



**EVALUACIÓN DE LA
GENOTOXICIDAD DE UN
COMPUESTO DEL EXTRACTO
PROALLIUM AP[®] MEDIANTE EL
ENSAYO DE MICRONUCLEOS CON
POTENCIAL USO EN ENVASES
ALIMENTARIOS**

Leticia Diez-Quijada Jiménez



TRABAJO FIN DE GRADO. GRADO EN FARMACIA

EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD DE UN COMPUESTO DEL EXTRACTO PROALLIUM AP® MEDIANTE EL ENSAYO DE MICRONUCLEOS CON POTENCIAL USO EN ENVASES ALIMENTARIOS

Trabajo de **carácter experimental** presentado por **Leticia Diez – Quijada Jiménez** en Sevilla a 07/07/2016 bajo la tutela de la Dra. Ana María Cameán Fernández y la Dra. María Puerto Rodríguez.

Realizado en el Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal, en el Área de Toxicología de la Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.

ÍNDICE

	Página
1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
3. Objetivos y justificación.....	7
4. Material y métodos.....	8
4.1. Productos químicos.....	8
4.2. Células y condiciones de cultivo.....	8
4.3. Concentraciones utilizadas.....	9
4.4. Ensayo de micronúcleos.....	10
4.5. Estudio estadístico y tratamiento de datos.....	13
5. Resultados.....	14
5.1. Ensayo de viabilidad celular.....	14
5.2. Ensayo de micronúcleos.....	15
6. Discusión.....	17
7. Conclusiones.....	19
8. Bibliografía.....	20
9. Anexo.....	23

1. RESUMEN

Los aceites esenciales (AEs) que proceden del género *Allium spp*, como es el caso del ajo (*Allium sativum*) y la cebolla (*Allium cepa*) se caracterizan por poseer numerosas propiedades, destacando sus actividades antioxidante y antimicrobianas, las cuales se les atribuye a sus compuestos organosulfurados. Estas características están siendo utilizadas por la industria para el desarrollo de nuevos envases activos que mejoren y conserven las características del alimento así como su vida útil. Antes de aprobar su uso, estas sustancias deben ser evaluadas a través de distintos ensayos toxicológicos que confirmen su seguridad. En este sentido, y siguiendo las recomendaciones de la EFSA (European Food Safety Authority) para la evaluación genotóxica de sustancias que van a estar en contacto con el alimento, el objetivo de este trabajo es evaluar por primera vez el potencial genotóxico de Propil Propano Tiosulfinato (PTS) presente en el extracto comercial Proallium AP[®]. El PTS se evaluó *in vitro* en la línea celular L5178Tk[±] de células de linfoma de ratón a través del ensayo de micronúcleos (MN) (0-25 µM) siguiendo el protocolo de la OECD 487. Se evaluó durante 24h en ausencia de S9 y durante 4h en presencia de S9. Los resultados obtenidos, muestran como el PTS en ausencia de S9 produce un leve pero significativo incremento en la frecuencia de MN en células binucleadas a la concentración de 17,25 µM. Sin embargo, en presencia de la fracción microsómica, el compuesto estudiado no actúa como agente clastogénico o aneugénico. No obstante, es necesario completar estos estudios con otros ensayos *in vitro* que confirmen la seguridad del PTS. En caso de obtener resultados contradictorios, y siguiendo las recomendaciones de las autoridades europeas sería necesario realizar la evaluación del PTS *in vivo*, para confirmar su seguridad antes de autorizar su uso en el envase alimentario.

Palabras clave: Propil propano tiosulfinato, genotoxicidad, ensayo de micronúcleos, envase activo.

2. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha producido un notable interés de la industria alimentaria por el desarrollo de nuevos envases que mejoren y conserven las características del producto así como su vida útil. Ante esta idea surgen los envases activos (Llana-Ruiz-Cabello y cols., 2015a; Sung et cols., 2013).

Según el marco del Reglamento (EC) N° 1935/2004 y el Reglamento específico N° 450/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo los envases activos son “materiales y objetos destinados a ampliar el tiempo de conservación, o mantener o mejorar el estado de los alimentos envasados. Están diseñados para incorporar deliberadamente componentes que transmitan sustancias a los alimentos envasados o al entorno de estos o que absorban sustancias de los alimentos envasados o del entorno de estos” (EFSA, 2009).

Estos envases están diseñados para interactuar de forma activa y continua con su contenido. Se pueden clasificar en dos grandes grupos (AESAN, 2010): un primero que incluyen sistemas que absorben, eliminan y/o regulan compuestos que perjudican las características, calidad y vida útil del alimento como son el oxígeno, etileno, dióxido de carbono, radicales libres de oxígeno, humedad así como todos aquellos que puedan ocasionar olores, sabores o colores desagradables en el producto alimenticio (Figura 1). Y un segundo grupo que se caracterizan por ceder al alimento sustancias químicas que actúen como antimicrobianos, antioxidantes, conservantes, aromatizantes, colorantes, saborizantes y aceites esenciales (AEs), entre otros (AESAN, 2010).

