

## Detección de Mutagenicidad en Compuestos N-Nitroso con el Test de Ames

Claudia TROSSERO <sup>1</sup>, Graciela CAFFARENA <sup>2</sup>, Estela HURE <sup>1</sup> & Marcela RIZZOTTO <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Área Inorgánica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Suipacha 531, 2000 Rosario, Argentina.

<sup>2</sup> Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Av. Francia y Santa Fe, 2000 Rosario, Argentina

**RESUMEN.** Hay una gran cantidad de sustancias, naturales o sintéticas, con posible capacidad mutagénica. Entre ellas se cuentan los compuestos N-nitroso, los que pueden formarse por reacción de nitritos con compuestos nitrogenados, como aminas o amidas en medio ácido. Esta reacción de nitrosación puede darse también dentro del organismo con productos nitrogenados de la dieta, incluso antibióticos. El test de Ames es un método sencillo y eficaz de detección de este tipo de mutágenos, ya sea como compuestos puros o formando parte de mezclas complejas. El objetivo del presente trabajo es realizar una somera revisión acerca de la detección de mutagenicidad de compuestos N-nitroso mediante el test de Ames.

**SUMMARY.** "Detection of Mutagenicity in N-Nitroso Compounds with the Ames Test". There are a lot of natural or synthetic products with possible mutagenic capacity. Among these, N-nitroso compounds, that are formed by nitrosation reactions between nitrite and amines or amides in acidic medium, can also be formed into the organism. The Ames test is an efficient tool for detecting these mutagenic compounds, as pure ones or as part of mixtures. In this paper we try to do a brief review about the detection of mutagenicity of N-nitrosocompounds by mean of the Ames test.

### INTRODUCCIÓN

#### **Mutaciones, mutágenos y cáncer**

La información genética es transmitida de una célula a su sucesora por la precisa duplicación de las cadenas del ácido desoxirribonucleico (ADN), en un proceso que es común a todos los seres vivos, desde simples bacterias hasta complejos animales o plantas. Alteraciones en la información genética ocurren como resultado de pequeñas alteraciones en la estructura de la molécula de ADN, por lo cual, la secuencia de bases transmitida a la otra generación celular es distinta. Estas alteraciones son mutaciones, las que pueden ser compatibles con una vida normal y sana, dando lugar a las pequeñas diferencias entre miembros de una especie y constituyendo la fuerza motriz de la evolución. Por el contrario, otras mutaciones contribuyen significativamente a enfermedades y malformaciones congénitas. Los agentes mutagénicos (químicos

o físicos) interactúan con el ADN causando cambios en su estructura. Este cambio puede ser una pérdida, adición o reemplazo de bases, alterándose así la secuencia del ADN y afectando la fidelidad del mensaje genético <sup>1</sup>.

El nacimiento de niños con malformaciones congénitas siempre ha provocado gran cantidad de problemas a la sociedad y tremenda angustia al afectado y su familia. Aunque muchas de las causas de anormalidades de nacimiento permanecen aún desconocidas, se ha estimado que alrededor del 20% de las mismas se deberían a mutaciones genéticas. Todavía no se ha prestado la suficiente atención a agentes ambientales y drogas que pudieran tener efectos teratogénicos (que producen malformaciones durante el desarrollo, previo al nacimiento). Esto es importante puesto que el conocimiento lleva a la prevención. Aunque los diversos agentes teratogénicos pueden producir su efecto mediante varia-

**PALABRAS CLAVE:** Agentes mutagénicos, Compuestos N-nitroso, Nitrosación, Sulfatiazol, Test de Ames.

**KEY WORDS:** Ames test, Mutagenic agents, Nitrosation, N-nitroso compounds, Sulfathiazole.

\* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: mrizzot@agatha.unr.edu.ar; mrizzott@fbioyf.unr.edu.ar

dos mecanismos, la actividad mutagénica juega, sin lugar a dudas, un papel importante en muchos de ellos <sup>2</sup>.

