

EVALUACIÓN DE LA CITOGENOTOXICIDAD DE UNA CERVEZA ELABORADA INDUSTRIALMENTE Y UNA CERVEZA DE ELABORACIÓN ARTESANAL

EVALUATION OF THE CYTOGENOTOXICITY OF AN INDUSTRIALLY BREWED BEER AND A CRAFT BEER

Arturo Rosas-Cipriano^{1,1,2*}, Saúl Flores-Maya^{2,1}, Héctor Barrera-Escorcia^{3,2}, Sandra Gómez-Arroyo^{4,3}, Norberto Alarcón-Herrera^{5,1} y Agustín Ruíz Cabrera^{6,4}

¹Laboratorio de Recursos Naturales, UBIPRO, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. De los Barrios, No.1 Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, México, 54090. *Correspondencia al autor: arturorosas.cip@gmail.com, saulsel@unam.mx, nor_hammettesp@hotmail.com

²Laboratorio de Microscopia, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. De los Barrios, No.1 Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, México, 54090. hectorbarrera@hotmail.com

³Laboratorio de Genotoxicología Ambiental, Centro de Ciencias de la Atmósfera, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, D.F., México. slga@atmosfera.unam.mx

⁴Laboratorio de Medicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. De los Barrios, No.1 Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, México, 54090. ruizcabrera@gmail.com

ABSTRACT

Beer is a complex beverage, due to the extended variety of dissolved constituents which interact with each other and may change rapidly from the moment of exposure to the environment. Much has been said about the impact on human health on the consumption of beer; excessive intake can lead to health problems, on the contrary with the moderate intake can significantly reduce DNA damage. The importance of short-term tests for carcinogens and mutagens (micronucleus test) is feasible to be applied in risk analysis and quality control of commercial alcohol beverages. The objective of this study was to evaluate the genotoxic effects in vivo of two different types of beers using *Vicia faba* micronucleus test. Faba beans were used (*Vicia faba* var. *minor*) that were exposed for 24, 48, 72 and 120 hours to the chemical composition of a mass-produced beer and craft beer. The cytogenotoxic effect from the beers was evaluated in root meristematic cells. Cycloheximide (5 μ g/ml), 3.6% ethanol (v/v) and 7.5% (v/v) were used as positive controls. Data were applied by analysis of variance with individual comparisons (Dunnett's test) with a significance criterion of $p < 0.05$. The results allowed to establishing that treatments for the mitotic index and the frequency of micronuclei in meristematic cells had significant differences compared to the negative control. In conclusion, the chemical components of these alcoholic beverages and acetaldehyde derived from metabolized ethanol by the root meristematic cells of *V. faba* did not induce high frequencies of micronuclei, in other words, they were slightly genotoxic and mildly toxic by decreasing or increasing of cell division on root meristem cells of *V. faba*.

Key words: *Vicia faba*, cytogenotoxic, polyphenols, cycloheximide, micronucleus.

Manuscrito recibido el 05 de junio de 2015, aceptado el 02 de diciembre de 2015.

RESUMEN

Se ha hablado mucho respecto al impacto sobre la salud humana provocado por el consumo de la cerveza. Una ingesta excesiva puede traer consecuencias a la salud humana y por el contrario la ingesta moderada de alcohol puede disminuir significativamente el daño al ADN. La importancia de las pruebas de corta duración para los carcinógenos y mutágenos (ensayo de micronúcleos) es factible de ser aplicado en el análisis de riesgos y control de calidad de las bebidas comerciales como la cerveza. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto genotóxico *in vivo* de dos tipos de cervezas con el ensayo de micronúcleos en *Vicia faba*. Se emplearon semillas de haba (*Vicia faba* var. minor) que fueron expuestas por 24, 48, 72 y 120 horas a los componentes químicos de una cerveza elaborada industrialmente y otra de manera artesanal. Se evaluó el efecto citogenotóxico de las cervezas en células meristemáticas de raíz. La cicloheximida (5 ug/ml), el etanol 3.6% (v/v) y 7.5 % (v/v) fueron utilizados como testigos positivos. A los datos se les aplicó un análisis de varianza con comparaciones individuales (prueba de Dunnett) con un criterio de significación de $p < 0.05$. Los resultados permitieron establecer que los tratamientos para el índice mitótico y la frecuencia de micronúcleos en células meristemáticas tuvieron diferencias significativas comparadas con el testigo negativo. En conclusión, los componentes químicos de estas bebidas alcohólicas y el acetaldehído derivado del etanol metabolizado por las células de *V. faba* no inducen frecuencias altas de micronúcleos, es decir fueron ligeramente genotóxicas y levemente tóxicas ya que disminuyeron o incrementaron la división celular de células meristemáticas de *V. faba*.

Palabras clave: *Vicia faba*, citogenotóxico, polifenoles, cicloheximida, micronúcleos.

INTRODUCCIÓN

La cerveza es una bebida compleja por la gran variedad de componentes disueltos en ella, mismos que interactúan entre sí y que pueden transformarse rápidamente desde el momento de estar en contacto con el ambiente. Aunque se han llegado a reportar un gran número de sustancias distintas en la cerveza (mayor a 400) los componentes comunes en ella son: proteínas y aminoácidos (de importancia en la fermentación son prolina y lisina), minerales como el zinc o silicio, vitaminas, ácidos orgánicos que pueden variar de 200 a más de 500 ppm y derivados en concentraciones traza (Hough et al., 1981; Sendra y Carbonell, 1999; Varela, 2009).