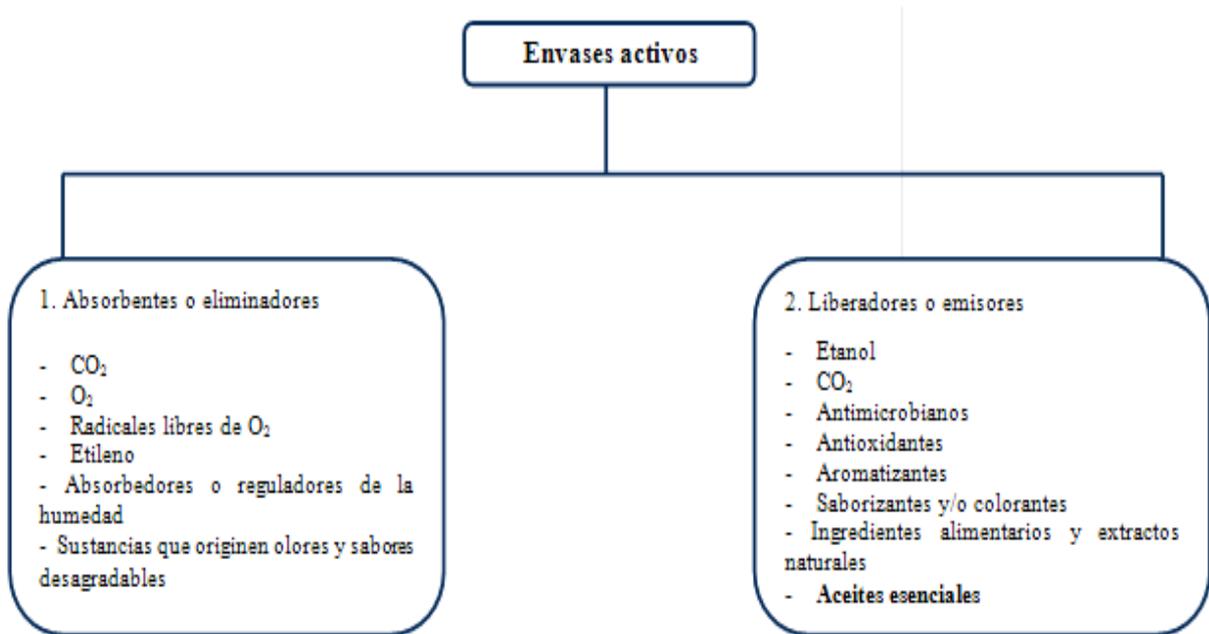


Figura 1. Clasificación de los envases activos según su función (AESAN, 2011).

Ante la innovación en la industria alimentaria del uso de sustancias activas que entrarán en contacto con el alimento, se hace necesario realizar estudios exhaustivos de los compuestos empleados. Además, los consumidores exigen cada vez más productos alimentarios “frescos y naturales” sin conservantes, siendo los AEs una buena alternativa natural al uso de productos químicos (Llana-Ruiz -Cabello y cols., 2015b; Ye y cols., 2013).

Los AEs son mezclas naturales complejas de líquidos que presentan una alta volatilidad procedentes de metabolitos secundarios de plantas aromáticas (Bakkali y cols., 2008; Souza y cols., 2013). Las propiedades de los AEs son muy variables como consecuencia de la heterogeneidad de sus componentes. Poseen actividad antiséptica, antimicrobiana, antifúngica, antiviral, analgésica, sedante, antiinflamatoria, espasmolítica, anestésica así como también poseen propiedades medicinales (Bakkali y cols., 2008). Estas características hacen idóneas su aplicación en la industria cosmética (perfumería y aromatizantes), en la industria farmacéutica (saborizantes) así como en la industria alimentaria (condimentos y sustancias activas) (Bakkali y col., 2008; Ipek y col., 2005).

Concretamente, los AEs procedentes de especies del género *Allium spp* como es el caso del ajo (*Allium sativum*) y de la cebolla (*Allium cepa*) están siendo estudiados en la industria alimentaria por poseer diversas propiedades antioxidantes o antimicrobianas, que mejoran la apariencia del alimento e incrementan su vida útil (Coronado y cols.,

2015; Llana- Ruiz-Cabello y cols., 2015a). Estas características se atribuyen a la presencia de compuestos sulfurados (Corzo- Martínez y cols., 2007). Sin embargo, hasta la fecha, ningún componente de AEs del género *Allium spp* está autorizado para su utilización en la industria alimentaria (Llana- Ruiz-Cabello y cols., 2015b).

Llana-Ruiz-Cabello y cols. (2015c) demostraron la capacidad antimicrobiana del polímero del ácido poliláctico (PLA) en combinación con el extracto comercial Proallium AP[®] (5% y 6,5 %), derivado de extractos de género *Allium spp*. Este extracto natural está constituido por dos compuestos sulfurados: Propil propano tiosulfonato (el PTSO) y Propil Propano Tiosulfinato (PTS). Estos compuestos tienen la característica de que a pesar de ser volátiles y migrar al alimento (Corzo-Martínez y cols., 2007), son muy inestables y ante distintas circunstancias se pueden descomponer en compuestos sulfurados (Benkeblia y Lanzotti, 2007).

El centro de investigación DOMCA (DMC, Granada, España) para evitar estos problemas, ha estabilizado y caracterizado los compuestos PTSO y PTS para que puedan ser evaluados por separado y así conocer el perfil toxicológico de cada organosulfurado. En este sentido, y siguiendo directrices y recomendaciones de la EFSA 2011, las sustancias químicas antes de incorporarse a los envases, debido a su posible capacidad de migración al alimento, necesitan ser evaluadas mediante estudios de genotoxicidad realizando una batería de ensayos *in vitro* (EFSA, 2011).

Concretamente para el compuesto PTSO, distintos autores han evaluado su citotoxicidad, genotoxicidad, mutagenicidad y realizado estudios histopatológicos en modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo* (Llana-Ruiz-Cabello y cols. (2015d), Mellado- García y cols., 2015; Mellado-García y cols., 2016a; Mellado-García y cols., 2016b).

Llana-Ruiz-Cabello y cols. (2015d) llevaron a cabo estudios de toxicidad aguda en la línea celular de colon humano (Caco-2) y en la línea hepática humana (Hep-G2), con el fin de evaluar la seguridad del PTSO y su posterior aplicación del Proallium AP[®] en la industria alimentaria. Aunque los resultados mostraron efectos citotóxicos a las concentraciones más altas ensayadas (350–415 μM) y cambios estructurales a la concentración de 92,5 μM , no se observaron efectos citotóxicos a las dosis que se pretende utilizar en el envase activo (37,5 μM).

Mellado- García y cols. (2015) evaluaron por primera vez el potencial mutagénico/genotóxico del PTSO a distintas concentraciones (0-50µM). Se realizó una batería de ensayo: test de Ames (OECD 471), ensayo de micronúcleos (MN) (OECD 487), ensayo de linfoma de ratón (OECD 476) y el ensayo cometa (OECD 489) según las recomendaciones de la EFSA, 2011. Los resultados determinaron que el PTSO no tiene actividad mutagénica tras la realización del test de Ames a la concentración más alta ensayada (20 µM). Con respecto al ensayo de MN, se pudo observar un incremento en la frecuencia de células binucleadas en presencia de la fracción microsómica S9, indicando la capacidad mutagénica de sus metabolitos. Además, el MLA dio positivo tras 24h de tratamiento. Finalmente, no se observó daños genotóxicos ni oxidación de las bases de la hebra de ADN mediante el ensayo cometa estándar y modificado a las concentraciones de 0 a 50 µM tras 24 h y 48 h de exposición.