El cáncer es una enfermedad en la cual desaparecen las reglas del comportamiento celular-normal <sup>3,4</sup>. El crecimiento de las células normales es regulado cuidadosamente para satisfacer todas las necesidades del organismo. En cambio, las células cancerosas se dividen continuamente y en forma autónoma, invadiendo e interfiriendo la función de los tejidos normales. La transformación de una célula normal en cancerosa sería consecuencia de anomalías en los sistemas de regulación que son fundamentales en la fisiología celular normal <sup>5</sup>. La característica más importante de la célula maligna es que se multiplicará dando siempre origen a células cancerosas y nunca volverá a originar células normales. Así, las anomalías que producen las células cancerosas son heredadas en forma permanente y son estables a nivel celular <sup>6</sup>. Esto nos sugiere la hipótesis que cambios genéticos son responsables de la transformación neoplásica <sup>7</sup>. En la actualidad se considera al cáncer como el resultado de una acumulación de alteraciones genéticas <sup>8,9</sup>. Muchos agentes carcinogénicos inician su acción dañando al ADN <sup>10</sup>.

### **Mutágenos: distintas fuentes**

La industria moderna ha aportado y aporta numerosas sustancias mutagénicas y/o cancerígenas al medio ambiente, aunque no es la única fuente: también en la naturaleza se encuentran sustancias de este tipo. Como ejemplo, la aflatoxina B<sub>1</sub>, producto metabólico de algunos hongos, es uno de los mutágenos más potentes que se conocen <sup>11</sup>. En cuanto a los productos sintéticos, la lista está en continuo aumento, dada la gran cantidad de nuevos productos. Entre ellos podemos mencionar nitrosoderivados, formados por reacción entre nitritos y sustancias nitrogenadas, como aminas o amidas. Además de los productos naturales y sintéticos presentes en el medio ambiente, un lugar destacado lo ocupan los productos generados *in situ* en el organismo, como son las nitrosaminas (y en general, compuestos N-nitroso) provenientes de la reacción entre compuestos nitrogenados (aminoácidos, antibióticos, etc.) con nitritos que pueden provenir de aditivos en alimentos o del propio organismo (por ejemplo, la saliva contiene un alto tenor de nitritos). Es necesario también alertar sobre los productos medicinales <sup>11</sup>, no sólo por las drogas primarias, sino también por posibles interacciones.

Dada la gran cantidad de sustancias mutagénicas existentes, tanto exógenas como endógenas, es muy importante disponer de un método sencillo para analizar sustancias potencialmente peligrosas (la estructura molecular del compuesto puede ser un indicio cierto de su posible actividad), en especial aquellas que, debido a sus características, podrían llegar a ser medicamentos. Aunque la relación mutágenos-carcinogénicos es menor que la estimada en un principio <sup>12</sup>, la detección de mutágenos es importante en sí misma, sean o no carcinogénicos, a fin de prevenir los propios problemas que acarrear. El objetivo del presente trabajo es realizar una somera revisión acerca de la detección de mutagenicidad de compuestos N-nitroso (los cuales constituyen también una importante clase de carcinógenos) mediante el test de Ames.