Ferk et al., (2010) mostraron que la ingestión de xanthohumol, un flavonoide presente en la cerveza y derivado del lúpulo, reduce en un 44-50% la formación de neoplasias generadas por amino-3-metil-imidazol [4,5-f] quinolina en hígado y colon de rata; además disminuye significativamente el daño al ADN en células de hígado y colon, este efecto lo presentó a concentraciones de 71 µg/kg diluido en agua.

Zhao et al., (2010), identificaron ácidos fenólicos y otros flavonoides presentes en cerveza, además establecieron que tales flavonoides contribuyen en conjunto a la actividad antioxidante en un 88%, algunos ejemplos de ácidos fenólicos encontrados en cervezas mexicanas comerciales son: ácido gálico, ácido protocatechuico, ácido catechin, ácido vanílico, caféico, sirínico, epicatechin, cumáico y ferúlico.

Ivett et al., (1992) evaluaron la capacidad del extracto de cuatro cervezas comerciales para inducir intercambio de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas y mutaciones en ovocitos de criceto chino (CHO) con y sin activación metabólica. Los extractos finales representaban una concentración 225 veces mayor que la mezcla de cervezas original. No obtuvieron resultados positivos. Solamente en un estudio preliminar realizado por estos investigadores, la cerveza sin activación metabólica mostró un posible daño al ADN. Sin embargo, este resultado no se considera

de importancia biológica o estadísticamente significativo. Aunque estos autores manifiestan su intriga al respecto.

Diferentes compuestos mutagénicos pueden estar presentes en la cerveza de manera natural o por contaminación en alguna fase del proceso de elaboración y envasado. Ejemplo de ello son la N-nitrosodimetilamina, N-etil-nitrosoguanidina y el uretano (Lijinsky, 1999; Yurchenko et al., 2005); también se pueden encontrar metales pesados como aluminio, el cual se ha reportado para cervezas mexicanas con 7.78 ppb (Blanco et al., 2010); micotoxinas (Bertuzzi et al., 2011); y otros compuestos no deseados en la cerveza como proteínas llamadas genéricamente gluten (Guerdrum et al., 2011), cloropropanoles y poliestrónos (Bamforth, 2002).

De este modo estos estudios sobre la toxicología de bebidas alcohólicas han puesto en entre dicho la seguridad y salud de la población evidenciando la exposición cotidiana a compuestos tóxicos presentes en las cervezas. Considerando lo anterior, estas investigaciones pretenden provocar el interés de la industria de alimentos y bebidas para integrar estos ensayos de genotoxicidad a sus procedimientos de aseguramiento de calidad o evaluación de riesgo.

Los ensayos con *Vicia faba* generalmente se orientan a evaluar contaminantes ambientales desde hace más de 50 años, esto es debido a que es una planta que posee un proceso de germinación rápido, un complejo cromosómico de $2n=12$ y la longitud de sus cromosomas es grande. Además, las células meristemáticas de las habas se utilizan como bioindicadoras de genotoxicidad debido a su sensibilidad para cuantificar las alteraciones cromosómicas o celulares provocadas por los efectos causados al exponerlas a agentes físicos o químicos. Es una planta con un ciclo celular corto: 19.3 h donde 2 horas se ocupan para el proceso de la mitosis, y sus raíces poseen una proporción alta de células en diferentes estados de la mitosis (Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini, 1995; El Hajjouji et al., 2007; Bu et al., 2011; Patlolla et al., 2012).

Por tanto, este estudio tuvo el siguiente planteamiento del problema ¿Qué efectos genotóxicos tiene una cerveza en células vegetales?, y considerando que el proceso de elaboración determina la naturaleza físico-química de una bebida ¿Qué tipo de cerveza es más tóxica en células vegetales? Por lo que se planteó la siguiente hipótesis: La industrialización y estandarización del proceso artesanal de elaboración son factores vinculados a la genotoxicidad de la cerveza. Debido a lo anterior, este trabajo tuvo como objetivo conocer la genotoxicidad de una bebida alcohólica elaborada industrialmente y otra manufacturada artesanalmente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Cicloheximida (3-[2-(3,5-Dimethyl-2-oxocyclohexyl)-2-hydroxyethyl]glutarimide) 94% de pureza, obtenido de Sigma-Aldrich, USA. Alcohol etílico 96° sin desnaturalizar, proporcionado por Consorcio Luman S.A. de C.V., México. Sustancia tóxica de referencia utilizada como testigo positivo.

Se obtuvieron dos tipos de cerveza que difieren en su proceso de elaboración e impacto comercial. La primera es una de las más vendidas tanto en México como a nivel internacional (cerveza industrializada). Es una cerveza lager transparente y de tipo pilsner. La segunda es elaborada manualmente, con un mercado local y creciente en el centro de la República Mexicana (cerveza artesanal oscura).

Germinación

Las semillas de *V. faba* (var. minor) fueron desinfectadas por 3-5 min en una solución de hipoclorito de sodio 5%, se enjuagaron cuatro veces con agua destilada. Inmediatamente fueron embebidas durante 12 h en agua destilada. Posteriormente se pusieron a germinar entre dos capas de algodón humedecido a 22°C por cinco días. La parte experimental inició cuando las raíces alcanzaron un tamaño entre 2 y 3 cm de longitud.