Debido a la discrepancia en los resultados obtenidos *in vitro* y con la finalidad de corroborar tales resultados, se realizaron ensayos *in vivo*. En este sentido, Mellado-García y cols. (2016a) evaluaron *in vivo* la genotoxicidad oral del PTSO en ratas (5,5, 17,4 y 55 mg/kg) mediante el ensayo cometa en hígado y estómago (OECD 489) y el ensayo de micronúcleos en médula ósea (OECD 474). Los resultados mostraron que el PTSO no presenta efecto genotóxico a las concentraciones ensayadas.

Sin embargo, debido a las características fisicoquímicas de Proallium AP® (lipofílica) es difícil realizar ensayos *in vitro* estándar (tales como ensayos de MN, cometa, etc.). Siendo ésta la razón por las que se ensayan sus principales componentes, en su lugar.

En base a todos los estudios realizados se pone de manifiesto la inocuidad del PTSO y por lo tanto, la posibilidad de su uso en los envases activos. Sin embargo, hasta la fecha no existen ensayos que se hayan centrado en desarrollar el perfil toxicológico del PTS.

La EFSA propone dos ensayos *in vitro* para evaluar el potencial genotóxico de sustancias que entren en contacto con el alimento. Estos dos ensayos son: el test de Ames y el MN (EFSA, 2011), en el cual se centra este trabajo.

Dentro de los ensayos de genotoxicidad, el ensayo de MN es una técnica validada internacionalmente como bioensayo para evaluar genotoxicidad de sustancias en exposiciones tanto agudas y crónicas, convirtiéndose en un ensayo de estudio obligatorio para el proceso de aceptabilidad para productos químicos. Por este motivo es

uno de los métodos más usados para la identificación de agentes cancerígenos (Fenech, 2000; OECD TG 487; Zalacain y cols., 2005).

3. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

El objetivo del presente trabajo es evaluar *in vitro* la genotoxicidad del compuesto PTS mediante el ensayo de MN empleando la línea celular L5178Y/Tk[±] de células de linfoma de ratón en ausencia y presencia de la fracción microsómica S9. Con este ensayo, se podrá conocer los efectos clastogénicos y/o aneugénicos de dicho compuesto y/o metabolitos, para así dilucidar el posible mecanismo de acción de dicho organosulfurado y conocer el posible riesgo de la utilización de este componente en la industria alimentaria.

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1. Productos químicos

PTS fue cedido por la empresa DOMCA S.L. (Granada, España), ciclofosfamida (CP, CAS No. 6055-19-2), citocalasina B (Cyt-B ,98%, CAS No. 14,930-96-2), Giemsa (CAS No. 51,811-82-6), Dimetil sulfoxido (DMSO) (CAS No. 67-68-5), solución de azul tripán al 0.4% (CAS No. 72-57-1) fue adquirido de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Medio de cultivo RPMI 1640, suero de caballo, solución de L-glutamina (CAS No. 56-85-9), solución penicilina/estreptomicina, piruvato de sodio (CAS No. 113-24-6) y anfotericina B (CAS No. 1397-89-3) fueron proporcionados por Gibco (Biomol, Sevilla, España).

4.2. Células y condiciones de cultivo

Línea celular L5178Y/Tk[±] de células de linfoma de ratón fueron cedidas por Dr. Olivier Gillardeux (Safoni- Synthélabo, Paris, France) (Figura 2). Las células fueron mantenidas en medio de cultivo RPMI 1640 reconstituido con 10% de suero de caballo inactivado, 1mM piruvato, 2mM L-Glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 g/mL estreptomicina y 2.5 g/mL anfotericina B.

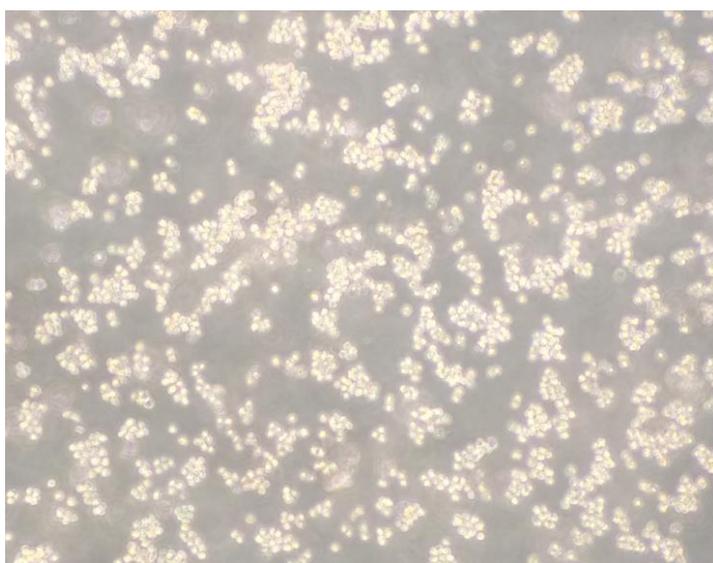


Figura 2. Línea celular L5178Y/Tk[±] de células de linfoma de ratón.

La línea celular fue mantenida en un incubador humidificado con 5% de CO₂ a 37°C. El medio fue cambiado 3 veces por semana y las células se cultivaron en suspensión en frascos estériles de 75 cm².

Los linfocitos fueron contados en cámara de Neubauer (Fuchs-Rosenthal, Alemania) y la viabilidad se determinó por el ensayo de exclusión de azul tripán. Para llevar a cabo el ensayo las células fueron sembradas a una densidad de 2 x 10⁵ cél /mL.

4.3. Concentraciones utilizadas

El rango de concentraciones de exposición de PTS fue establecido mediante un ensayo previo de viabilidad en las células L5178Y/Tk[±] en el que se determinó la concentración efectiva media (EC₅₀) tanto en ausencia como en presencia de la fracción metabólica S9. Las células fueron expuestas a concentraciones de PTS (0-1000 µM) para determinar su viabilidad utilizando azul tripán como indicador (Mellado-García y cols., 2015). Las células fueron sembradas a una densidad de 2 x 10⁵ cél /mL y fueron expuestas 24h al PTS en ausencia de S9 y 4h en presencia de S9 para determinar su viabilidad.

