck), aceite de inmersión.

Equipo y material

- Microscopio (Olympus CX21FSI)
- Contador de células
- Vortex (Mixer 16700)
- Equipo de extracción Soxhlet
- Rotavaporador (Buchi)
- Horno (Fisher Scientific)
- Congelador (Revco)
- Balanza analítica (VIBRA)
- Espectrofotómetro de infrarrojo (Nexus 470FT-IR E.S.P. Nicolet)
- Espectro de Uv-Vis (JENWAY)
- Espectrofotómetro de fluorescencia (Nicolet)
- Cromatógrafo de gases (Agilent 6890GC)
- Equipo de resonancia magnética nuclear (Varian)
- Espectrómetro de masas (Peki Elmer Auto SystemXL)
- Computadora hp 1502
- Material para montar el equipo Soxhlet, refrigerante, matraz balón de fondo plano, mangueras, soporte universal, pinzas para soporte, mantilla de

calentamiento, regulador de temperatura, bomba de agua, embudo de extracción, vasos de precipitado, varilla de vidrio, perlas de vidrio.

Para las pruebas biológicas se administró la oleorresina del licopeno, la cual se extrajo directamente del jitomate y se le hicieron diferentes pruebas espectrofotométricas para descartar la presencia de compuestos extraños en el extracto.

10.2. Extracción del licopeno.

El jitomate utilizado en el experimento se adquirió en la central de abastos de Pachuca Hidalgo en el mes de noviembre del 2008 y marzo del 2009, procedente del estado de Querétaro. Para la extracción, identificación, cuantificación y pruebas biológicas se realizó lo siguiente:

- Se fraccionó el jitomate aproximadamente de $\frac{1}{2}$ cm y se exprimó en papel filtro y una prensa. Se secó en un horno a 40 °C durante una noche con la finalidad de eliminar el sobrante de líquido de la pulpa (Revisar anexos, figuras 16-18).
- El jugo obtenido se conservó en congelación para posteriormente introducirlo en agua a 30°C (descongelamiento) y lograr el rompimiento de las células.
- Para obtener un mejor rompimiento de las células, se colocó el jugo de jitomate en un sonicador durante unos minutos para que las ondas de ultrasonido concluyeran el rompimiento celular.
- Para la extracción de la oleorresina a partir del jugo recuperado se preparó una solución de agua destilada con sal y se mezcló en un embudo de extracción junto con el jugo y un poco de hexano, posteriormente se agitó manualmente y se mantuvo en reposo para separar los componentes de la mezcla, obteniendo así tres fases; la parte inferior corresponde al jugo, el cual fue eliminado al igual que la segunda en la que se ubicó el agua con sal; finalmente en la última fase se encuentra el hexano con el licopeno extraído (fase amarilla) este proceso se repitió hasta terminar con el jugo.

- Una vez recuperada la parte de hexano con licopeno se colocó en un rotavapor para separar el hexano del extracto (Revisar anexos, figura 21).
- Para aumentar la vida media del licopeno en la oleorresina, se mantuvo en refrigeración en una atmósfera de nitrógeno y se protegió de la luz cubriéndolo con papel aluminio para evitar su oxidación y contaminación.
- Para la extracción de licopeno a partir de la pulpa se montó un equipo Soxhlet utilizando hexano como medio de arrastre.
- Se colocó jitomate seco dentro del Soxhlet a temperatura de 40 °C por ciclos de 4 h, esto se repite hasta terminar con toda la pulpa (revisar anexos, figuras 19-20).
- Finalmente el hexano obtenido se colocó en el rotavapor a 315mbar a 40 °C hasta concentrar la oleorresina (Revisar anexos, figura 21).

10.3. Identificación de licopeno

Para la identificación se utilizó una muestra hexánica de la oleorresina de licopeno que se sometió a varias pruebas cromatográficas. Dichas pruebas fueron las siguientes: cromatografía de gases, espectroscopía de infrarrojo, resonancia magnética nuclear de hidrogeno, espectrofotometría de fluorescencia y barrido con espectrofotometría de UV-Vis y espectroscopía de masas.

10.4. Cuantificación del licopeno

- Para verificar la cantidad de licopeno obtenido se utilizó el espectrofotómetro de Uv-Vis en donde se hizo un barrido de 400 a 600nm de longitud de onda dando como resultado tres picos consecutivos en donde el más alto mostró la concentración del licopeno y los demás correspondieron a otros carotenoides según reporta la bibliografía.
- Los valores de la absorbancia se sustituyeron en la siguiente ecuación para obtener el rendimiento de licopeno en el extracto. (34).

$$\frac{\mu g \text{ licopeno}}{100 \text{ g de pulpa}} = \frac{A * V(ml) * 10^4}{E * m(g)} * 100g$$

En donde **A** corresponde a los valores de absorbancia; **V**, al volumen; **E**, 3310 (constante) y **m**, masa.

10.5. Evaluación genotóxica y citotóxica de la oleorresina del jitomate(licopeno)

Para las pruebas de genotoxicidad y citotoxicidad de la oleorresina de licopeno se utilizaron 12 ratones de la cepa CD1+ con peso de 20gr. A dichos animales se les administró la oleorresina por vía oral a dosis de 3 y 30 mg/kg de peso durante 7 días. Se obtuvieron muestras sanguíneas cada 24 h para la realización de frotis que se tiñeron con colorante Giemsa y finalmente se realizó la lectura al microscopio del número de EPCMN/ENC para determinar la genotoxicidad y EPC/ENC para la citotoxicidad.

10.6. Potencial antegenotóxico y anticitotóxico de la oleorresina del jitomate (licopeno)

Para la prueba de antigenotoxicidad y anticitotoxicidad de la oleorresina los animales se dejaron en ayuno por 12 horas antes de la administración de los compuestos de acuerdo al siguiente diseño experimental:

Tamaño de la muestra: Se utilizaron 5 lotes de 7 ratones cada uno.

Criterios de inclusión: Ratones machos de la cepa CD1+ de $20 \pm 2g$.

Criterios de exclusión: Ratones hembras, ratones enfermos o con alguna anomalía corporal.

Criterios de Eliminación: Ratones que mueran durante el periodo experimental.

10.6.1. Organización de grupos experimentales

Los animales se pesaron, marcaron y distribuyeron aleatoriamente para formar los grupos de experimentación (Tabla 1).

GRUPO	AGENTE	DOSIS	VÍA DE ADMINISTRACIÓN
1	Aceite de maíz	0.1 mL	Oral
2	B(a)P	200mg/kg	Oral
3	Oleorresina + B(a)P	3 mg/kg + 200mg/kg	Oral
4	Oleorresina + B(a)P	10 mg/kg + 200 mg/kg	Oral
5	Oleorresina + B(a)P	30 mg/kg + 200 mg/kg	Oral

Tabla 1. Distribución de grupos experimentales de antigenotoxicidad y anticitotoxicidad de la oleorresina del jitomate.

Como se observa en la tabla 1, se formaron 5 lotes con 7 ratones cada uno, los cuales se administraron diariamente durante siete días, al grupo testigo negativo se le administró 0.1 mL de aceite de maíz que corresponde al vehículo de licopeno y que por sus propiedades lipofílicas presenta alta solubilidad con compuesto; al grupo testigo positivo se le administró 200mg/kg de B(a)P, los tres grupos restantes fue una de administración combinada de oleorresina a dosis de 3, 10, y 30 mg/kg más 200 mg/kg de B(a)P, todo lo anterior se hizo por vía oral (Revisar anexos, fig. 22).

10.6.2. Toma de muestras

Las muestras se tomaron cada 24 horas durante dos semanas consecutivas y se tomó una final a la tercera semana siendo la primera semana de tratamiento y las dos posteriores de recuperación. Para la toma de muestras se desinfectó tanto la cola de los ratones como las tijeras de disección con etanol, después se extrajo sangre periférica cortando la punta de la cola de cada uno de los ratones (de 0.5 a 1 mm aproximadamente), eliminando las dos primeras gotas de sangre pues se considera que ésta es sangre almacenada. Se obtuvieron muestras por duplicado, para realizar frotis sanguíneos que se rotularon con lápiz para evitar que la marca se diluyera, se dejaron secar al aire y posteriormente se fijaron con metanol durante 10 minutos, una vez fijadas se colocaron en vasos coplin durante 20 min. con colorante Giemsa previamente preparado con 5 mL de solución reguladora de

fosfatos 0.3M, pH de 6.8 (30mL de KH_2PO_4 y 20mL de Na_2HPO_4), 2 mL de colorante Giemsa y 33 mL de agua desionizada. Finalmente se enjuagaron para eliminar el exceso de colorante y se dejaron secar a temperatura ambiente para su análisis en el microscopio (objetivo de 100x) en donde se contaron los eritrocitos normocrómicos micronucleados (ENCMN) en 1000 eritrocitos maduros (ENC) y se determinó la relación de eritrocitos policromáticos (EPC) con respecto a los eritrocitos normocrómicos en 1000 células (Revisar anexos, fig. 23-25).

10.6.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico de la evaluación genotóxica y antigenotóxica se realizó mediante las pruebas de ANOVA y de Tukey-Kramer con el programa SigmaStat 2.03 considerando diferencias significativas cuando p fue menor o igual a ≤ 0.05 .