Tratamientos

Se formaron 12 grupos experimentales con cuatro plántulas cada uno y distribuidos al azar en dos tratamientos: seis grupos para la evaluación de micronúcleos (MCN) y seis para el análisis de aberraciones cromosómicas, designándolos de la siguiente manera: grupo testigo positivo (plántulas suspendidas sobre una solución de 5 µg/ml de cicloheximida), testigo negativo (plántulas suspendidas en agua destilada), grupos solución vehículo (y al mismo tiempo testigos positivos) etanol en concentraciones de 3.6% y 7.5% (v/v). Estos grupos fueron agregados considerando que el alcohol es reportado en la literatura como una sustancia tóxica y con efectos sobre la genética de los organismos como promutageno (Takehisa et al., 1982; Obe y Anderson., 1987; Flores-Maya, 2000). Grupo expuesto a cerveza industrializada (volumen de 15 ml, 3.6% de alcohol) y grupo expuesto a cerveza artesanal (volumen de 15 ml, 7.5% de alcohol). Con el fin de mantener las propiedades físicas y químicas del volumen de las cervezas, el alcohol y agua de cada uno de los tratamientos fueron remplazados cada 24 h durante cinco días que duró el ensayo. Todos los grupos estuvieron en condiciones de incubación a 22°C ± 1°C y en obscuridad para evitar el incremento de la oxidación o la alteración físico-química de la solución vehículo y las cervezas.

Índice mitótico (IM) y ensayo de micronúcleos (MCN)

Para la determinación de IM y la prueba de MCN se adoptaron los protocolos de Ma et al., (1995) y Patlolla et al., (2012), a los que se realizaron algunas modificaciones (descritas a continuación).

Después de 24, 48, 72 y 120 h post-tratamiento, las raíces fueron cortadas 1 cm de la zona meristemática y fijadas en solución Farmer (etanol-ácido acético 3:1) y almacenadas a 4°C por 12 h. Posteriormente fueron hidrolizadas en HCL 1N a 60°C por cinco minutos. Una vez hidrolizadas, las raíces se cortaron aproximadamente 2 mm de la zona meristemática y fueron maceradas sobre un portaobjetos. Las células fueron teñidas con aceto-orceina al 1%. Finalmente se realizó el aplastamiento en monocapa ("squash") utilizando un cubreobjetos para dispersar las células con la finalidad de observar al microscopio (Ma et al., 1995; Patlolla et al., 2012). La frecuencia de micronúcleos (MCN) fue expresada en términos del número de células con MCN/2000 células contabilizadas por raíz en un microscopio óptico Nikon LABOPHOT-2 a un aumento de 100x. Las células fueron fotografiadas y analizadas con un programa proporcionado por la Universidad de Texas (UTHSCSA Image Tool para Windows Versión 3.00).

Simultáneamente se contabilizó la frecuencia de células con anomalías cromosómicas y el número de células en división mitótica. IM fue calculado utilizando la fórmula %IM= No de células en I+P+M+A+T/2000 X100 (parámetro usado para evaluar la citotoxicidad) y las anomalías cromosómicas fueron calculadas empleando la fórmula %Alteraciones =No de alteraciones totales/2000 x100 (Ma et al., 1995; Patlolla et al., 2012).

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando un ANOVA de un factor (α 0.05). Los valores medios obtenidos por los diferentes tratamientos fueron comparados estadísticamente usando una prueba de comparación múltiple conocida como Dunnett (α 0.05).

RESULTADOS

Variación del IM y frecuencia de MCN

Los resultados de la ANOVA fueron: $F_{(obs)}=43.10 > F_{\alpha,0.05}_{16,83}=1.76$ y $F_{(obs)}= 6.72 > F_{\alpha,0.05}_{16,83}=1.76$ para % de IM y % de MCN, respectivamente. Los resultados de toxicidad muestran diferencias significativas entre las medias de todos los tratamientos. Por tanto, se procedió a la aplicación de la prueba de comparación múltiple de Dunnett utilizando un nivel de confianza de α 0.05 (Tabla 1). Se determinó que en las células meristemáticas hubo un incremento significativo en la división mitótica por la exposición durante 24, 48, 72 y 120 h en la bebida de la cerveza artesanal (Fig. 1A).

Tabla 1. Efecto sobre la proporción de células en división mitótica (%IM) y en la frecuencia de micronúcleos (%MCN) en células meristemáticas de *V. faba* debido a la exposición de cerveza elaborada industrialmente y de manera artesanal. Diferencia significativa $p < 0.05$ con prueba ANOVA de un factor y **Múltiple de Dunnett con testigo negativo.

Tratamientos (H)	Media \pm Desv. Est. % IM	Media \pm Desv. Est. % MCN
testigo negativo	21.57 \pm 6.4	0.09 \pm 0.61
Cicloheximida (5 μ g/ml)		
24	2.53 \pm 1.8**	2.21 \pm 0.87**
48	7.75 \pm 5.2**	5.78 \pm 1.81**
72	2.49 \pm 0.9**	1.58 \pm 0.25**
120	3.21 \pm 0.9**	1.83 \pm 0.45**
alcohol 3.6 %		
24	11.59 \pm 1.2**	0.13 \pm 0.05
48	11.51 \pm 2.6**	0.38 \pm 0.21**
72	4.39 \pm 0.6**	0.33 \pm 0.12**
120	6.73 \pm 1.7**	0.27 \pm 0.17
alcohol 7.5 %		
24	8.71 \pm 2.2**	0.68 \pm 0.36**
48	3.72 \pm 2.3**	0.36 \pm 0.22**
72	2.42 \pm 0.5**	0.60 \pm 0.11**
120	3.33 \pm 0.3**	0.33 \pm 0.17**
cerveza industrializada		
24	6.71 \pm 3.3**	0.42 \pm 0.16**
48	3.53 \pm 1.2**	0.17 \pm 0.06
72	5.26 \pm 3.5**	0.37 \pm 0.07**
120	2.52 \pm 1.8**	0.31 \pm 0.20**
cerveza artesanal		
24	52.36 \pm 19.7**	0.32 \pm 0.14**
48	50.37 \pm 6.2**	0.29 \pm 0.15
72	48.28 \pm 10.3**	0.18 \pm 0.12
120	1.08 \pm 0.9**	0.23 \pm 0.08