### **Una forma sencilla de detección de mutágenos: el test de Ames**

El test de Ames, ensayo de mutación bacteriano que emplea *Salmonella typhimurium* como bacteria indicadora, ha sido universalmente adoptado para la detección de mutágenos, siendo quizás la más difundida de las pruebas para detectar, en forma simple, rápida y económica, el poder mutagénico de diversas sustancias <sup>12</sup>. En el mismo se cultivan cepas de *S. typhimurium* genéticamente modificadas -de modo que requieren histidina para su crecimiento- en presencia y ausencia de la droga a ensayar, en un medio sin histidina. Una sustancia mutagénica puede revertir esta carencia, haciendo que las bacterias crezcan en el medio sin histidina (dando colonias llamadas revertantes). Según el test de Ames una sustancia, natural o sintética, se considera mutagénica cuando el coeficiente de reversión, C.R., es mayor que 2. (C.R. = N<sup>0</sup> de colonias revertantes por placa ensayada/ N<sup>0</sup> de colonias revertantes por placa control -espontáneas-). Para la mayoría de los mutágenos ensayados, hay un rango de concentraciones que produce una curva dosis-respuesta lineal. Otros, tal como la 9-aminoacridina, produce una curva dosis-respuesta no lineal <sup>13</sup>, hecho que debe ser informado. Muchos mutágenos son tóxicos para la bacteria, y la observación de un solo punto, si está situado en la zona descendente de la curva dosis-respuesta, llevaría a una interpretación errónea de la capacidad mutagénica de la sustancia ensayada.

### **Cepas bacterianas**

Todas las cepas son derivadas de *S. typhimu-*

*rium* LT2 y requieren histidina (o sea, son His-). Adicionalmente a la mutación para histidina, cada cepa presenta otras mutaciones, que hacen incrementar su sensibilidad para determinados mutágenos. Las cepas actualmente recomendadas para las pruebas generales de mutagenicidad son las siguientes: TA97, TA98, TA100 y TA102. Otras cepas tales como TA110, TA89, TA1538, etc., se han dejado de usar con frecuencia por diversos motivos (por ejemplo, detección de pocos mutágenos, reemplazo por otras más sensibles, etc.).

### **Control de las cepas**

Se debe confirmar el genotipo de las cepas (requerimiento de histidina, carácter rugoso, sensibilidad a UV, factor R (resistencia a la ampicilina). La cepa TA102 también debe ser testada para requerimiento de tetraciclina. No es necesario comprobar el requerimiento de biotina, ya que se trata de una mutación no reversible.

### **Amplitud o espectro de detección del test de Ames**

Se cuentan por miles la cantidad de sustancias que han sido ensayadas con el test de Ames<sup>14</sup>, desde compuestos metálicos (complejos de hierro, rutenio y osmio con bipyridinas sustituidas, ensayadas con TA98 y TA100<sup>15</sup> o de platino, también con las mismas cepas TA98 y TA100<sup>16</sup> hasta mezclas complejas como aguas residuales hospitalarias, también empleando las mencionadas cepas<sup>17</sup>, o incluso para la detección de antimutágenos, como la actividad protectora de flavonoides, con la cepa TA102<sup>18</sup>.

### **Relación estructura-actividad**

El uso de modelos y programas teóricos que estudian la relación estructura-actividad de sustancias permiten hacer predicciones sobre su potencial peligrosidad, que luego debe ser confirmada por estudios biológicos, entre los cuales tienen relevancia los tests bacterianos.

Desde el punto de vista de su mecanismo de acción, los carcinógenos pueden ser clasificados como: a) genotóxicos, los cuales causan daño directo al ADN. Muchos mutágenos están en esta categoría, y frecuentemente la mutación es el primer paso en el desarrollo del cáncer. b) carcinógenos que no se ligan directamente al ADN, y que en general dan negativas las pruebas de mutagenicidad (carcinógenos epigenéticos). Aunque los mecanismos de acción son variados, hay factores a tener en cuenta, ya sea para la misma sustancia o sus metabolitos: electrofilici-

dad; y factores que tienen que ver con la absorción: peso molecular, solubilidad, estado físico, etc. La geometría molecular es otro punto a tener en cuenta: muchos carcinógenos son moléculas planares (ej.: policíclicos aromáticos), con algún grupo funcional electrofílico y tamaño adecuado, de modo de poder intercalarse en la molécula del ADN. Otro factor crítico es el metabolismo, convirtiendo en mutágenos sustancias que originalmente no lo eran<sup>19</sup>. Respecto a aminas aromáticas, que representan una de las más importantes clases de químicos industriales y ambientales, muchas de ellas tienen reconocida actividad cancerígena. La exposición a aminas aromáticas ocurre en diferentes actividades y ámbitos (industria, agricultura, humo del cigarrillo, etc.). Los estudios teóricos de relación estructura-actividad de estas sustancias han correlacionado bien con el test de Ames en la parte experimental<sup>20</sup>.