11.RESULTADOS

El rendimiento de la extracción hexánica de licopeno fue la siguiente:

$$\frac{\mu\text{g licopeno}}{100\text{ g de pulpa}} = \frac{1.426 \times 4(\text{ml}) \times 10^4}{3310 \times 1.143} * 100\text{ g} = 150\text{ mg licopeno} / 100\text{ g de pulpa}$$

11.1. Gráficas de identificación de licopeno.

ESPECTROFOTOMETRÍA INFRARROJA

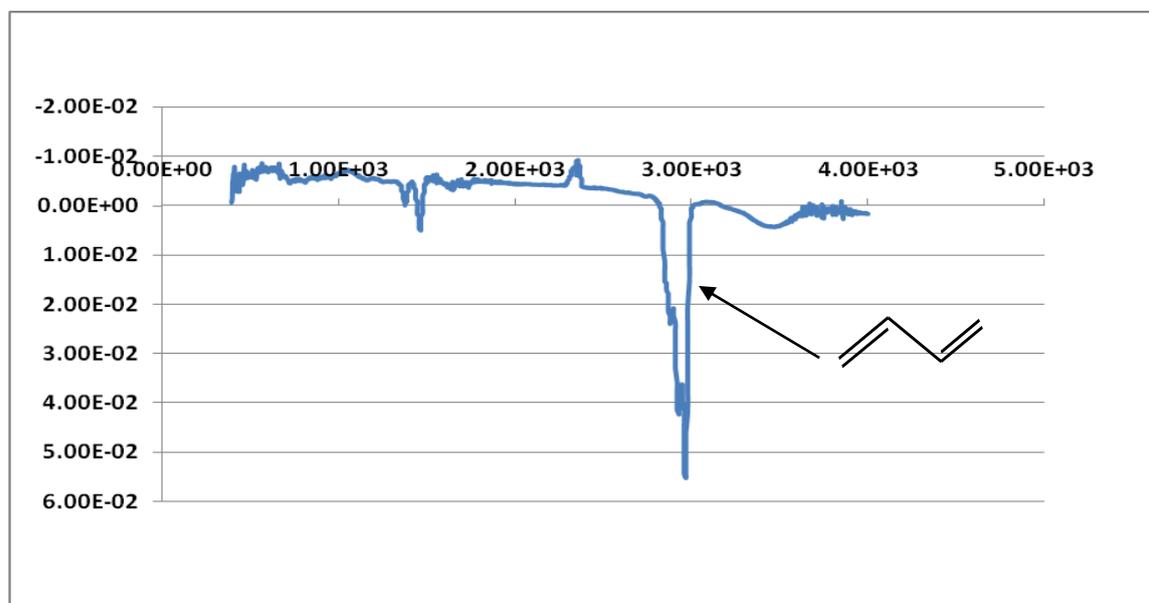


Figura 6: Curva experimental donde se muestra la presencia de licopeno asociado a las mediciones de absorbancia con un espectrofotómetro (Estrechamiento C-H, doble enlace conjugado: 3,000 cm^{-1}) (Silverstein, 1991).

De acuerdo a las tablas de identificación para compuestos formados por dobles enlaces conjugado (37), la banda de estrechamiento C, H presenta su absorbancia a 3000 nm (Fig. 6), por lo que comparando dichas tablas con la gráfica obtenida con la oleorresina obtenida en el presente experimento; coinciden con la estructura del licopeno, ya que está formado por carbonos e hidrógenos que es su principal estructura, también los picos que acompañan se describen como carotenoides propios del extracto.

ESPECTROFOTOMETRIA DE UV-VIS

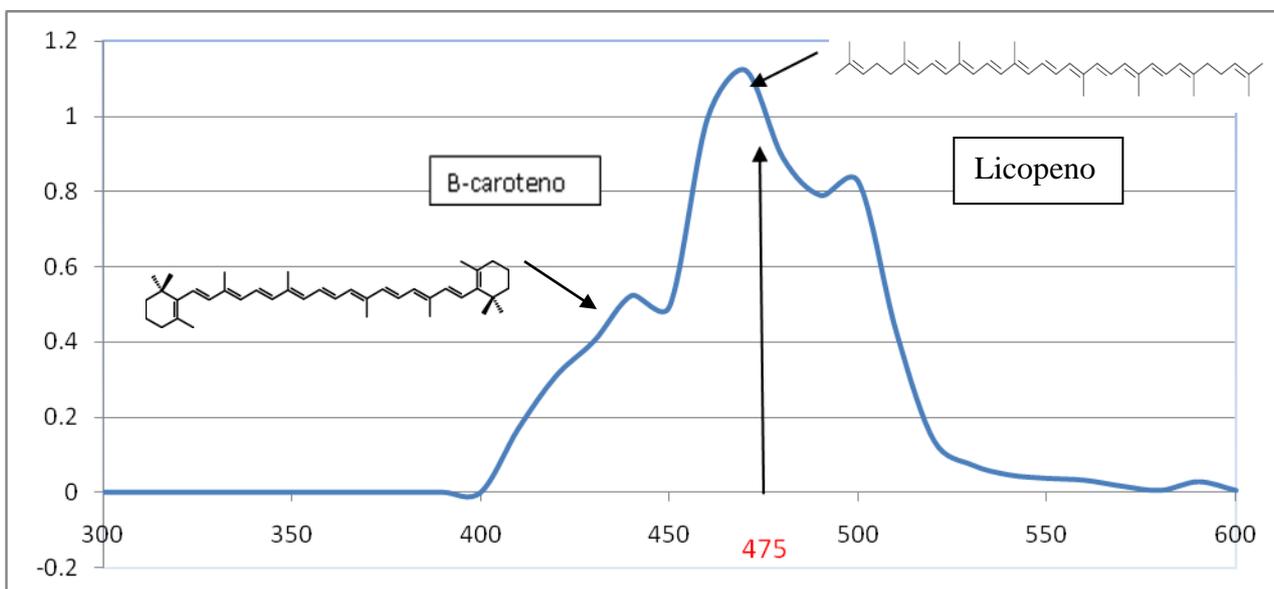


Figura 7: Curva experimental donde se muestra la presencia de licopeno asociado a las mediciones de barrido con espectrofotometría de UV-Vis.

La gráfica anterior (Fig.7) muestra la presencia de licopeno, cuyo pico de absorbancia fue a 475 nm, dato que coincide con la información de la literatura consultada (37), en la que señala que la absorbancia máxima del licopeno en hexano se lee a 474nm. También se observa al β -caroteno entre entre 400 y 450 nm de absorbancia.

ESPECTROFOTOMETRÍA DE FLUORESCENCIA

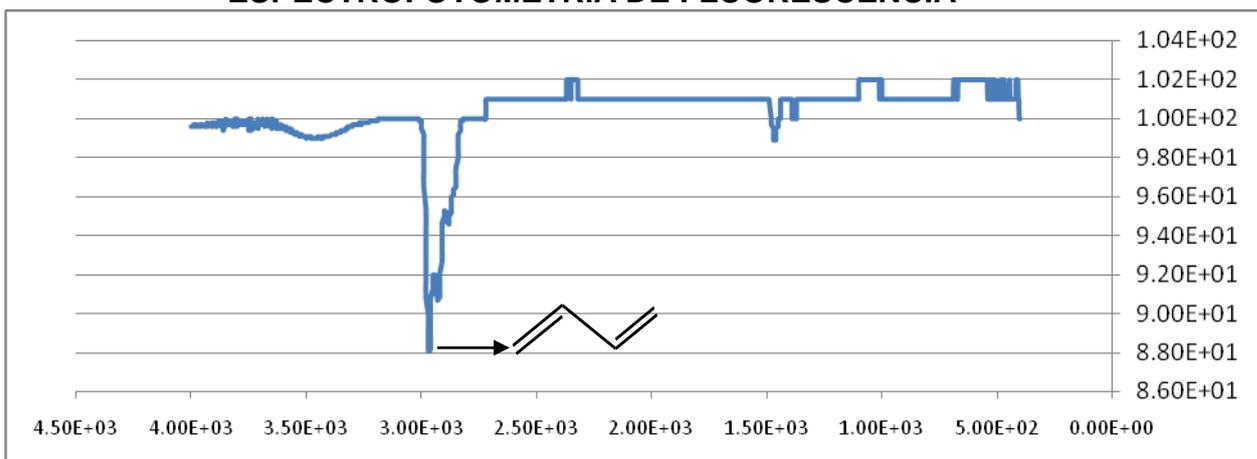


Figura 8: Curva experimental donde se muestra la presencia de licopeno a una longitud de onda de 3000 nm asociado a las mediciones de absorción con un espectrofotómetro de fluorescencia.

De acuerdo a las tablas de identificación para compuestos formados por dobles enlaces conjugados (37), la banda de estrechamiento C, H presenta su absorción a 3000 nm (Fig. 9), por lo que comparando dichas tablas con la gráfica que se presenta coinciden con la estructura del extracto (licopeno) ya que está formado por carbonos e hidrógenos que es su principal estructura, también los picos que acompañan se describen como carotenoides propios del extracto.