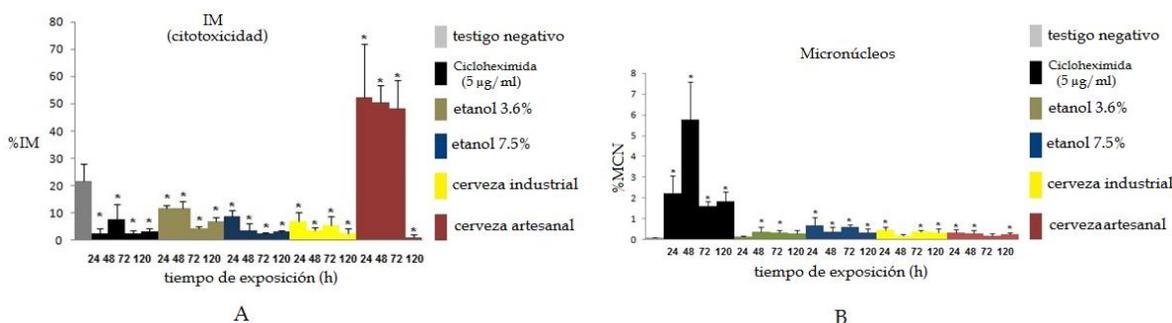


Fig. 1. Efecto sobre la proporción de células en división mitótica (A) y en la frecuencia de micronúcleos, (B) en células meristemáticas de *V. faba* causado por exposición a las cervezas. Diferencia significativa $p < 0.05$ en prueba ANOVA de un factor y *múltiple de Dunnett con testigo negativo.

La frecuencia de células mitóticas radiculares disminuyó respecto al tiempo en los grupos expuestos a la Cicloheximida, alcohol (3.6%), alcohol (7.5%) y cerveza industrializada comparados con el testigo negativo (Fig. 1A). El % de MCN en los tratamientos testigos positivos o las sustancias vehículo, los resultados fueron los esperados, el tratamiento con Cicloheximida (5 µg/ml) y la solución de alcohol al 7.5% (solución vehículo) mostraron un incremento significativo en la frecuencia de micronúcleos en las células meristemáticas de *V. faba*. El alcohol al 3.6% tuvo un efecto significativo a las 48 y 72 h.

El tratamiento con cerveza industrial presentó diferencias significativas en el porcentaje de MCN respecto al porcentaje de MCN del testigo negativo (0.09 %) y de acuerdo a los resultados de la prueba de Dunnett, el efecto fue notable a las 24 (0.42%), 72 (0.37%) y 120 (0.31%) horas posteriores a la exposición de la cerveza a las raíces de *V. faba*. En el grupo expuesto a la cerveza artesanal a las 24 h del postratamiento, se presentó un efecto significativo en el incremento de células micronucleadas (0.32%) el que fue disminuyendo con el tiempo (Fig.1B).

Alteraciones cromosómicas

La frecuencia de alteraciones cromosómicas en los grupos expuestos al alcohol (7.5%) tuvo un porcentaje de 0.35, en la cerveza industrial fue de 0.50% y en la cerveza artesanal hubo un incremento de 0.40% respecto al testigo negativo a las 24 h de postratamiento. Los grupos expuestos a la Cicloheximida (5 µg/ml) mostraron un incremento significativo de alteraciones cromosómicas en todos los tiempos (Tabla 2, Fig. 2). Los tipos de alteraciones más frecuentes en todos los grupos fueron puentes. También se observaron yemas nucleares (anormalidad nuclear) (Fig. 3).

Tabla 2. Porcentaje de frecuencia de alteraciones cromosómicas en células meristemáticas de *V. faba* causadas por la exposición a los dos tipos de cerveza. $f_{(obs)}=6.38 > f_{\alpha, 0.05, 5, 18}=2.77$ diferencias significativas en la prueba ANOVA de un factor y **Múltiple de Dunnett con el testigo negativo.