La solución madre de PTS (400 mM) fue preparada en DMSO. La concentración final de DMSO no superó el 0,1%. Las concentraciones ensayadas se prepararon en medio RPMI 1640. El medio RPMI 1640 se utilizó como control negativo y la Mitomicina C (0,0625 µg/mL) y la Ciclofosfamida (8 µg/mL) fueron utilizados como controles positivos para los diferentes ensayos de ausencia y presencia de S9 respectivamente.

La EC₅₀ obtenida en el ensayo de viabilidad fue de 17,25 µM de PTS en ausencia de la fracción metabólica S9 y de 25 µM de PTS en presencia de S9. El rango de concentración seleccionado fue 0-17,25 µM de PTS en ausencia de la fracción metabólica S9, y de 0-25 µM de PTS en presencia de S9.

4.4. Ensayo de micronúcleos

El ensayo de MN consiste en detectar material interfásico dañado, producto de la fragmentación cromosómica o de errores en la división celular en 2000 células binucleadas con citoplasma definido (Castillo y cols., 2011) (Figura 3.).

Los MN se pueden producir a partir cromosomas enteros que no han podido migrar a los polos durante la división celular en la anafase, a partir de fragmentos de cromosomas acéntricos que se quedan excluidos del núcleo principal de la nueva célula durante la anafase mitótica y/o fragmentos de cromosomas que se retrasaron durante la división celular y no se introdujeron en el núcleo principal durante la telofase.

El ensayo permite detectar tanto efectos clastogénicos (aberraciones cromosómicas estructurales) y/o aneugénicos (aberraciones cromosómicas que se producen por alteraciones numéricas) durante o después de la división celular (EFSA, 2011; OCDE 487) (Figura 3).

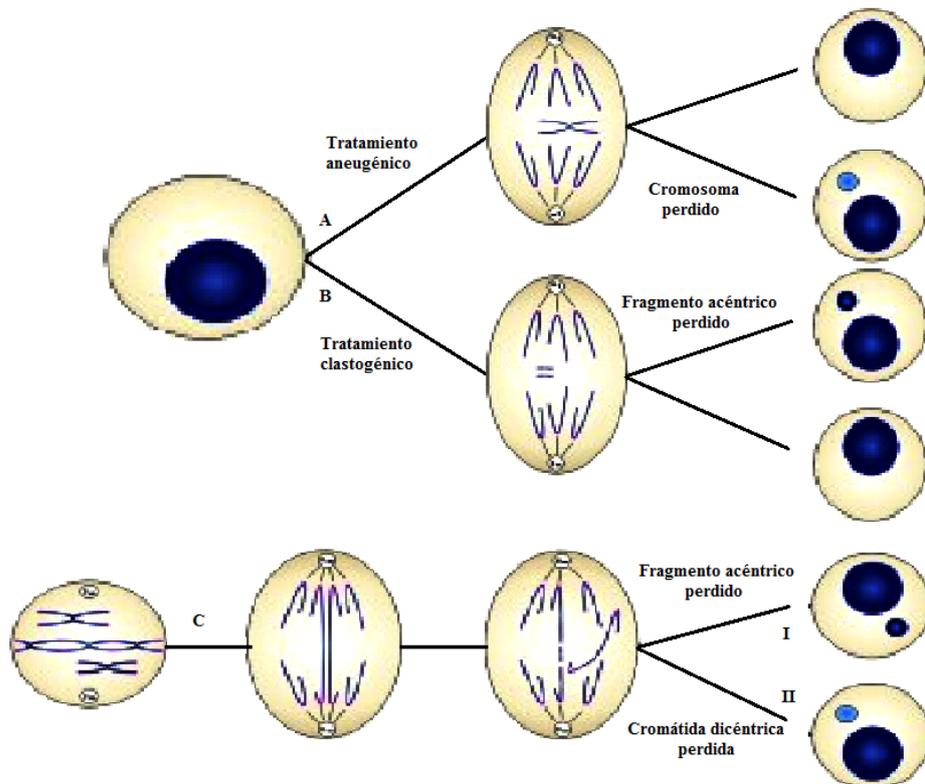


Figura 3. Mecanismo de formación de MN. Tomada de Terradas y cols. (2010).

Este ensayo fue realizado siguiendo las recomendaciones de la guía 487 de la OCDE y el protocolo descrito por Maisanaba y cols. (2015).

En primer lugar, las células L5178Y/Tk[±] se sembraron a una densidad de 2×10^5 cél /mL (Figura 4).