ESPECTROFOTOMETRÍA DE MASAS

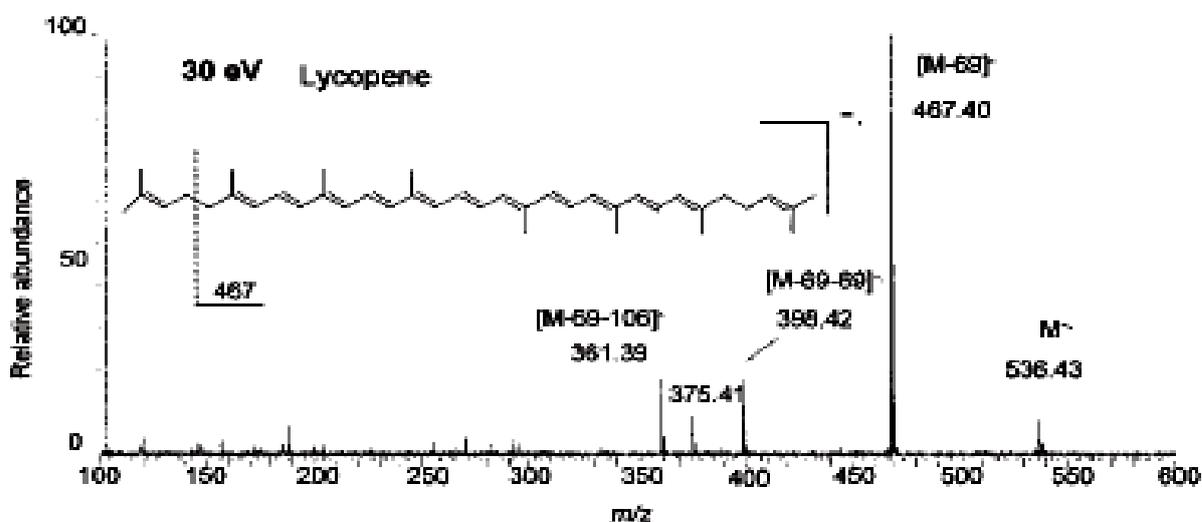
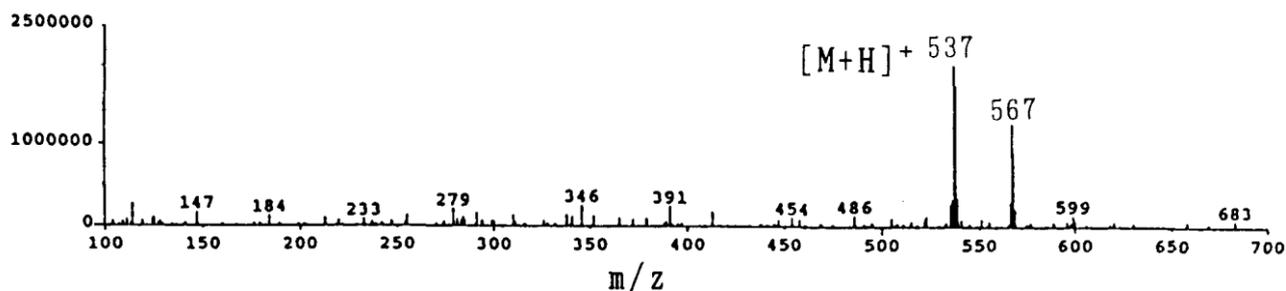


Figura 9: Espectro de tándem iónico del Ión radical m/z 536.43 del licopeno con el modo NICI (ionización química del Ion negativo) y el pico base a m/z 467.40. La disociación inducida por colisión fue realizada con gas Argón a 30 eV. (JEOL company, 2008)

En las gráficas anteriores (Fig. 9), se muestra el rompimiento de masas que se realizó mediante impacto electrónico en donde se presentan los rompimientos másicos m/z característicos del licopeno, el ion molecular, el ión radical y el pico base.

CROMATOGRAFIA DE GASES DEL LICOPENO ADMINISTRADO

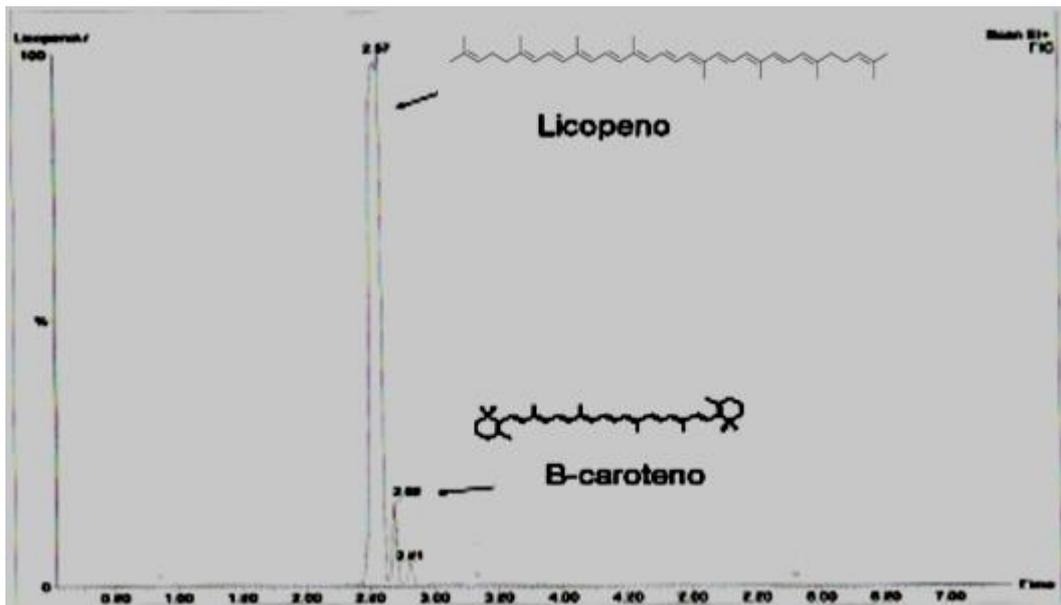


Figura 10: Gráfica experimental que muestra la presencia de licopeno por la técnica de Cromatografía de gases. El tiempo de retención para el licopeno es de 2.57 min. β -caroteno es 2.68 y el compuesto minoritario, posible descomposición del licopeno aparece a los 2.81.

RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

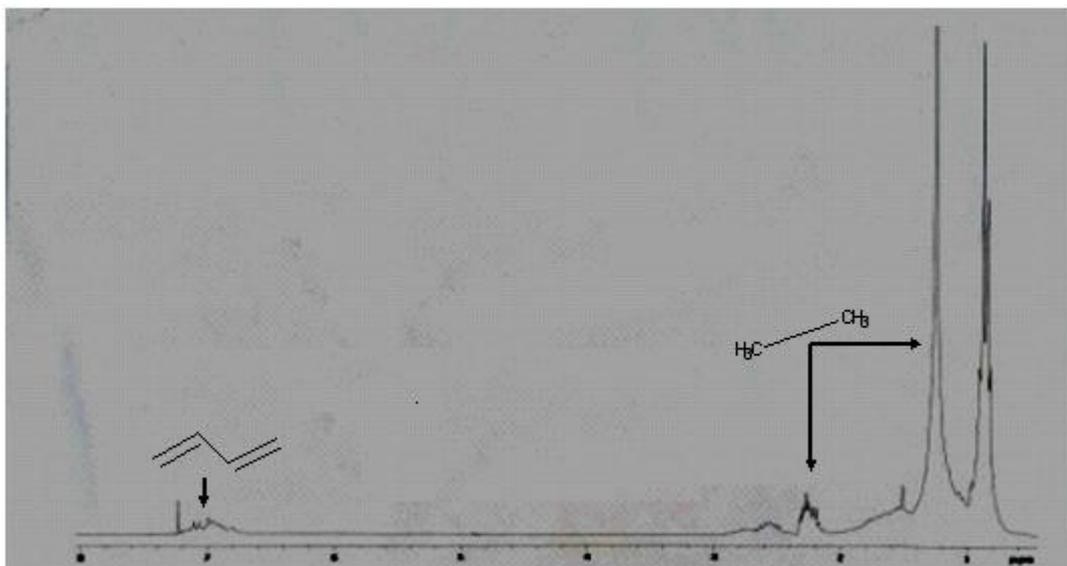


Figura 11: Espectro de RMN- ^1H (protón) utilizando CDCl_3 (cloroformo deuterado) como disolvente. Se observa a campo alto las señales de metilos y a campo bajo los grupos conjugados.

11.2. Evaluación Genotóxica y Citotóxica

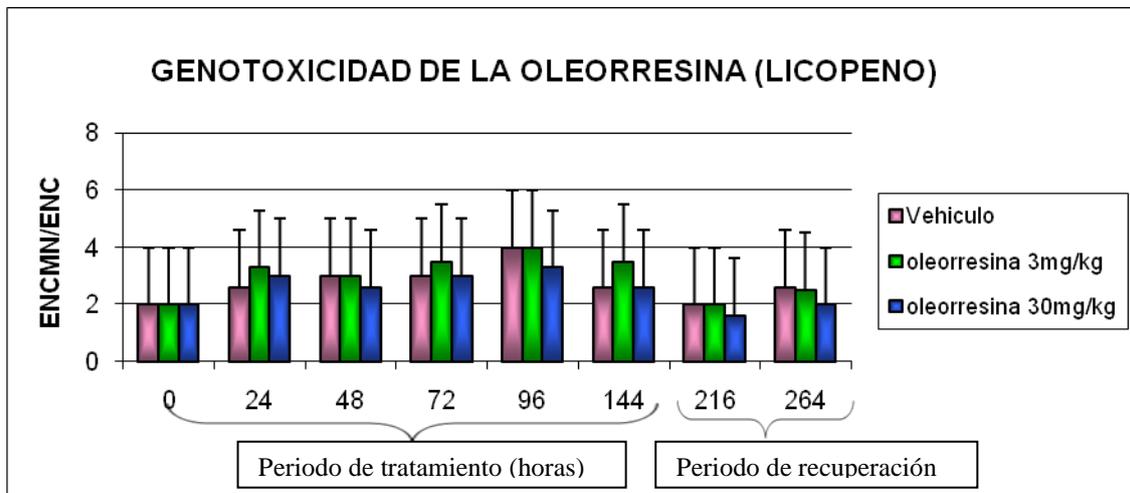


Figura 12: Evaluación de la genotoxicidad de la oleorresina del jitomate (licopeno) en sangre periférica de ratones CD1+.