Tratamientos (H)	% Alteraciones cromosómicas Media \pm Desv. Est.
control negativo	0.0 \pm 0.0
Cicloheximida (5 μ g/ml)	
24	0.4 \pm 0.02**
48	0.9 \pm 0.1**
72	0.45 \pm 0.2**
120	0.35 \pm 0.1**
etanol 3.6%	
24	0.20 \pm 0.04
48	0.25 \pm 0.1
72	0.05 \pm 0.09
120	0.05 \pm 0.06
etanol 7.5%	
24	0.35 \pm 0.089**
48	0.20 \pm 0.09
72	0.17 \pm 0.1
120	0.20 \pm 0.1
cerveza industrial	
24	0.50 \pm 0.2**
48	0.25 \pm 0.08
72	0.30 \pm 0.09
120	0.20 \pm 0.007
cerveza artesanal	
24	0.40 \pm 0.2**
48	0.25 \pm 0.05
72	0.30 \pm 0.09
120	0.20 \pm 0.1

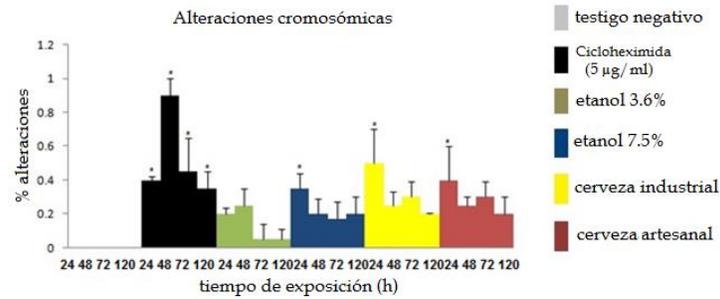


Fig. 2. Porcentaje (%) de la frecuencia de alteraciones cromosómicas en células meristemáticas de *V. faba* expuestas a los dos tipos de cerveza. Diferencias significativas en prueba ANOVA de un factor y **múltiple de Dunnett con el testigo negativo.

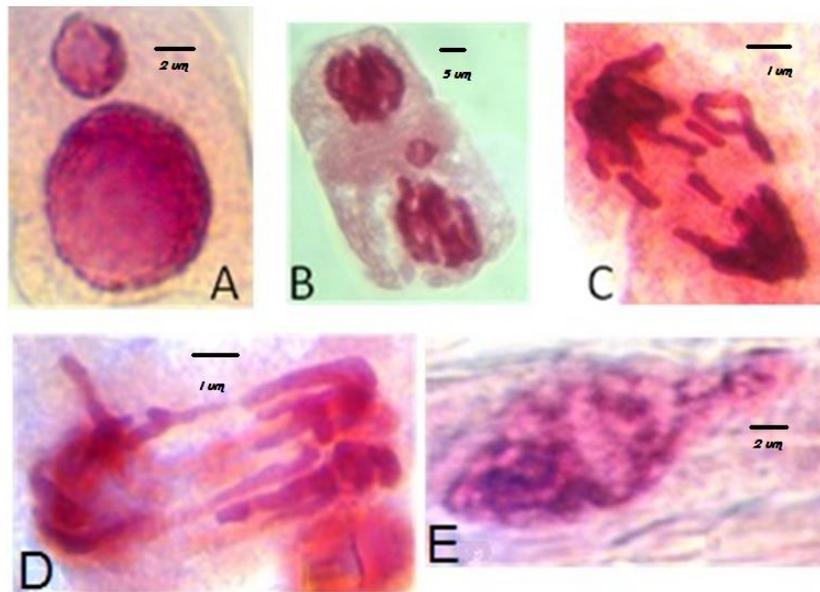


Fig. 3. Alteraciones cromosómicas en meristemos radiculares de *V. faba*. A Micronúcleo interfásico, B Micronúcleo en telofase, C y D Retrasos y puentes cromosómicos y E alteración nuclear llamada yema nuclear.

DISCUSIÓN

Los fabricantes de cerveza no ofrecen información sobre la composición química de sus productos; debido a ello, la importancia de realizar investigaciones sobre los mismos, así, la importancia del presente trabajo radica en la evaluación de las propiedades físicas y químicas de dos productos comerciales. Autores como Alcázar et al., (2002), Asfaw y Grethe (2005) y Pohl (2008) mencionan que los componentes registrados en cervezas son: anhídrido carbónico, etanol, dextrinas glicéricas, minerales, vitaminas, polifenoles, carbohidratos y proteínas.

La citotoxicidad puede ser determinada por la tasa de disminución o aumento de la proporción de las fases mitóticas en las células meristemáticas radiculares de plantas como *V. faba*. En este estudio es evidente que las dos cervezas mostraron un efecto sobre la proporción de estas células con referencia a un lote testigo (agua destilada). Sin embargo, solo la cerveza artesanal tuvo un efecto significativo en la proliferación celular, lo que demuestra que la cerveza artesanal tiene un

efecto fisiológico evidentemente tóxico en la multiplicación celular. Este efecto podría ser causado por el alto contenido de fósforo (P) y potasio (K), esta suposición se basa en trabajos de diferentes investigadores que utilizaron métodos de espectrometría atómica en levaduras de diferentes cervezas; así mismo P y K son los elementos con un contenido importante en todas las muestras estudiadas (concentraciones promedio de 405.7 y 215.83 mg/l, respectivamente), lo que concuerda con Alcázar et al., (2002), Asfaw y Grethe (2005) y Pohl (2008). Alcázar et al., (2002), mencionan que las altas concentraciones de P y K pueden tener su origen en las materias primas (lúpulo, cebada y otros cereales) utilizada en la elaboración de cerveza. La levadura también es una fuente rica de estos metales. Pohl (2008) establece que estos minerales son necesarios para el mantenimiento de la homeostasis de carga (necesario para el crecimiento de la levadura), participación en la osmorregulación y regulación de cationes divalentes y absorción de fosfatos por las células de levadura. Bonilla (2000) menciona que son nutrientes necesarios en el crecimiento de las plantas. P y K ingresan en la planta a través de las capas externas de las células de las raíces secundarias y de la punta de la raíz. Una vez dentro de la raíz P puede quedarse almacenado en ésta área o ser transportado a las partes superiores de la planta. A través de varias reacciones químicas P se incorpora a compuestos orgánicos como ácidos nucleicos, compuestos de adenosina trifosfato y elementos estructurales de la célula como la membrana citoplasmática (PPI, 1999). Por otra parte, K desencadena la activación de enzimas para la producción de adenosina trifosfato (ATP) (Bonilla, 2000); de tal forma que éste aumento de crecimiento y el aspecto saludable de las raíces pudo ser observado durante el tiempo de exposición a la solución de cerveza artesanal.