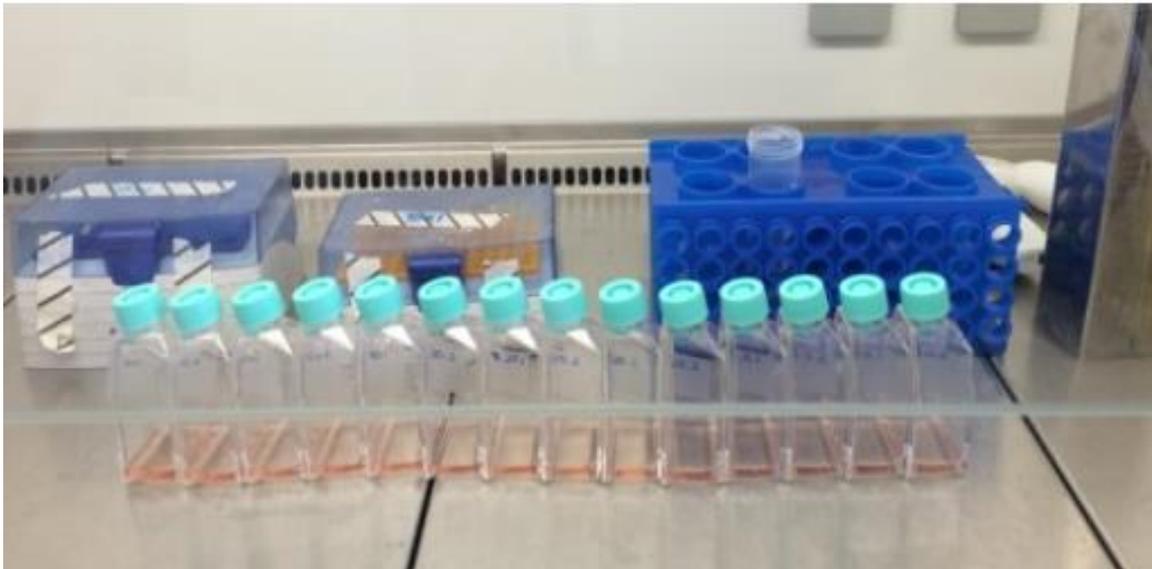


Figura 4. Frascos para la preparación del ensayo de MN

Fueron incubadas durante 24h a 37°C y 5% de CO₂ para favorecer la proliferación celular. Posteriormente el medio de cultivo se eliminó por centrifugación (6000 rpm, 6 min) y las células fueron tratadas con 5 concentraciones diferentes de PTS en función de la EC₅₀ previamente obtenida. Pasado el tiempo de tratamiento, el medio fue eliminado y a continuación las células fueron resuspendidas con medio y expuestas a la Cyt-B a una concentración de 6 µg/mL durante 20h. La Cyt-B detiene el proceso de división celular de aquellas células que han sufrido una división mitótica, impidiendo la citocinesis celular (Fenech, 2000) (Figura 5).

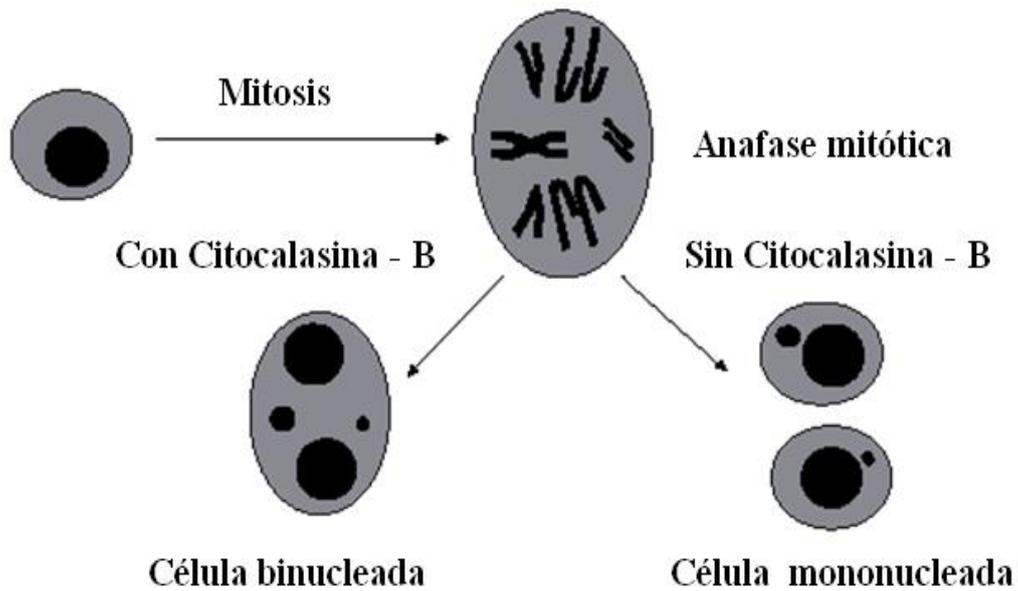


Figura 5. Obtención de células binucleadas y formación de micronúcleos por bloqueo con Cit-B. Tomada de Zalacain y cols. (2005).

Posteriormente los cultivos fueron centrifugados (6000 rpm, 6 min), y el sobrenadante se eliminó (Figura 6).

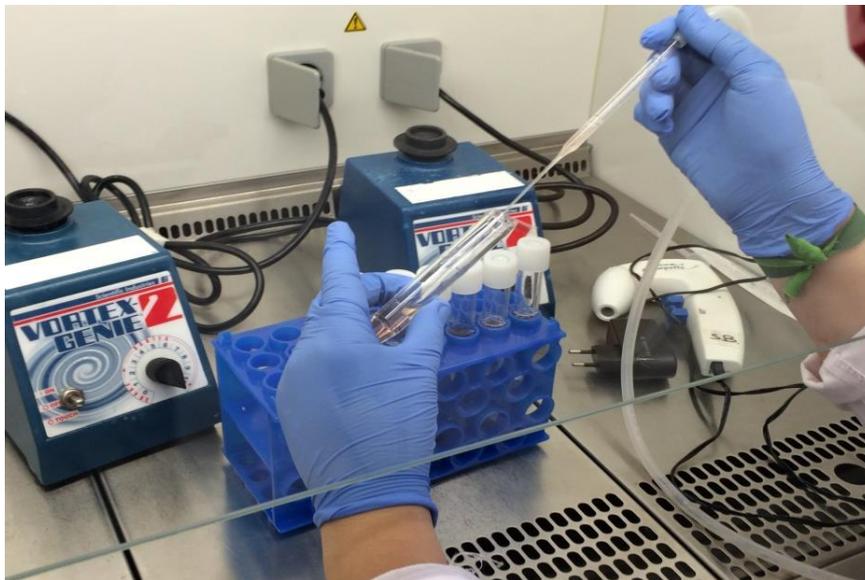


Figura 6. Eliminación del sobrenadante tras la centrifugación.

Las células fueron sometidas a un tratamiento hipotónico (KCl 0,051M, 20 min, T^a ambiente). Transcurrido el tiempo las células fueron centrifugadas y fijadas con metanol/ácido acético (4:1) y se les añadió un par de gotas de formaldehído. La

suspensión celular obtenida fue resuspendida en metanol/acético y goteados en portaobjetos. Después del secado las células fueron teñidas con Giemsa al 10 % durante 1 min.

Las células se visualizaron en el Servicio de Microscopio del Centro de Investigación Tecnológica e Investigación de la Universidad de Sevilla, utilizando el microscopio óptico Olympus BX61 con el objetivo 100X con aceite de inmersión. Para el recuento de MN se analizaron 2000 células binucleadas por concentración y fue expresado como % BNMN. Además, también se determinó el Índice de División Nuclear (IDN) de acuerdo al método de Eastmond y Tucker. Se cuantificaron 500 células viables para determinar la frecuencia de células con 1, 2, 3 ó 4 núcleos y se calculó usando la fórmula:

$$\text{IDN} = (\text{M1} + 2(\text{M2}) + 3(\text{M3}) + 4(\text{M4})) / \text{N}$$

M1- M4 representan el número de células con 1- 4 núcleos y N el número total de células viables cuantificadas (Fenech, 2000).