La evaluación del efecto genotóxico de la oleorresina del jitomate (licopeno) en sangre periférica de ratones se muestra en la fig. 12, donde cada barra representa el número promedio de EPCMN encontrados en cada lote y en cada tiempo del periodo de tratamiento (0-144 h) y de recuperación (218 y 264 h).

Se puede observar que no existieron diferencias estadísticamente significativas por lo que se deduce que no hubo ningún cambio entre los grupos control y el de las dosis administradas lo que demuestra que la oleorresina no genera ningún daño genotóxico per se.

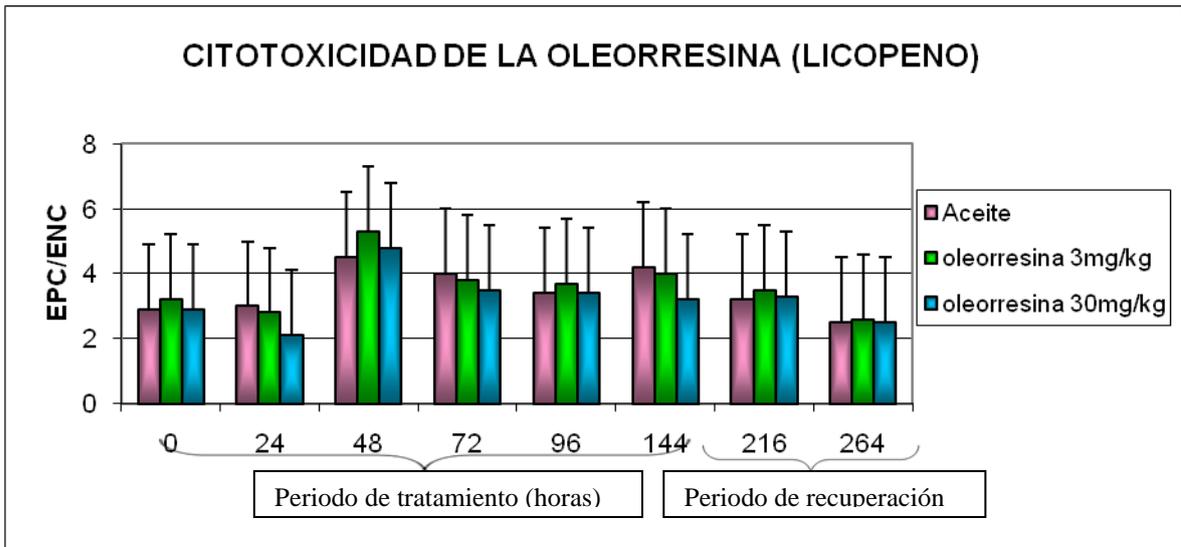


Figura 13: Evaluación de la citotoxicidad de la oleorresina del jitomate (licopeno) en sangre periférica de ratones CD1+.

En la figura 13 se observa la citotoxicidad de la oleorresina del jitomate (licopeno), expresada como la relación de EPC con respecto a los ENC. Se puede observar que no hubo diferencias significativas entre los grupos administrados con la oleorresina con respecto al grupo negativo a lo largo de todo el experimento (0-264 h), resultado que indicó que la oleorresina no presenta efecto citotóxico sobre la médula ósea.

11.3. Evaluación Antigenotóxica

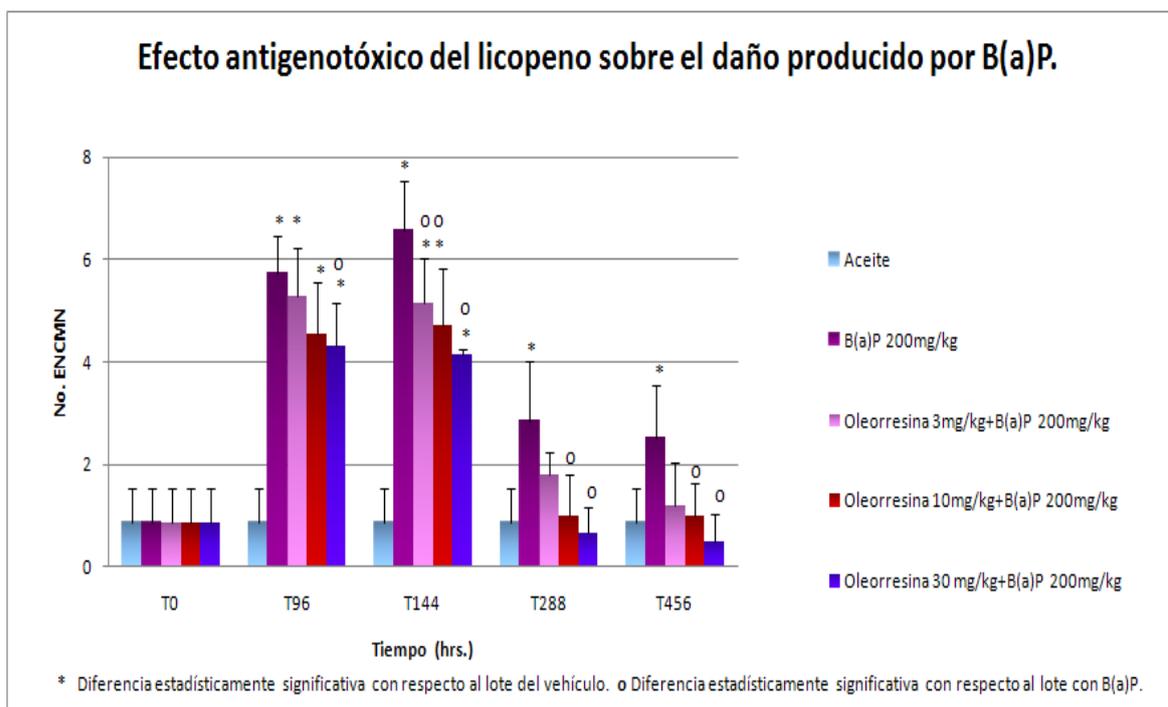


Figura 14: Evaluación de la antigenotoxicidad de la oleorresina del jitomate (licopeno) en sangre periférica de ratones CD1+.

En la figura 14 se pueden apreciar los resultados obtenidos de la evaluación antigenotóxica de la oleorresina sobre el daño producido por el B(a)P, dicho efecto se evaluó al cuantificar el número de eritrocitos normocrómicos micronucleados (ENCMN) por cada 1000 ENC con respecto al tiempo (0 a 456 h), donde la presencia de ENCMN en los animales que formaron parte del grupo tratado sólo con aceite de maíz no incrementaron significativamente el número de micronúcleos en el periodo de tratamiento ni en el de recuperación, la frecuencia se mantuvo entre 0 y 2 ENCMN dando en promedio un valor de 0.857 MN por cada 1000 ENC.

Por su parte, la frecuencia de ENCMN indica que el B(a)P produjo un efecto genotóxico significativo con respecto al grupo administrado sólo con el vehículo a partir de las 96 horas (período de administración) hasta las 144 horas (periodo de recuperación) con un aumento del 87%, con respecto al tiempo basal del lote control administrado solo con aceite de maíz.

Sin embargo, se observa una disminución significativa de ENCMN en el lote combinado de B(a)P con licopeno a dosis de 30mg/kg, a las 96 horas con respecto al lote administrado solamente con B(a)P, lo que indica que la oleorresina en la dosis mayor, al cuarto día ya tiene efecto antimutagénico.

El máximo efecto genotóxico del B(a)P, se observa a las 144 horas de tratamiento y a su vez los lotes combinados muestran una mayor protección. El porcentaje de protección de la dosis de 3mg/kg fue de 21.7%, con 10mg/kg de 28.2% y con la dosis alta de 30mg/kg fue de 36.5% con respecto lote tratado solo con B(a)P. Es decir, se observó un efecto protector dosis-dependiente.

Mientras que a las 288 y 456 horas sólo las dos dosis más altas de la oleorresina (10mg/kg y 30mg/kg) son capaces de disminuir el número de ENCMN a nivel basal teniendo un porcentaje de protección de 64.7% y 76.4%, a las 288 horas y de 60% y 80% a las 456 horas en comparación con el grupo tratado con B(a)P.

Con lo que se puede concluir que el efecto antigenotóxico de la oleorresina fue dosis-dependiente a lo largo del experimento.