Por otro lado, el retraso del crecimiento de las raíces expuestas a la Cicloheximida (testigo positivo) y a las dos concentraciones de etanol (solución vehículo, también testigo positivo) y cerveza industrial (concentración de alcohol 3.6%) se debió a la actividad y biotransformación metabólica de estos agentes químicos por las plántulas.

García (2008) señala que la Cicloheximida (inhibidor de rutas endocíticas) inhibe la síntesis proteica en organismos eucariotas. Este antibiótico interfiriere con la actividad peptidil transferasa del ribosoma 60S, bloqueando la elongación traduccional. Inhibe la función del factor de elongación EF2 que media la translocación de la peptidil-tRNA desde el sitio A al sitio P, y por ende la elongación de la traducción. Inhibe las proteínas de "novo". Esto explicaría el retraso en el crecimiento de las células de *V. faba*. Por otro lado, la biotransformación fundamental del etanol se produce mediante un metabolismo enzimático oxidante. La mayoría de los organismos vivos como las plantas, poseen la enzima de alcohol deshidrogenasa, que elimina el hidrógeno del alcohol y lo transforma en aldehído o cetona (Cameron y Cossins, 1967).

En concordancia con Cameron y Cossins, (1967) en el presente estudio las células radiculares meristemáticas también metabolizaron el etanol a acetaldehído por medio dela alcohol deshidrogenasa, junto con la adenin nicotinamida dinucleotido como cofactor. Esto quiere decir que los productos del metabolismo de *V. faba* sobre el etanol y la Cicloheximida podrían ser una de las causas de la disminución del crecimiento y del rápido proceso de lignificación de las raíces. Por lo tanto, las semillas tratadas con Cicloheximida (5µg/ml), etanol al 3.6%, 7.5% y cerveza industrializada mostraron una toxicidad ligera como lo mencionan Takehisa et al., (1982) y Flores-Maya (2000).

Respecto a la genotoxicidad, Choy et al., (1995), demostraron los efectos inhibidores del etanol en la inducción de micronúcleos de ratones CD1 expuestos a uretano con dosificaciones de 2500 mg/kg (0.3%) de etanol. El uretano es uno de los compuestos nitrogenados genotóxicos comunes en bebidas alcohólicas (Choy et al., 1995). Actualmente se sabe que el etanol no es capaz de inducir daño cromosómico o mutagénesis en células de eucariontes *in vitro*. Esto fue evaluado

usando la prueba de micronúcleos *in vitro* (Phillips y Jenkinson, 2001). Flores-Maya et al., (2005) señalaron que el etanol en una concentración de 3600 mg/L (0.5%) no induce intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en linfocitos humanos. Sin embargo, el alcohol presenta un comportamiento “promutágeno”, es decir, que requiere ser activado metabólicamente por el sistema enzimático S10 de *V. faba* para provocar daño mutagénico. El producto de ésta biotransformación es el acetaldehído, el cual mezclado con o sin la S10 sí induce ICH en linfocitos humanos.

De acuerdo a lo anterior, se descarta la posibilidad de que el etanol en concentraciones bajas sea un factor vinculado con el daño al ADN (Obe y Anderson, 1987; Choy et al., 1995; Arimoto-Kobayashi et al., 1999; Monobe et al., 2003; Flores-Maya et al., 2005). Esto último puede explicar la presencia, aunque muy baja y poco significativa de la frecuencia de micronúcleos en las células meristemáticas de *V. faba* fue debido al porcentaje de alcohol usado en los grupos experimentales (3.6 y 7.5%) que fue el mismo contenido en la cerveza industrial y artesanal. Pero, aun así, estas concentraciones no fueron suficientes para inducir altas frecuencias de micronúcleos.

Como se observa en la Fig. 1B y en la Tabla 1 y de acuerdo a la interpretación de la prueba múltiple de Dunnett, la cerveza industrial tuvo un efecto ligero en el incremento en la frecuencia de micronúcleos (0.42 %) sobre las células meristemáticas de *V. faba* en relación al efecto de la cerveza artesanal (0.32%). Esta respuesta baja en la frecuencia de MCN se debió quizás a la incorporación y actividad de los polifenoles vegetales del lúpulo (*Humulus lupulus* L.) de las cervezas y al contenido de estos compuestos en las paredes celulares de las células meristemáticas de *V. faba* (Quiñones et al., 2012). Los compuestos derivados del lúpulo presentes en ambas cervezas como los ácidos fenólicos y flavonoides con propiedades mutagénicas como xanthohumol (Ferk et al., 2010), ácido gálico, ácido protocatechuico, ácido catechin, ácido vanílico, caféico, siríngico, epicatechin, cumáico, ferúlico ácido elágico, ploroglucinol, ácido clorogénico (Arimoto-Kobayashi et al., 1999; Zhao et al., 2010), β -pseudouridina (Yoshikawa et al., 2002; Monobe et al., 2003) y glicin-betaína (Kimura et al., 1999) pudieron coadyuvar a activar el efecto clastogénico o aneuplogénicos en las células meristemáticas de *V. faba*. Esto confirma que *V. faba* es un buen biomonitor capaz de detectar el daño genotóxico inducido por los componentes químicos de las cervezas basándose en el hecho que se pudo detectar un efecto, aunque muy ligero al ADN de esta planta.