### **Compuestos N-nitroso**

Los compuestos o derivados N-nitroso se forman por reacción de nitritos con aminas o amidas en medio ácido<sup>21</sup>. Todos ellos, y en especial las nitrosaminas, constituyen una importante clase de carcinógenos con características únicas en cuanto son activos en todas las especies y poseen un amplio espectro de células blanco. Uno de los principales aportes de nitrosaminas al organismo humano lo constituye el humo del cigarrillo, aunque también hay fuentes endógenas. De unos 300 compuestos ensayados, más del 90% mostraron capacidad carcinogénica<sup>22,23</sup>.

### **Detección de mutagenicidad de compuestos N-nitroso mediante el test de Ames**

Dada la importancia de los derivados N-nitroso, tanto exógenos como endógenos, mencionaremos algunos ejemplos de la determinación de su mutagenicidad, tanto como compuestos puros o bien formando parte de mezclas.

La mayoría de la población está expuesta a mezclas complejas de sustancias nocivas, ya sea desde el residuo proveniente de la combustión en motores de automóviles hasta el ya mencionado humo del cigarrillo de personas fumadoras. Los primeros estudios de genotoxicidad en mezclas complejas provienen de la década de 1950 e involucraron mayormente la evaluación de cultivos celulares expuestos al humo del cigarrillo. Sin embargo, el estudio de la genotoxicidad de mezclas complejas se puede decir que realmente comenzó en 1974, con el informe de Kier *et al.*<sup>24</sup> sobre la mutagenicidad de un con-

densado de humo de cigarrillo mediante el test de Ames. Previamente, estos autores habían evaluado la mutagenicidad de las fracciones aisladas, lo que dió información sobre cuáles compuestos eran los responsables de la mutagenicidad de la mezcla completa. De las cepas de *S. typhimurium*, empleadas en el test de Ames, las más usadas para la detección de mutagenicidad en mezclas complejas han sido la TA98 y la TA1538 <sup>25</sup>. Esta última, sin embargo, actualmente no es tan empleada, ya que sus resultados se superponían en gran medida con los de la TA98 (que es más usada) <sup>12</sup>.

En 1995 se observó acción mutagénica de la mezcla de tiamina con nitrito con la cepa TA100, sin activación metabólica <sup>26</sup>. En 1997, la genotoxicidad de nitrobenzenos y nitroanilinas fue determinada con las cepas TA 98 y TA100, hallándose 10 compuestos mutagénicos sobre 14 ensayados (71%) <sup>27</sup>. Por otra parte, en 1997 fue revisada la mutagenicidad de más de 80 aminas aromáticas. Muchas mostraron actividad mutagénica con las cepas TA98 y TA100, con adición de S9 en varios casos <sup>28</sup>. Más recientemente, la genotoxicidad de nitrosopiperidinas y seis de sus alquil derivados fue estudiada mediante el test de Ames empleando las cepas TA100 y TA1535. Todos los compuestos fueron mutagénicos con la adición de "S9" (homogeneizado de hígado de rata) <sup>29</sup>.

### **Riesgos del metabolismo**

El ADN puede ser dañado no sólo por sustancias externas, sino por sustancias provenientes del propio metabolismo, entre ellas, especies reactivas de nitrógeno <sup>30</sup>.