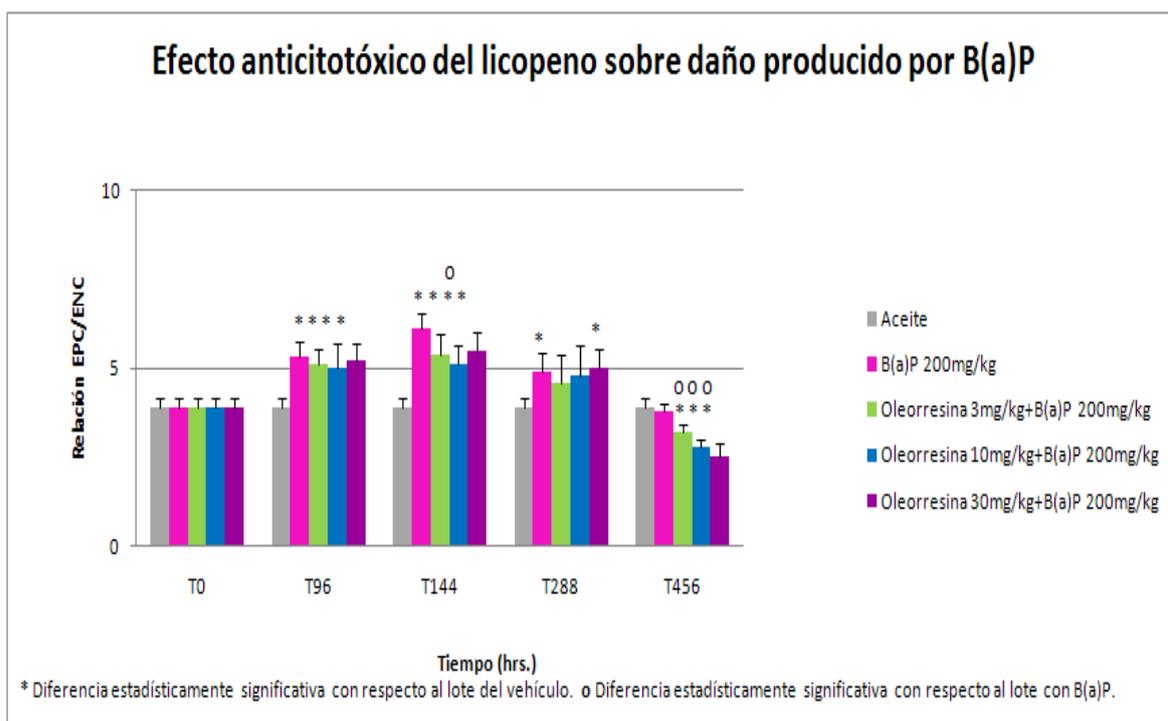


Figura 15: Evaluación de la anticitotoxicidad de la oleorresina del jitomate (licopeno) en sangre periférica de ratones CD1+.

En los resultados de la frecuencia de EPC con respecto a los normocrómicos, se puede observar que al inicio de la administración existe un comportamiento uniforme tanto en el grupo administrado con aceite de maíz como en los lotes combinados (Fig. 15).

Con respecto al efecto citotóxico, el B(a)P produjo un aumento significativo de la eritropoyesis, efecto que produjeron los lotes combinados a partir de las 96 horas hasta las 288 horas. El máximo efecto citotóxico del B(a)P se observa a las 144 horas de tratamiento en donde se presentó un aumento de 36% con respecto al tiempo basal.

A su vez los lotes combinados mostraron incremento significativo con respecto al lote tratado solo con aceite de maíz, pero este incremento no fue mayor al que presentó el lote positivo. Esto demuestra que el licopeno manifestó protección contra el B(a)P siendo en esta ocasión la dosis de 10mg/kg la que presenta diferencia significativa en relación al grupo control presentando un porcentaje de protección de 16%, mayor al presentado con las otras dosis.

Mientras que el máximo efecto anticitotóxico se presentó a las 456 horas (periodo de recuperación) en el que los lotes tratados con B(a)P y licopeno con las tres dosis, 3, 10 y 30 mg/kg, disminuyeron la frecuencia de EPC. El porcentaje de protección fue de 16%, 26% y 34% respectivamente, observando que la dosis más alta (30mg/kg) es la que presenta mayor efecto anticitotóxico.

12.DISCUSIÓN

En el medio ambiente existen diversos agentes químicos que intervienen ampliamente en la aparición de distintos tipos de cáncer, es por eso que el estudio de agentes antimutagénicos es de gran importancia ya que permitirá establecer alternativas quimiopreventivas que a diferencia de la quimioterapia no ocasionen daños colaterales al paciente.

Una posibilidad para disminuir este tipo de enfermedades es el consumo de alimentos ricos en antioxidantes como frutas y verduras entre los que se encuentra el jitomate el cual contiene licopeno, un caroteno capaz de actuar sobre los radicales libres presentes en el organismo.

Para la realización de esta investigación se extrajo la oleorresina de licopeno del jitomate comercial (*Lycopersicum esculentum*), a través de un equipo Soxhlet utilizando la pulpa y el jugo del jitomate de acuerdo a la técnica empleada por Cardona y colaboradores (2006) con algunas modificaciones (34). Obteniendo un rendimiento de 1.143 g de extracto total de los cuales 150 mg corresponden a licopeno por cada 100g de pulpa seca. Dicho rendimiento fue mayor al reportado por Cardona y cols., (600 mg de oleorresina y 55.99 mg de licopeno/100 g de pulpa) debido posiblemente a la extracción secuencial con hexano, etanol, acetona y acetato de etilo. El hexano es un solvente no polar y por lo tanto no extrae tantas sustancias diferentes al licopeno en la oleorresina. Es por eso que este solvente se ha utilizado en diferentes estudios de extracción de licopeno como el trabajo realizado por Engelmann y cols., (2008) quienes utilizaron una mezcla de etanol, hidróxido de potasio (KOH) y hexano para extraer licopeno a partir del jugo de jitomate tras un periodo de homogenización en donde al compararlo con otros métodos en los que utilizaban los mismos solventes pero diferente tiempo de homogenización y cantidad de cada compuesto de la mezcla el rendimiento del extracto fue tres veces mayor (35).

Posteriormente se realizó la identificación del contenido de la oleorresina a través de técnicas de análisis instrumental tales como, cromatografía de capa fina, cromatografía de gases, espectroscopia de infrarrojo, resonancia magnética nuclear de hidrogeno, espectrometría de masas, espectrofotometría de

fluorescencia y de barrido con espectrofotometría de UV-Vis. Mostrando la presencia del licopeno, lo cual coincide con estudios presentados anteriormente como el de Topal y cols. (2006), quienes en su investigación de extracción de licopeno a partir de la piel de jitomate y análisis de solubilidad identificaron por pruebas cromatográficas la presencia de licopeno en un 94% y además la presencia de β -caroteno pero en menor concentración (4% del total de carotenoides de su muestra) (36).

Los datos que se muestran en la gráfica de mediciones de barrido con espectroscopía de UV-Vis confirman que el licopeno está presente en condiciones óptimas. Silverstein (1998) señala que la absorbancia máxima de licopeno en hexano es a 474 nm la cual coincide con las medidas obtenidas en este estudio (37). Además, existen otros estudios que apoyan los resultados obtenidos, como el realizado por Naviglio y cols. (2008) quienes hicieron pruebas de espectroscopia de barrido con UV-Vis y espectrometría de masas, en donde el pico sobresaliente de la gráfica está entre 450 y 500 nm longitud de onda a la que se lee el licopeno en espectroscopía de UV-Vis. Por otra parte sus resultados de espectrometría de masas indicaron resultados parecidos pues el rompimiento de masas muestra el ion molecular del espectro a m/z 537 lo que coincide con los resultados obtenidos en este estudio (38).

En lo concerniente a las gráficas de espectroscopía de infrarrojo los estrechamientos de C-H doble enlace conjugado se encuentra a 3000 cm^{-1} que concuerda con los datos de la bibliografía citada (37) y con trabajos de estudio de compuestos del tomate como el de Nardo y cols. (2009), en donde al hacer la identificación de licopeno en el jugo de tomate por espectroscopía infrarroja sus resultados muestran al igual que en los nuestros los estrechamientos C-H a 3000 cm^{-1} . (39). Sin embargo, su rendimiento de extracción de licopeno fue menor al nuestro pues ellos reportan un 5% de licopeno mientras que en este estudio se obtuvo un rendimiento de 13.12% esto se debe a que ellos hacen su extracción sólo del jugo, y en nuestro caso se hizo extracción de la pulpa y del jugo siendo la pulpa en donde se encuentra la mayor concentración de licopeno.

Todos estos resultados muestran que en la extracción, identificación y cuantificación del licopeno en la oleorresina son reproducibles y comparables con las investigaciones antes mencionadas.

El licopeno debido a la alta conjugación de dobles enlaces presentes en sus moléculas se descompone fácilmente por las condiciones ambientales como la luz, la temperatura y el aire, es por eso que a partir del proceso de extracción se tomaron medidas de protección para el compuesto; se protegió de los rayos luminosos cubriéndolo con papel aluminio, se mantuvo en una atmósfera artificial de nitrógeno una vez obtenido para evitar su oxidación y contaminación, pues la luz favorece reacciones fotoquímicas que cambian la estructura original del carotenoide, el calor influye en reacciones térmicas de degradación y el aire favorece la oxigenación de los dobles enlaces (40).

En cuanto a las pruebas biológicas, primero se realizó la evaluación genotóxica y citotóxica de la oleorresina mediante una administración subaguda del compuesto en dosis de 3 y 30 mg/kg de peso, con la finalidad de descartar algún efecto tóxico ya que es importante recordar que toda sustancia es tóxica a ciertas dosis. Los resultados revelaron que el compuesto no diferencias significativas de EPCMN/ENC y EPC/ENC en comparación con los controles, manteniéndose así a lo largo del experimento, lo que indica que el licopeno no es una sustancia genotóxica ni citotóxica en dosis equivalentes a un consumo normal en la dieta humana. En diferentes estudios se ha comprobado la capacidad antioxidante del licopeno como en el trabajo reportado por Riso y cols. (2004) en donde a 12 sujetos sanos se les dió por 3 semanas una dieta alta en productos derivados del jitomate a través del ensayo cometa sugieren que los productos del jitomate no sólo son buena fuente de licopeno, sino que también son portadores de β -carotenos y de vitamina C. Además, mencionan que un consumo regular de productos del jitomate disminuye el daño al material genético inducido por diferentes especies oxidantes (41).