La capacidad de los polifenoles de modular la actividad de diferentes enzimas, e interferir consecuentemente en mecanismos de señalización y en distintos procesos celulares, pueden deberse, en parte, a las características fisicoquímicas de estos compuestos, que les permiten participar en distintas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción (Quiñones et al., 2012).

El decremento en función del tiempo de la frecuencia de micronúcleos y aberraciones cromosómicas en todos los tratamientos, puede ser una respuesta del metabolismo xenobiótico de *V. faba* y la actividad antioxidante de algunos compuestos presentes en la cerveza. De acuerdo a Coleman et al., (1997), la desintoxicación vegetal (biotransformación, compartimentalización y exocitosis) de xenobióticos depende de factores como la concentración de glutatión-S-transferasa (GSH), citocromo P450 (CYP450), y pH citosólicos (Nozawa et al., 2004). Se puede concluir que 1) la cerveza elaborada industrialmente disminuye la actividad del ciclo mitótico en meristemas de *V. faba*, 2) las concentraciones empleadas de alcohol en ambas cervezas son un factor de genotoxicidad ligera, 3) las dos cervezas son ligeramente mutagénicas en células radiculares de *V. faba*, 4) el ensayo de micronúcleos en meristemas radiculares de *V. faba* es un procedimiento de mutagenicidad de fácil elaboración y rápida respuesta para utilizarse en el análisis de riesgo y control de calidad de bebidas comerciales como la cerveza, 5) la Cicloheximida es genotóxica y citotóxica en células radiculares en *V. faba* y 6) lo observado en el presente estudio sustenta la

importancia de los ensayos de corto plazo como indicadores de daño inducido por agentes químicos en el material genético de organismo expuestos.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue apoyado económicamente por la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por el Programa de Apoyo a los Profesores de Carrera (PAPCA) 2013, número de proyecto 39. Los autores también agradecen al Profesor Mauricio Montesinos Silverio por la corrección de estilo en la traducción al inglés.

REFERENCIAS

1. Alcázar A., F. Pablos, M.J. Martín y G.A. González, 2002. Multivariate characterization of beer according to their mineral content. *Talanta*, 57: 45-52.
2. Arimoto-Kobayashi S., C. Sugiyama, N. Harada, M. Takeuchi, M. Takemura y H. Hayatsu, 1999. Inhibitory effects of beer and other alcoholic beverages on mutagenesis and DNA adduct formation induced by several carcinogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 221-230.
3. Asfaw A. y W. Grethe, 2005. Direct Analysis of Beer by ICP-AES: A very simple method for the determination of Cu, Mn and Fe. *Microchimica Acta*, 152: 61-68.
4. Bamforth C.W., 2002. Nutritional aspects of beer. A review. *Nutrition Research*, 22: 227-237.
5. Bertuzzi T., S. Rastelli, A. Mulazzi, G. Donadini y A. Pietri, 2011. Mycotoxin occurrence in beer produced in several European countries. *Food Control*, 22: 2059-2064.
6. Blanco C.A., D. Sancho y I. Caballero, 2010. Aluminium content in beers and silicon sequestering effects. *Food Research International*, 43(10): 2432-2436.
7. Bonilla I., 2000. Introducción a la nutrición mineral de las plantas. Los elementos minerales. En: J. Azcón-Bieto y M. Talón (Eds.), *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Mc-Graw-Hill Interamericana ediciones Universidad de Barcelona.
8. Bu N., S.H. Wang, C. M. Yu, Y. Zhang, C.Y. Ma, X. M. Li y L. J. Ma, 2011. Genotoxicity of Fenoprophathrin and Fenitrothion on Root Tip Cells of *Vicia faba*. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, 87: 517-521.
9. Cameron D. S. y E. A. Cossins, 1967. Studies of Intermediary Metabolism in Germinating Pea Cotyledons. The pathway of ethanol metabolism and the role of the Tricarboxylic Acid Cycle. *Biochemical Journal*, 105: 323-331.
10. Choy W. N., W. Black, G. Mandakas, E. J. Mirro y H. E. Black, 1995. A pharmacokinetic study of ethanol inhibition of micronuclei induction by urethane in mouse bone marrow erythrocyte. *Mutation Research*, 342: 255-263.
11. Coleman O. D. J., M. A. M. Blake-Kalff y T. G. E. Davies, 1997. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science*, 2: 144-151.