4.5 Estudio estadístico y tratamiento de datos

Todas las concentraciones ensayadas fueron realizadas por duplicado. Los valores del estudio de viabilidad han sido representados como porcentajes aritméticos \pm la desviación estándar (DS) en relación con el control negativo (100% de viabilidad celular). El programa que se ha empleado para registrar esos valores y representarlos ha sido Microsoft Office Excel®. Asimismo, dicho programa fue empleado para el cálculo de la Concentración Efectiva Media (EC₅₀) mediante un ajuste por mínimos cuadrados, así como para la realización de las gráficas adjuntas. EL % MN se evaluó mediante el programa estadístico Graphpad inStat®, análisis de la varianza (ANOVA), seguida del test Chi-square. Para el IDN se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA), seguida de Kruskal- Wallis. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando el valor de *P* fue < 0,001.

5. RESULTADOS

5.1. Ensayos de viabilidad celular

Las concentraciones evaluadas en el ensayo de MN fueron elegidas de acuerdo a la concentración efectiva media (EC_{50}) obtenida a través del test de exclusión del azul tripán (Gráfico 1).

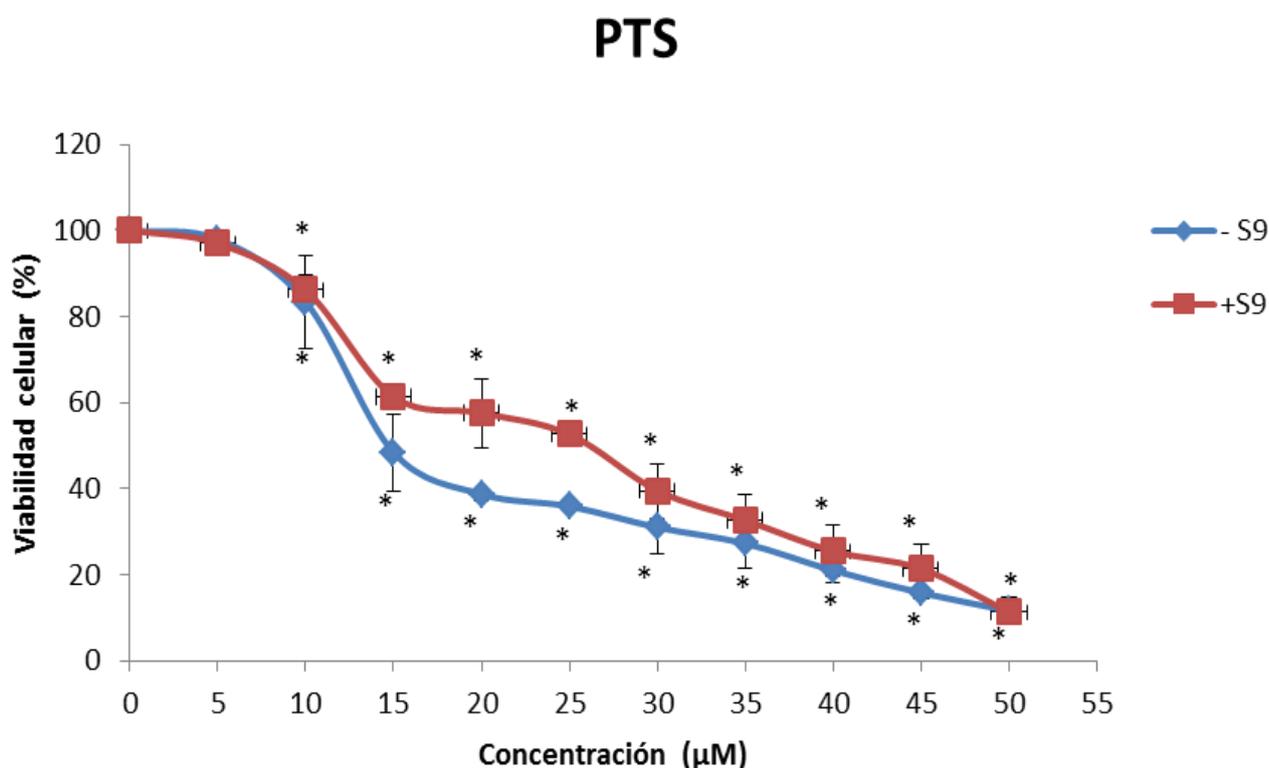


Gráfico 1. Viabilidad celular en cultivos L5178Y/Tk[±] tras exposición a PTS (0-1000 µM). Los resultados están expresados como la media \pm la SD. * Diferencias significativas cuando $P < 0.001$.

Los resultados muestran una reducción del 50% de la viabilidad celular a partir de 17,25 µM en ausencia de la fracción microsómica S9. En presencia de la fracción microsómica S9 el 50 % del descenso de la viabilidad celular se produce a partir de 25 µM.

5.1 Ensayo de MN

En el ensayo de genotoxicidad, el PTS fue evaluado en ausencia (Tabla 1) y presencia (Tabla 2) del factor de activación metabólica S9. Las concentraciones evaluadas fueron elegidas de acuerdo a la EC₅₀ obtenida en el ensayo de viabilidad celular (0-25 µM).

Cuando el PTS fue evaluado en ausencia de S9 solo la concentración más alta ensayada (17,25 µM) mostró un incremento significativo ($P < 0,0001$) del porcentaje de células binucleadas con MN (% BNMN) con respecto al grupo control. Sin embargo, a concentraciones iguales o inferiores a 12,2 µM, no se observaron cambios significativos con respecto al grupo control. La exposición a Mitomicina C (control positivo) manifestó un incremento significativo en % BNMN con respecto al control negativo. Con respecto al IDN, no se encontraron diferencias significativas ($P < 0,0001$) en los grupos experimentales con respecto al control negativo.

Tabla 1: Porcentaje de células binucleadas con MN e índice de división nuclear en cultivo de células de linfoma de ratón tratadas con PTS en ausencia de la fracción metabólica S9. Los valores son expresados como la media \pm DS. *** $P < 0,0001$ significativamente diferente del control negativo.