En virtud de que la oleorresina de licopeno no fue un agente inductor de MN se realizó un estudio con en el cual se evaluó la capacidad antigenotóxica y anticitotóxica de esta frente al daño producido por el B(a)P. Con respecto al B(a)P existen investigaciones en donde lo consideran como una sustancia peligrosa y nociva para la salud. Al estar en contacto largos periodos de tiempo con esta sustancia se ha comprobado que es altamente cancerígeno en animales y en humanos, puede entrar en todos los tejidos del cuerpo que contengan grasa, los tejidos del cuerpo lo transforman en sustancias diferentes y algunas de estas sustancias pueden llegar a ser más dañinas que la original (42).

Para la evaluación de la genotoxicidad en este estudio, se utilizó la prueba de micronúcleos, que es capaz de detectar indirectamente la rotura o pérdida cromosómica para conocer el efecto genotóxico de compuestos como los utilizados en este trabajo, diferentes autores coinciden en que la prueba de micronúcleos es de gran utilidad en este tipo de estudios (29, 31, 43), pues se ha comprobado que dicha prueba es útil para la evaluación de la seguridad toxicológica de nuevos productos farmacéuticos a través de la valoración del daño cromosómico en células anucleadas como es el caso de los eritrocitos, o bien en el citoplasma de células con núcleo como linfocitos.

En el caso particular de Patiño y cols. (2005) (43), en su escrito mencionan el beneficio de utilizar esta prueba para evaluar la capacidad carcinogénica de los compuestos tóxicos del tabaco siendo los más importantes los benzopirenos y dibenzoantracenos en donde al ser activadas estas moléculas tóxicas por sí mismas o alguno de sus metabolitos reactivos forman uniones covalentes de alta afinidad con el material genético, dando lugar a la formación de aductos, y éstos a su vez pueden introducir mutaciones que supongan el inicio de un proceso neoplásico. Una medida de inestabilidad genética inducida por estos compuestos es el incremento en la formación de micronúcleos, visibles fácilmente ante el microscopio; como los resultados presentados en esta investigación en donde la frecuencia de ENCMN indica que el B(a)P a dosis de 200mg/kg, produjo un efecto genotóxico significativo. Además, se han reportado diversos estudios en los

que se involucra la capacidad antioxidante de diversos productos vegetales contra el daño producido por compuestos como el B(a)P, tal es el caso del estudio realizado por Edenharder y cols. (2003) quienes evaluaron la capacidad protectora de extractos de alimentos como el durazno, espinacas, uvas y alcachofas ante el daño producido por el B(a)P a dosis de 150mg/kg, dosis cercana a la utilizada en este estudio, se realizaron cuentas de EPCMN por ser un estudio agudo y mostraron que estos extractos tienen capacidad genoprotectora al disminuir en un 73% la frecuencia de EPCMN, mencionan que esta capacidad antigenotóxica se debe a que estos vegetales son ricos en flavonoides, antocianinas, ácidos polifenólicos, carotenoides, terpenos, vitaminas y minerales todos estos con acción antioxidante (44). Resultados comparables con los obtenidos en esta investigación en donde el promedio del porcentaje de protección obtenido con la oleorresina fue de 70.2. Por otro lado, otro estudio que también apoya nuestros resultados es el realizado por Scolastici y cols. (2008) quienes evaluaron la acción antimutagénica y anticarcinogénica del licopeno en el material genético de células hepáticas humanas producto de la exposición a H₂O₂ y a la N-nitrosodietilamina (45). En este caso el licopeno redujo significativamente la genotoxicidad y mutagenicidad en dichas células, determinado a través de los ensayos cometa y de micronúcleos, sugiriendo que el licopeno es un agente adecuado en la prevención del daño producido en el ADN por agentes genotóxicos. Además, es importante mencionar que se han hecho estudios en los cuales se ha utilizado al licopeno como agente quimioprotector ante diferentes situaciones de daño en distintas partes del organismo arrojando buenos resultados; se ha utilizado como antiinflamatorio en edema e isquemia hepática mostrando efectos benéficos; también lo han utilizado en taño testicular causado por isquemia en donde se comprobó que el licopeno puede ser utilizado como terapia alternativa pues disminuyó estrés oxidativo asociado a problemas de infertilidad y obstrucción testicular (46, 47).

La capacidad anticitotóxica de la oleorresina de licopeno se vio reflejada en nuestros resultados en donde la dosis de 30mg/kg mostró mayor porcentaje de protección (34%) a las 456 h (periodo de recuperación) ante el daño provocado

por el B(a)P a 200mg/kg. Debido a lo anterior es importante recomendar el consumo de jitomate (*Lycopersicum esculentum*) y subproductos de éste como una alternativa para la prevención y tratamiento en distintos tipos de cáncer por sus propiedades antioxidantes. Asimismo, es conveniente continuar con esta línea de estudio para descubrir mayores beneficios de este carotenoide al confrontarlo con otro tipo de mutágenos a los cuales el organismo está expuesto cotidianamente.

13.CONCLUSIONES

- Se comprobó la reproducibilidad de la técnica de extracción de la oleorresina del jitomate (*Lycopersicum esculentum*) mediante extracción hexánica en Soxhlet, se obtuvo un rendimiento de 13.12%.
- Se identificó la presencia del licopeno en la oleorresina mediante las técnicas espectrofotométricas de UV-VIS, IR, fluorescencia, RMN, EM, cromatografía de gases debido a su absorción característica, cuyas evidencias se registraron a 475 nm, 3000cm^{-1} , 3000nm, a campo alto las señales de metilo y a campo bajo los grupos conjugados que corresponden al licopeno, m/z 536.43, 2.57min, respectivamente.
- 200 mg/kg de benzo(a)pireno son suficientes para inducir genotoxicidad y citotoxicidad en eritrocitos de sangre periférica de ratones CD1+.
- La oleorresina obtenida no fue genotóxica ni citotóxica en las dosis establecidas en el presente estudio.
- La oleorresina redujo significativamente la genotoxicidad producida por el benzo(a)pireno durante el periodo de tratamiento y de recuperación.
- En el periodo de recuperación, el licopeno en las tres dosis empleadas (3, 10 y 30 mg/kg) disminuyó la citotoxicidad del benzo(a)pireno.
- El efecto antigenotóxico de la oleorresina fue dosis-dependiente.

14.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Día Mundial del Cáncer. Dirección: <http://www.inegi.gob.mx>. Actualización: 03/02/05. Acceso: 26/09/08.
2. Navarro, A. 2003. Efecto del ambiente de la génesis del cáncer. *Gastr.* 14:163-166.
3. Nava, Ch. G., Ortiz, E.,R., Reyes, G. D., Reynoso, V. J. 2009. Epidemiología de la Enfermedades Crónico Degenerativas. En: *Los Antioxidantes y las Enfermedades Crónico Degenerativas*. 1ra Edición (ed) Enrique Rivas Paniagua. UAEH, Hidalgo, México.pp:287-290.
4. Graciani, C. E. 2006. Carotenoides. En: *Los Aceites y Grasas: Composición y propiedades*. 1ra edición (ed) Mundi Prensa, Madrid España. pp: 119-129.
5. Johnson E.J., 2002. The role of carotenoids in human health. *Nutr Clin Care.* 5:47–49.
6. García, A. J., Jacob, K., Iniesta, M. D., Martínez, G. M., Periago, M. 2007. Evolución de compuestos bioactivos durante la maduración del tomate. V *Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones* 1:481-489.
7. Carotenoids in prepared, processed and stored foods. Dirección: <http://www.mostproject.org/pdf/carrots2.pdf>. Actualización: 01/1997. Acceso: 27/09/08.
8. Mendoza, H., Tabares, J. M., Jiménez, M. 2000. Estudio del contenido en licopeno de diferentes variedades de tomate. *Rev. Frutas, hortalizas, flores, plantas ornamentales y de viveros.* 19:40-45.
9. Martínez, I. 2000. Quimiopreención del Cáncer. *Rev. Cubana Oncol.* 16: 67.
10. Dekker, M. 2002. Carcinogénesis, Mutagénesis and Teratogénesis. En: *Handbook of Food Toxicology*, Ney Cork, pp 64-67.
11. Bepler, G. (1999). Lung cancer epidemiologic and genetics. *J. Thorac Maging.* 14:228-234.
12. Hartwig, A., Shewerdtle, T. 2002. Interactions by carcinogenic metal compound with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicol Lett.* 127:47-54.