### **La doble acción de nitritos y nitratos**

El uso de nitritos y nitratos como aditivos en los alimentos trae aparejado ciertos riesgos. El primero es el de toxicidad aguda: el nitrito es tóxico (una dosis de 2 g puede causar la muerte de una persona), más aún para los niños, que son más sensibles, por formación de metahemoglobina, la cual es incapaz de transportar oxígeno. Otro riesgo del uso de nitritos es la formación de nitrosaminas, sustancias que son agentes cancerígenos. Las nitrosaminas se pueden formar tanto en el alimento como en el organismo. En el alimento se producen en aquellos productos que deben ser calentados para su elaboración (ej.: tocino), o que son ricos en aminas nitrosables (ej.: pescado y productos fermentados). En este segundo caso, la formación de nitrosaminas se puede producir en el estómago. Los nitratos se pueden transformar en nitritos

por acción de microorganismos. Además, los nitratos de la dieta, formando parte de muchos vegetales (como espinaca y apio), son reducidos a nitritos en la saliva, y, con la acidez estomacal, pueden generar intermediarios nitrogenados, entre los cuales están las potencialmente carcinogénicas N-nitrosaminas.

Para reducir el riesgo de la formación de nitrosaminas, una de las vías sería la reducción en el uso de nitritos como aditivos en los alimentos. Es necesario en este caso analizar la relación riesgo/beneficio, ya que los nitritos evitan el botulismo, provocando la inhibición del *Clostridium botulinum*, bacteria que produce la mortal toxina botulínica <sup>31</sup>. Dado su poder microbicida, los nitritos serían una barrera natural contra gérmenes patógenos intestinales; por otro lado, la reacción de nitrosación que puede darse en el estómago con algunos compuestos nitrogenados (aminas y amidas), los acerca a la peligrosidad por la formación de derivados N-nitroso, potencialmente cancerígenos y mutagénicos <sup>32</sup>. No obstante, se debe tener en cuenta que la eliminación de los nitritos como aditivos no los excluye, ni mucho menos, del organismo. Mientras que con los alimentos se ingieren menos de 3 mg/día, se segregan en la saliva en el orden de 12 mg/día, a la par que las bacterias intestinales producen unos 70 mg/día <sup>31</sup>.

### **Reacciones de nitrosación endógenas**

Como decíamos antes, muchos de estos compuestos N-nitroso están ampliamente distribuidos en el medio ambiente, pero también muchos de ellos son formados en el interior del organismo mediante reacciones de nitrosación, sobre todo en el medio ácido del estómago <sup>33-36</sup>. La formación de derivados N-nitroso en alimentos tratados con nitritos como aditivo y preservante es un hecho conocido desde hace más de 40 años. La acción de nitritos y óxidos de nitrógeno con compuestos nitrogenados secundarios y terciarios en alimentos (carnes curadas -jamón en especial-, conservas de pescado, etc.) también lleva a la formación de compuestos N-nitroso <sup>37</sup>. La nitrosación para dar derivados N-nitroso no sólo es posible en relación a alimentos: también sustancias usadas como herbicidas pueden sufrir la reacción en el jugo gástrico <sup>38</sup>.

Varios autores han estudiado la cinética y mecanismo de nitrosación de aminoácidos por acción del nitrito en condiciones de acidez que semejen las del estómago, hallando que las especies alquilantes dañinas para el ADN, luego de la nitrosación, son las correspondientes lactonas <sup>39</sup>, y que la reactividad en aminoácidos

con un grupo amino fue la siguiente:  $\alpha$ -aminoácidos >  $\beta$ -aminoácidos >  $\gamma$ -aminoácidos <sup>40</sup>.

### **Mutagenicidad de la mezcla sulfatiazol-nitrito**

En nuestro grupo, en la Universidad Nacional de Rosario, decidimos investigar la posible mutagenicidad del sulfatiazol sódico, NaST, (un antibiótico de uso común <sup>41</sup>, el cual posee tanto una función amina primaria como una función amida monosustituida en su molécula) en presencia de nitritos. Se determinó la mutagenicidad de NaST en presencia de nitrito de sodio en medio ácido, empleando las cepas de *S. typhimurium* TA 98 y TA100, hallándose comportamiento mutagénico <sup>42</sup>. Estudios comparativos con compuestos relacionados (ftalilsulfatiazol, sulfanilamida, ácido sulfanílico) permiten sugerir que, en la formación del derivado N-nitroso, estaría involucrada la función amida.