Sustancia del estudio	Tiempo de exposición (h)	Concentración	% BNMN \pm DS	IDN \pm DS
Control (-)	24	-	1,45 \pm 0,68	1,55 \pm 0,04
Control (+): Mitomicina C	24	0,0625 µg/mL	6,75 \pm 2,07***	1,40 \pm 0,19
PTS	24	2,1 µM	1,10 \pm 0,74	1,50 \pm 0,13
	24	4,3 µM	1,15 \pm 0,70	1,47 \pm 0,09
	24	8,6 µM	1,05 \pm 0,60	1,61 \pm 0,11
	24	12,2 µM	1,80 \pm 0,63	1,61 \pm 0,09
	24	17,25 µM	3,70 \pm 1,64***	1,76 \pm 0,14

Tabla 2: Porcentaje de células binucleadas con MN e índice de división nuclear en cultivo de células de linfoma de ratón tratadas con PTS en presencia de la fracción metabólica S9. Los valores son expresados como la media \pm DS. *** $P < 0,0001$ significativamente diferente del control negativo.

Sustancia del estudio	Tiempo de exposición (h)	Concentración	% BNMN \pm DS	IDN \pm DS
Control (-)	4	-	0,70 \pm 0,30	1,55 \pm 0,04
Control (+): Ciclofosfamida	4	8 μ g/mL	3,00 \pm 0,70 ***	1,40 \pm 0,19
PTS	4	5 μ M	0,67 \pm 0,20	1,56 \pm 0,05
	4	10 μ M	0,60 \pm 0,30	1,47 \pm 0,09
	4	15 μ M	0,77 \pm 0,32	1,52 \pm 0,11
	4	20 μ M	0,80 \pm 0,27	1,37 \pm 0,20
	4	25 μ M	0,76 \pm 0,27	1,37 \pm 0,15

Cuando el PTS fue evaluado en presencia de S9 solo las células expuestas a Ciclofosfamida mostraron un incremento significativo ($P < 0,0001$) de la frecuencia de BNMN (%) con respecto al control negativo.

Con respecto al IDN, no se encontraron diferencias significativas ($P < 0,0001$) en los grupos experimentales con respecto al control negativo.

6. DISCUSIÓN

Son escasos los estudios que hay hasta la fecha sobre la mutagenicidad/genotoxicidad de los compuestos organosulfurados, componentes del ajo (*Allium sativum*) y de la cebolla (*Allium cepa*) (Llana-Ruiz-Cabello y cols., 2015a). Estos compuestos organosulfurados y en concreto el PTS, necesitan ser evaluados para su posible aplicación en los envases alimentarios.

Tras la realización *in vitro* del ensayo de MN, siguiendo el protocolo de la OCDE 487, los resultados demostraron la capacidad genotóxica del PTS en la línea celular L5178YTk[±], en ausencia de la fracción metabólica S9 tras 24h de tratamiento. El PTS indujo un incremento significativo del % de MN a la concentración más alta ensayada (17,25 μ M) con respecto al control negativo. Sin embargo, se obtuvieron resultados negativos tras la exposición al PTS durante 4 horas en presencia de la fracción metabólica S9 en la misma línea celular. La respuesta positiva al toxico de origen en ausencia de S9, indica que es el PTS el responsable del daño genotóxico y no sus metabolitos. Las diferencias de resultados observados en nuestro experimento, muestran la importancia de la utilización de la fracción microsómica. Por tanto, es fundamental el uso de sistemas de activación metabólica externos para la realización de los ensayos de genotoxicidad (EFSA, 2011).

Mellado-García y cols. (2015) evaluaron la genotoxicidad del PTSO mediante el ensayo de MN en la línea celular L5178YTk[±]. Tras el tratamiento en ausencia de la fracción metabólica S9, no se observó incremento del % de MN. Por el contrario, se obtuvieron resultados positivos cuando se evaluó la capacidad genotóxica de los metabolitos del PTSO. Por lo tanto ambos compuestos sulfurados presentan perfiles toxicológicos diferentes.

Comparando los datos de ambos compuestos mediante el ensayo de MN, podemos predecir que el PTS tras su biotransformación en el hígado daría lugar a metabolitos menos tóxicos que el xenobiótico de partida, a diferencia que el PTSO. Sin embargo, ninguna línea celular *in vitro*, va a tener por sí misma plena capacidad de biotransformación metabólica ni de expresión enzimática, ya que la expresión de

algunas enzimas cesa o se reduce drásticamente en el cultivo celular, al contrario de lo que ocurre en el organismo humano. Del mismo modo sólo los organismos *in vivo* son los que aseguran la reducción de intermediarios reactivos a través de los sistemas de detoxificación, cosa que no ocurre *in vitro* (EFSA, 2011).

Hasta la fecha no existe ningún ensayo *in vivo* donde se evalúe la genotoxicidad del PTS. PTSO se evaluó *in vivo* a través de la administración oral en ratas Wistar mediante la realización del ensayo de MN en medula ósea (OECD 474). Los resultados obtenidos confirmaron la no genotoxicidad del PTSO a las dosis ensayadas (0-55 mg/kg) (Mellado-García y cols., 2016a).

En relación con otros compuestos organosulfurados, Musk y cols. (1997) demostraron que el (sulfuro de dialilo (DAS) y disulfuro de dialilo (DADS)), podían inducir aberraciones cromosómicas e intercambio entre cromátidas hermanas en células de ovario de hámster chino.

Otros compuestos activos que forman parte de los AEs han sido evaluados mediante el ensayo de MN. Maisanaba y cols. (2015) evaluaron la capacidad genotóxica del timol y carvacrol, compuestos mayoritarios del AEs de *Origanum vulgare*. Cuando se evaluó el perfil toxicológico del timol (0-250 μ M), se observó ausencia de daño genotóxico a las concentraciones ensayadas tanto en ausencia como en presencia de S9. Tras la exposición de las células L5178YTk \pm a carvacrol (0-700 μ M), se observó un incremento significativo de la frecuencia de BNMN a la concentración más alta ensayada (700 μ M) en ausencia de S9. Por el contrario, no se observaron tales resultados en presencia de S9, determinándose la nula toxicidad de los metabolitos del carvacrol.