13. Augusti, P., Conterato, G. M., Somacal, S., Einsfld, L., Ramos, A. T., Hosomi, E. Y., Graca, D. L., Emmanuelli, T. 2007. Effect of Lycopene on Nephrotoxicity induced by Mercuric Chloride in Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 100:398-402.
14. Ferreira, A. L., Favero, D. M., Munhoz, M. C., Souza, N., Correa, R. C., Jama, E., Shiguero, L., Bojkian, B., Placido, M. S. 2007. Tomato-oleoresin supplement prevent induced cardiac myocyte oxidative DNA damage in rats. *Mutat Res* 631:26-35.
15. Scolastici, C., Alves, R. O., Barbisam, L. F., Ferreira, A. L., Ribeiro, D. A., Salvadori, D. M. F. 2007. Actividad del licopeno contra el daño inducido a celulas ovaricas de hamster chinos. Departamento de patología, *Tox in Vitro* 21:840-845.
16. Guttenplan, J. B, Chen, M., Kosinska, W., Thompson, S., Zhao, Z., Cohen, L. A. 2001. Division of Basic Sciences/Biochemistry, New York University, *Den Cent Cancer Lett.* 10;164:1-6.
17. Ateşşahin, A., Türk, G., Karahan, I., Yilmaz, S., Ceribaşı, A. O., Bulmuş, O. 2006. Lycopene prevents adriamycin-induced testicular toxicity in rats. *Fertil Steril.* 1:1216-22
18. Brunet, M., Codina, C., Mariano, E. L., Rivas, J. 1995. Importancia clínica de los metabolitos de ciclosporina A (CsA) en transplante de órganos. *Farm hosp.* 19:155-160.
19. Atessahin, A., Ceribasi, O. A., Yilmaz, S. 2007. Lycopene prevents adriamycin-induced testicular toxicity in rats. *Basic Clin Pharm Toxic* 100:372-376.
20. Srinivasan, M., Sudheer, A. R., Pillai, K. R., Kumar, P. R., Sudhaharan, P. R., Menon, B. P. 2007. Antioxidant Activity of Lycopene. *Biochim Biophys Acta* 1770:659-65
21. Sengupta, A., Ghosh, S., Das, S. 2003. Tomato and garlic can modulate azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Eur J Cancer Prev* 12:195-200.
22. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). 1995. En: *Reseña toxicológica de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)*. GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública.

23. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en los alimentos. Dirección: <http://www.gencat.cat/salut/acsa/Du12/html/es/dir1592/doc17274.html>.
Actualización: 18/08/2008. Acceso: 18/03/2009.
24. Díaz, B. M., Bustos, L. M., Espinosa, R. A. 2004. Conceptos generales. En: Pruebas de Toxicidad Acuática Fundamentos y Métodos. 1ra Edición. (ed) Unilibros. Colombia. pp: 24-26
25. Fichas Internacionales de Seguridad Química. Benzo(a)pireno. Grupo prevenir consulting. Dirección: <http://www.grupoprevenir.es/fichas-seguridad-sustancias-quimicas/0104.htm>. Actualización: 07/2009. Acceso: 03/08/2009. ICSC 0104.
26. Martín, R. A., Rodríguez, G. I., Rubio, C., Revert, C., Hardisson, A. 2004. Efectos Tóxicos del Tabaco. *Rev Toxicol.* 21: 64-71.
27. Análisis Instrumental. Dirección: <http://asesoria.qfb.umich.mx> Actualización: 18/05/09 Acceso: 17/06/09.
28. Arencibia, A. D., Rosario, F.L. 2003. Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos *in vitro*. *Retel.* 24-41.
29. MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Henika, P. R., Shelby, M. D. 1990. The in vivo erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies. *Fundam Appl Toxicol.* 14:513-22.
30. Schlegel, R., Mac Gregor J. 1983. A rapid screen for cumulative chromosomal damage in mice accumulation of circulating micronucleated erythrocytes. *Mutat. Res.* 113, 481-487.
31. Madrigal, B. E., Álvarez, G. I, Molina, J. D., Moreno, L. M. 2002. El estudio de micronúcleos en la evaluación del daño producido por agentes ambientales. En: *Temas de actualidad en microbiología, ambiente y salud*. Roche G.R., Martínez L.I., López O.J.F. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México pp. 267-287.
32. Salomone, F., Tice, R., Wild, D. 1987. Guidelines for the conduct of micronucleous assay in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutat. Res.* 189, 103-112.

33. Chaubey, R. C., Bhilwade, H. N., Chauhan, P. S. 1993. Studies on the migration of micronucleated erythrocytes from bone marrow to the peripheral blood in irradiated Swiss mice. *Int. J. Radiat. Biol.* 63, 239-245.
34. Cardona, E., Rios, L., Restrepo M. 2006. Extracción del caroteno de licopeno del tomate Chonto. *Rev. Fac Quim Farm* 13(2):44-53.
35. Engelmann, N.J., Hua L.C.H., Lila M., Erdman J. 2008. Optimization of Lycopene Extraction from Tomato Cell Suspension Culture By Response Surface Methodology. *J Agric Food Chem.* 56(17):7710-7714.
36. Topal U., Sasaki M., Goto M., Hayakawa K. 2006. Extraction of Lycopene from Tomato Skin with Supercritical Carbon Dioxide: Effect of Operating Conditions and Solubility Analysis. *J. Agric. Food Chem.* 54, 5604-5610.
37. Silverstein, R. M., Clayton, B. G., Morrill, T. C. 1991. Characteristic group absorptions of organic molecules. En: *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 5th Edition. (ed) Dennis Sawick. John Wiley & Sons, Inc., New York, United States of America, pp: 106, 107, 299.
38. Naviglio, D., Caruso, T., Iannece, P., Aragón, A., Santini, A. 2008. Characterization of High Purity Lycopene from Tomato Wastes Using a New Pressurized Extraction Approach. *J. Agric. Food Chem.* 56, 6227–6231.
39. De Nardo, T., Shiroma, K.C., Halim, Y., Francis, D., Rodríguez, S.L. 2009. Rapid and Simultaneous Determination of Lycopene and β -Carotene Contents in Tomato Juice by Infrared Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1105–1112
40. Martínez, M. A., 2003. Carotenoides. *Universidad de Antioquía Medellín*. 1:2-10.
41. Riso, P., Vissoli, F., Erba, D., Testolin, G., Porrini, M. 2004. Lycopene and vitamin C concentrations increase in plasma and lymphocytes after tomato intake. Effects on cellular antioxidant protection. *Eur J Clin Nutr.* 58:1350-8.
42. Resumen de Salud Pública, Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP). *Servicio de Salud Pública Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades*. Dirección: http://www.atsdr.cdc.gov/es/es_index.html. Actualización: 11/02/2009. Acceso: 10/02/2009.

43. Patiño, A., Sierrasesúmaga, L., Zalacain, M. 2005. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *SSN* 28:227-236.
44. Edenharder, R., Krieg, H., Köttgen, V., Platt, K.L., 2003. Inhibition of clastogenicity of benzo[a]pyrene and of its *trans*-7,8-dihydrodiol in mice in vivo by fruits, vegetables, and flavonoids. *Mutation Research* 537: 169–181.
45. Scolastici, C., Alves de Lima, R.O., Barbisan, L. F., Ferreira, A. L., Ribeiro da, Salvadori, D. M. 2008. Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test. *Toxicol In Vitro*. 22:510-4.
46. Bignotto, L., Rocha, J., Sepodes, B., Eduardo, F. M., Pinto, R., Chaud, M., Carvalho, J., Moreno, H., Mota, F. H. 2009. Anti-inflammatory effect of lycopene on carrageenan-induced paw oedema and hepatic ischaemia–reperfusion in the rat. *Br J Nutr*. 102:126-33.
47. Hekimoglu, A., Kurcer, Z., Aral, F., Baba, F., Sahna E., Atessahin, A. 2009. Lycopene, an Antioxidant Carotenoid, Attenuates Testicular Injury Caused by Ischemia/Reperfusion in Rats. *Tohoku. Exp. Med*. 218, 141-147.

ANEXOS

En las siguientes tablas se muestra el contenido de licopeno en alimentos diferentes al jitomate (tabla 2) y en subproductos de éste (tabla 3).

NOMBRE CIENTÍFICO	ALIMENTO	TIPO	mg/100gr
<i>Lycopersicum esculentum</i>	Jitomate	Fresco	0.88-7.74
<i>Citrillus lanatus</i>	Sandía	Fresco	2.30-7.30
<i>Prunus armeniaca</i>	Albaricoque	Fresco	0.005
<i>Prunus armeniaca</i>	Albaricoque	Enlatado	0.065
<i>Prunus armeniaca</i>	Albaricoque	Deshidratado	0.86
<i>Citrus paradisi</i>	Toronja	Fresco	3.36

Tabla 2.- Contenido de licopeno en los principales alimentos que contribuyen a su ingesta en la dieta.

¹ CLINTON (1998).

² NGUYEN y SCHWART (1999).

³ Valores de licopeno más altos en las muestras de tomate recogidas en verano (3.8-6.6 mg/100g) que en las recogidas en invierno (2.6-3.2 mg/100 g) (ILSI, 1999).

⁴ POTER y LINCOLN, (1950).

⁵ USDA (1998)

ALIMENTO	TIPO	mg/100g	RACIÓN	mg/RACIÓN
Jitomates	Fresco	3.1-7.74	130g	4.03-10.06
Jitomates	Enlatado	11.21	125g	14.01
Jugo de jitomate procesado	Procesado	7.83	240mL	19.58
Sopa de jitomate	Concentrado	3.99	245mL	9.77
Pasta de jitomate	Enlatado	30.07	30g	9.02
Salsa de jitomate	Procesado	9.28	40g	3.71
Salsa Ketchup	Procesado	16.60	20g	3.32
Salsa de spaghetti	Procesado	17.50	125g	21.88
Salsa de pizza	Enlatada	12.71	125g	15.89
Salsa de pizza	En la pizza	32089	30g	9.87

Tabla 3.- Contribución del tomate y sus productos procesados a la ingesta de licopeno en la dieta. (Adaptado de NGUYEN y SCHWARTZ 1999).

GLOSARIO

Absorbancia: Cantidad de intensidad de luz que absorbe una muestra.

Aducto: Complejo que se forma cuando un compuesto químico se une a una molécula biológica, como ADN o proteínas.

Antioxidante: Molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas que se da a través de la transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante.

Benzo(a)pireno: es un hidrocarburo policíclico aromático potencialmente carcinógeno (a-benzopireno) y que contienen algunos alimentos, como las carnes y el pescado.