### **Una reflexión final a modo de conclusión**

Podría resultar desalentador el panorama,

vista la cantidad de mutágenos que nos rodea, muchos de los cuales no podemos evitar puesto que se generan dentro de nuestro propio organismo, o son parte necesaria del cuidado de cultivos. Tampoco sería bueno llegar al extremo de eliminar todo pesticida sin tener en cuenta peligros mayores, como ser la proliferación de hongos productores de toxinas mucho más dañinas (la aflatoxina, por ejemplo, uno de los carcinógenos naturales más potente que se conoce) <sup>43</sup>. Por fortuna, hay sustancias con propiedades antimutagénicas (en frutas por ejemplo) <sup>43</sup>, y otras que reaccionan con nitritos, disminuyendo así su peligrosidad, como polifenoles presentes en el té verde <sup>44</sup>.

**Agradecimientos.** Los autores agradecen a la UNR y a su Consejo de Investigaciones, CIUNR, por la ayuda recibida; a Graciela N. González y Vilma E. Bidut, personal de la cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Médicas, UNR, por la colaboración técnica en el trabajo experimental; al Dr. Juan Moretton por el fundamental apoyo brindado en las primeras etapas de este proyecto.

### **REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

- World Health Organization (1985) *Environ. Health Criteria* **51**: 3-208.
- Bishop, J. B., K. Witt & R. Sloane (1997) *Mutat. Res.* **396**: 9-46.
- Bishop, J.M. (1987) *Science* **235**: 305-11.
- Clurman, B.E. & J. M. Roberts (1995) *J. Natl. Cancer Inst.* **87**: 1499-501.
- Sherr, C.J. (1996) *Science* **274**: 1672-7.
- Fialkow, P.J. (1979) *Annu. Rev. Med.* **30**: 135-43.
- Vogelstein, B. & K. W. Kinzler (1988) *"The Genetics Basis of Human Cancer"* Mc Graw Hill.
- Fearon, E.R. & B. Vogelstein (1990) *Cell* **61**: 759-67.
- Nowell, P.C. (1989) *Cancer Cells* **1**: 29-30.
- Inami, K. & M. Mochizuki (2002) *Mutat. Res.* **519**: 133-40.
- Lojo, M. (1982) *"Determinación de poder mutagénico de distintas sustancias"* Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.
- Maron, D. & B. Ames (1983) *Mutat. Res.* **113**: 173-215.
- Mc Cann, J., N. Springarn, J. Kobori & B. Ames (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **72**: 979-83.
- Trossero, C. (2000) *"Tecnogenología, mutágenos y vida"* UNR editora, Rosario, Argentina, págs. 89-132.
- Gasiorowski, K., K. Szyba, M. Cieslak-Golonna, S. Zakeeruddin, M. Grätzel & D. Fraser (1995) *BioMetals* **8**: 257-62.
- Gümüs, F., Í. Pamuk, T. Ösden, S. Yildiz, N. Diril, E. Öksüzoglu, S. Gür & A. Öskul (2003) *J. Inorg. Biochem.* **94**: 255-62.
- Paz, M., H. Muzio, V. Gemini, A. Magdaleno, S. Rossi, S. Korol & J. Moretton (2004) *Hig. Sanid. Ambient.* **4**: 83-8.
- Edenhauer, R. & D. Grünhage (2003) *Mutat. Res.* **540**: 1-18.
- Benigni, R. (2005) *Chem. Rev.* **105**: 1767-800.
- Benigni, R. & L. Passerini (2002) *Mutat. Res.* **511**: 191-206.
- Noller, C. (1968) *"Química de los compuestos orgánicos"* II ed., Editorial Médico-Quirúrgica, Buenos Aires, págs. 337-338, 348-349, 670.
- Bartsch, H., H. Oshima, B. Pignatelli, C. Malavielle & M. Friesen (1991) *"Nitrite-reactive phenols present in smoked foods and amino-sugars formed in the Maillard reaction as precursors of genotoxic arenediazonium ions or nitroso compounds"* en "Mutagens in food: detection and prevention" (H. Hayatsu, ed.) CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor/Boston, pp. 87-100.
- Loeppky, R. & C. Michejda (1994) *ACS Symposium Series N° 553*, Am. Chem. Soc. Washington DC.