12. El Hajjouji H., E. Pimelli, M. Guiresse, G. Merlina, J. C. Revel y M. Hafidi, 2007. Assesment of the genotoxicity of olive mil waste wáter (OMWW) with the *Vicia faba* micronucleus test. *Mutation Research*, 634: 25-31.
- 13.-Ferk F., W. W. Huber, M. Filipič, J. Bichler, E. Haslinger, M. Mišik, A. Nersesyan, B. Grasl-Kraupp, B. Žegura y Knasmüller, 2010. Xanthohumol, a prenylated flavonoidcontained in beer, prevents the induction of preneoplastic lesions and DNA damage in liver and colon induced by the heterocyclic aromatic amine amino-3-methyl-imidazo [4, 5-*f*]quinoline (IQ). *Mutation Research*, 691: 17-22.
14. Flores-Maya S., 2000. Efectos de los herbicidas metribuzina y ametrina (triazinas) sin y con activación metabólica vegetal in vivo sobre la cinética del ciclo celular y el índice mitótico en linfocitos humanos en cultivo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 16: 127-137.
15. Flores-Maya S., S. Gómez-Arroyo, M. E. Calderón-Segura, R. Villalobos-Pietrini, S. M. Waliszewski y L. Gómez de la Cruz, 2005. Promutagen activation of triazine herbicides metribuzin and ametryn through *Vicia faba* metabolism inducing sister chromatid exchanges in human lymphocytes in vitro and in *Vicia faba* root tip meristems *Toxicology in Vitro*, 19: 243-251.
16. García, P. B. E., 2008. Efecto de diversos inhibidores endocíticos sobre la entrada de micobacterias a fibroblastos de pulmón murinos (MLg). Informe final proyecto SIP-20080400. Instituto Politécnico Nacional Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Departamento de Inmunología, México.
17. Gómez-Arroyo, S. y R. Villalobos-Pietrini, 1995. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in *Vicia faba* as genetic monitors of environmental pollutants. En: F.M. Butterworth, L.D. Corkum y J. Guzmán-Rincón (Ed.), *Biomonitors and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Plenum Press, New York.
18. Guerdrum L. J. y C. W. Bamforth, 2011. Levels of gliadin in commercial beers. *Food Chemistry*, 129: 1783-1784.
19. Hough J. S., D. E. Briggs, J. S. Stevens y T. W. Young, 1981. *Metabolism of worst by yeast. Malting and Brewing Science*. London Chapman and Hall.
20. Ivett J. L., D. J. Brusick, R. R. Young, C. I. Chappel y E. R. Nestmann, 1992. Genetic toxicology evaluation of commercial beers, III. SCE, chromosome aberrations, and forward mutation (HGPR) of commercial beer products in CHO cells. *Mutation Research*, 298: 43-51
21. Kimura S., H. Hayatsu y S. Arimoto-Kobayashi, 1999. Glicine-betaine in beers an antimutagenic substance against 2-chloro-4-methylthiobutanoic acid, the sanma-fish mutagen. *Mutation Research*, 439: 267-276
22. Lijinsky W., 1999. N-nitroso compounds in the diet. *Mutation Research*, 443: 129-138.
23. Ma T. H., Z. Xu, C. Xu, H. McCornell, E. V. Ravabo, G. A. Arreola y H. Zhang, 1995. The improved *Allium/Vicia* root tip assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research*, 334: 185-195.

24. Monobe M., S. Arimoto-Kobayashi y K. Ando, 2003. β -pseudouridine, a beer component, reduces radiation-induced chromosome aberrations in human lymphocytes. *Mutation Research*, 538: 93-99.
25. Nozawa H., K. Tazumi, K. Sato, J. Takata, S. Arimoto-Kobayashi y K. Kondo, 2004. Inhibitory effects of beer on heterocyclic amine-induced mutagenesis and PHIP-induced aberrant crypt foci in rat colon. *Mutation Research*, 559: 177-187.
26. Obe G. y D. Anderson, 1987. Genetic effects of ethanol. *Mutation Research*, 186: 177-200.
27. Patlolla A. K., S. Berry, M. LaBethani y P.B. Tchounwou, 2012. Genotoxicity of Silver Nanoparticles in *Vicia faba*: A Pilot Study on the Environmental Monitoring of Nanoparticles. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9: 1649-1662.
28. Phillips J. B. y P. Jenkinson, 2001. Is ethanol genotoxic?. A review of the published data. *Mutagenesis*, 16: 91-101.
29. Pohl P., 2008. Determination and fractionation of metals in beer: A review. *Food Additives and Contaminants*, 25(6): 693-703.
30. PPI, 1999. Functions of Phosphorus in plants. En: L.D. Armstrong (Ed.), *Phosphorus for agriculture*. Better Crops International, Canada.
31. Quiñones, M., M. Miguel y A. Aleixandre, 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27: 76-89.
32. Sendra J. y J. Carbonell, 1999. Centro de Información Cerveza y Salud del IATA/CSIC. Evaluación de las propiedades nutritivas, funcionales y sanitarias de la cerveza, en comparación con otras bebidas. Madrid, España.
33. Takehisa S., N. Kanaya y R. Rieger, 1982. Induction of SCEs in CHO cells by extracts from *Vicia faba* roots exposed to ethanol. *Mutation Research*, 105: 169-174.
34. Varela P. J. L., 2009. Desarrollo de un método cromatográfico (HPLC) para la determinación de ácidos orgánicos en cervezas. (Tesis para Químico. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, México).
35. Yoshikawa T., S. Kimura, T. Hatano, K. Okamoto, H. Hayatsu y S. Arimoto-Kobayashi, 2002. Pseudouridine an antimutagenic substance in beer towards N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG). *Food Chemical Toxicology*, 40: 1165-1170.
36. Yurchenko S., y U. Molder, 2005. N-nitrosodimethylamine analysis in Estonian beer using positive-ion chemical ionization with gas chromatography mass spectrometry. *Food Chemistry*, 89: 4555-463.
37. Zhao H., W. Chen, J. Lu y M. Zhao, 2010. Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. *Food Chemistry*, 119: 1150-1158.