Cáncer: Es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células. Puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo.

Carotenoides: Son pigmentos orgánicos que se encuentran de forma natural en plantas y otros organismos fotosintéticos como algas, algunas clases de hongos y bacterias.

Citotoxicidad: Es la cualidad de ser tóxico a células.

Eritropoyesis: Proceso de formación de los eritrocitos que, en el adulto normal se realiza íntegramente en la médula ósea.

Espectrofotometría: Métodos cuantitativos de análisis químico que utilizan la luz para medir la concentración de las sustancias químicas.

Genotoxicidad: La genotoxicidad es la capacidad relativa de un agente de ocasionar daño en el material genético, originando efectos biológicos adversos.

Lycopeno: Es un pigmento vegetal, soluble en grasas, que aporta el color rojo característico a los tomates, sandías y en menor cantidad a otras frutas y verduras. Pertenece a la familia de los carotenoides como el β -caroteno, sustancias que no sintetiza el cuerpo humano, sino los vegetales y algunos microorganismos, debiéndolo tomar en la alimentación como micronutriente.

Metástasis: Propagación de un foco canceroso a un órgano distinto de aquel en que se inició.

Micronúcleos: Los micronúcleos son cuerpos citoplasmáticos de naturaleza nuclear, se corresponden con material genético no incorporado correctamente a las células hijas durante la división celular, reflejan aberraciones cromosómicas y

se originan por roturas cromosómicas, por errores durante la replicación y posterior división celular del ADN y/o por la exposición a agentes genotóxicas.

Mutágeno: Una sustancia o agente físico que causa mutaciones, es decir, que altera de forma permanente el ADN de las células.

Neoplasia: Proliferación de células, de manera persistente y anormal y relativamente autónoma de una serie de alteraciones estructurales en determinadas células con capacidad de transmisión a otras células.

Oleoresina: Extracto natural procedente de las plantas, o una preparación líquida natural aromática, extraída de materia botánica usando solventes. Está formada casi en su totalidad por una mezcla de aceite esencial y resina.

Quimioprevención: Utilización de sustancias químicas, naturales o sintéticas que ayuden a revertir, detener o prevenir el proceso carcinogénico.

Soxhlet: Es un tipo de material de vidrio utilizado para la extracción de compuestos, generalmente de naturaleza lipídica, contenidos en un sólido, a través de un solvente afín.

PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE LICOPENO

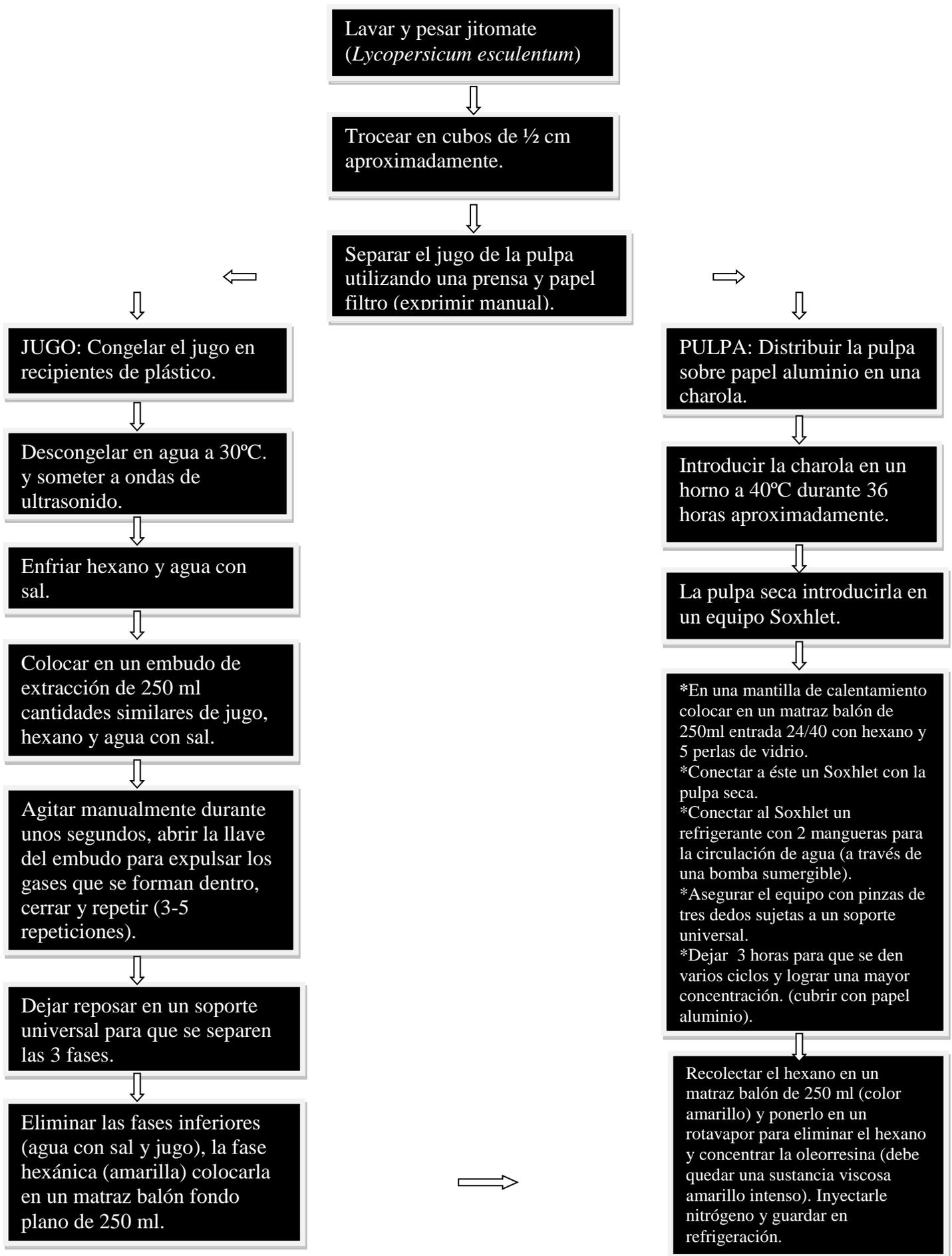




Figura 16. Jitomate y jugo



Figura 17. Secado de la pulpa de jitomate

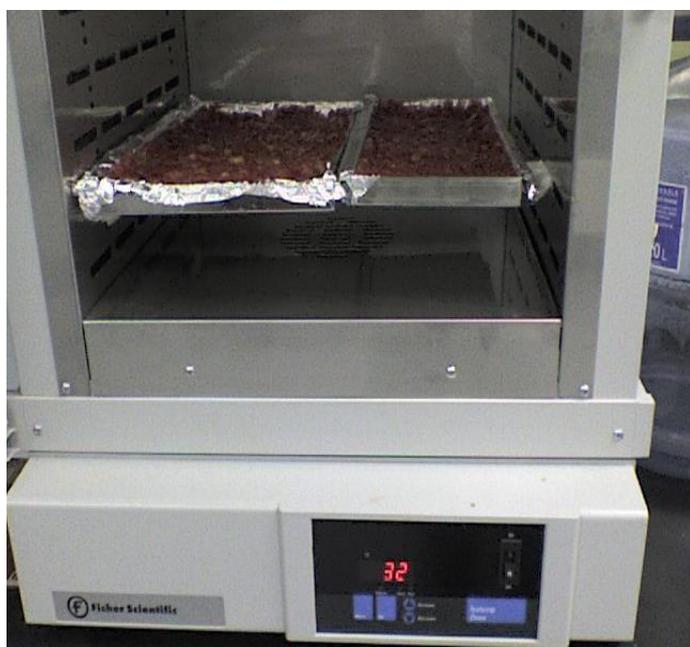


Figura 18. Secado de la pulpa de jitomate



Figura 19. Extracción Soxhlet



Figura 20. Hexano



Figura 21. Evaporación del hexano



Figura 22. Administración de la oleoresina



Figura 23. Elaboración de frotis sanguíneo



Figura 24. Tinción de los frotis

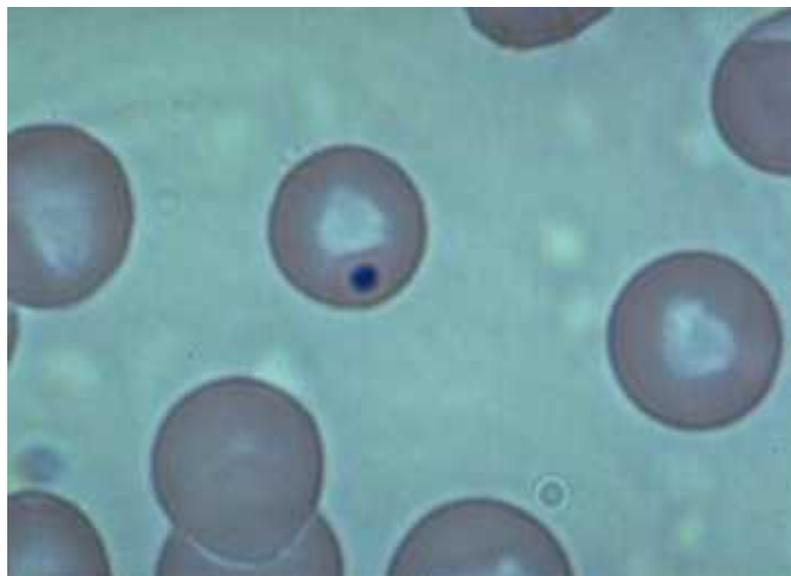


Figura 25. Eritrocito normocrómico micronucleado