24. Kier, L., E. Yamasaki & B. Ames (1974) *Proc. Natl. Sci. USA* **71**: 4159-63.
25. DeMarini, D. (1994) *Environ. Health Perspect.* **102**: 127-30.
26. Hiramoto, K., H. Ni-Iyama, T. Kato & K. Kikugawa (1995) *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health* **41**: 447-51.
27. Abman, N., M. Emmirch, G. Kampf & M. Kaiser (1997) *Mutat. Res.* **395**: 139-144.
28. Chung, K-T., L. Kirkovsky, A. Kirkovsky & W. Purcell (1997) *Mutat. Res.* **387**: 1-16.
29. González-Mancebo, S., J. Gaspar, E. Calle, S. Pereira, A. Mariano, J. Rueff & J. Casado (2004) *Mutat. Res.* **558**: 45-51.
30. Burchman, P. (1999) *Mutat. Res.* **443**: 11-36.
31. Reyes, A., Rodríguez, P., C. Torres Álvarez, D. Torres González, J. Vázquez Rodríguez & A. Zavala Chávez (2004) *Revista de la Fac. de Salud Pública y Nutrición* **1**: 49, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
32. Dykhizen, R.S., R. Frazee, C. Duncan, C. Smith, M. Golden, N. Benjamin & C. Leifert (1996) *Antimicrob. Agents Ch.* **40**: 1422-5.
33. Laires, A., J. Gaspar, H. Borba, M. Proença, M. Monteiro & J. Rueff (1993) *Fd. Chem. Toxicol.* **31**: 989-94.
34. Gaspar, J.; A. Laires, S. Va, S. Pereira, A. Mariano, M. Quina & J. Rueff (1996) *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **16**: 275-86.
35. Duarte, M., A. Laires, J. Gaspar, J. Oliveira & J. Rueff. (2000) *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **20**: 241-9.
36. Bartsch, H.; H. Oshima & B. Pignatelli (1988) *Mutat. Res.* **202**: 307-24.
37. Lijisky, W. (1999) *N-nitroso compounds in the diet, Mutat. Res.* **443**: 1-2: 129-38.
38. Cova, D., C. Nebuloni, A. Arnoldi, A. Bassoli, M. Trevisan & A. Del Re (1996) *J. Agric. Food Chem.* **44**: 2852-5.
39. García-Santos, M., E. Calle & J. Casado (2001) *J. Am. Chem. Soc.* **123**: 7506-10.
40. García-Santos, M., S. González-Mancebo, J. Hernández-Benito, E. Calle & J. Casado (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**: 2177-82.
41. Mandell, G. & M. Sande (1981) "Agentes antimicrobiano (continuación). Sulfonamidas, trimetoprima-sulfametoxazol y antisépticos de las vías urinarias" en "Las bases farmacológicas de la terapéutica" (Goodman, A. & L. Gilman, eds.) 6<sup>th</sup> ed., Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, págs. 1087-105.
42. Trossero, C., E. Hure, M. Trapé, C. Drogo, L. Monti, N. Mosconi, G. Caffarena & M. Rizzotto (2005) *Biocell* **29**: 117.
43. Forman, D. (1991) *Brit. Med. J.* **303**: 428-9.
44. Panzella, L., P. Manini, A. Napolitano & M. d'Ischia (2005) *Chem. Res. Toxicol.* **18**: 722-9.