En general, la mayoría de los AEs con potencial aplicación en envases alimentarios carecen de efectos mutagénicos/genotóxicos (Llana- Ruiz-Cabello y cols., 2015a). No obstante, el creciente interés por estas sustancias y sus principales compuestos hace necesario la realización de exhaustivos estudios en los cuales se evalúe su perfil toxicológico, siendo el ensayo de MN uno de los principales métodos *in vitro*. Las ventajas que presenta son: analiza un gran número de células, es una técnica rápida y sencilla y permite detectar efectos clastogénicos y aneugénicos (EFSA, 2011).

7. CONCLUSIONES

En el presente estudio, se evaluó el potencial genotóxico de PTS a través del ensayo de MN *in vitro*. Los resultados obtenidos en las células L5178YTk[±], indican que el PTS muestra actividad genotóxica a 17,25 μM tras 24h de tratamiento en ausencia de S9. Sin embargo, a concentraciones iguales o inferiores a 12,2 μM en ausencia de S9 y a concentraciones iguales o menores de 25 μM en presencia de S9, el PTS no induce anomalías en la estructura de los cromosomas y cromátidas, ya que no se ve afectada la frecuencia de MN en células binucleadas ni el índice de división celular. Para poder confirmar dichos resultados y siguiendo las recomendaciones de las autoridades competentes (EFSA, 2011), son necesarios otros estudios *in vitro* tales como el test de Ames (OECD 471), el ensayo cometa (OECD 489) o el test de linfoma de ratón (OECD 476), que corroboren la seguridad del PTS y por tanto su posible aplicación en la industria alimentaria. En el caso de obtener resultados contradictorios tras la realización de la batería de ensayos *in vitro*, y siguiendo las recomendaciones pertinentes sería adecuado realizar la evaluación *in vivo* del PTS, a través del ensayo de MN en médula ósea de mamífero en eritrocitos de mamíferos (OECD 474) para confirmar su seguridad antes de su uso en los envases activos.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* 2008; 46: 446-75.
2. Benkeblia N, Lanzotti, V. Allium thiosulfinates: chemistry, biological properties and their potential utilization in food preservation. *Food* 2007; 1: 193-201.
3. Castillo E, Guevara-Fujita ML, Fujita R. Optimización del test de micronúcleos en linfocitos cultivados usando una metodología de gradiente y frotis. *Rev. Perú. Bio.* 2011; 18: 261-63.
4. Coronado M, Vega y León S, Gutiérrez R, Vázquez M, Radilla C. Antioxidants: present perspective for the human health. *Rev. Chil. Nutr.* 2015; 42: 206-12.
5. Corzo- Martinez M, Corzo N, Villamiel M. Biological properties of onions and garlic. *Trends Food Sci and Technol.* 2007; 18(12): 609-625.
6. European Food Safety Authority (EFSA). EFSA CEF Panel. Guidelines on submission of a dossier for safety evaluation by the EFSA of active or intelligent substances present in active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food. *EFSA Journal* ; 2009. 1208 : 2-11.
7. EFSA Scientific Committee. Scientific Opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA Journal* 2011. 9 2379 : 1-69.
8. Fenech M .The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 2000; 455: 81-95.
9. Ipek E, Zeytinoglu H, Okay S, Tuylu BA, Kurkcoglu M, Can Baser KH. Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames *Salmonella*/ microsomal test. *Food Chem.* 2005; 93: 551-56.
10. Llana Ruiz- Cabello M, Pichardo S, Maisanaba S, Puerto M, Prieto AI, Gutierrez-Praena, D et al. *In vitro* toxicological evaluation of essential oils and their main compounds used in active food packing: a review. *Food Chem. Toxicol.* 2015a; 81: 9-27.

11. Llana Ruiz - Cabello M, Maisanaba S, Gutierrez-Praena D, Prieto AI, Pichardo S, Jos A et al. Cytotoxic and mutagenic *in vitro* assessment of two organosulfur compounds derived from onion to be used in the food industry. *Food Chem.* 2015b; 166: 423-31.
12. Llana Ruiz- Cabello M, Pichardo S, Baños A, Núñez C, Bermúdez JM, Guillamon E et al. Characterisation and evaluation of PLA films containing an extract of *Allium spp.* To be used in the packing of ready – to-eat salads under controlled atmospheres. *LWT Food Sci. Technol.* 2015c; 64: 1354-61.
13. Llana Ruiz- Cabello M, Gutierrez-Praena D, Puerto M, Pichardo S, Moreno F.J, Baños A et al. Acute toxicological studies of the main organosulfur compound derived from *Allium spp.* intended to be used in active food packing. *Food. Chem. Toxicol.* 2015d; 82: 1-11.
14. Maisanaba S, Prieto AI, Puerto M, Gutiérrez-Praena D, Demir E, Marcos R et al. *In vitro* genotoxicity testing of carvacrol and thymol using the micronucleus and mouse lymphoma assays. *Mutat. Res.* 2015; 784-785: 37-44.
15. Mellado García P, Maisanaba S, Puerto M, Llana Ruiz- Cabello M, Prieto AI, Marcos R et al. Genotoxicity assessment of propyl thiosulfinate oxide, an organosulfur compound from *Allium* extract, intended to food active packaging. *Food Chem. Toxicol.* 2015; 86: 365-73.
16. Mellado García P, Puerto M, Prieto AI, Pichardo S, Martin-Cameán AM, Moyano R et al. Genotoxicity of a thiosulfinate compound derived from *Allium sp.* intended to be used in active food packing: *In vivo* comet assay and micronucleus test. *Mutat. Res.* 2016a; 800: 1-11.
17. Mellado García P, Puerto M, Pichardo S, Llana Ruiz- Cabello M, Moyano R, Blanco A et al. Toxicological evaluation of an *Allium*-based commercial product in a 90-day feeding study in Sprague – Dawley rats. *Food Chem. Toxicol.* 2016b; 90: 8-29.
18. Musk SRR, Clapham F, Johnson IT. Cytotoxicity and genotoxicity of diallyl sulfide and diallyl disulfide towards Chinese hamster ovary cells. *Food Chem. Toxicol.* 1997; 35: 379-85.

19. OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). *In vitro* Mammalian Cells Micronucleus Test. OECD Guideline for Testing of Chemicals; 2014. Guideline 487.
20. Paseiro P, Cacho J, Juárez M, Ortega T, Nerín C, López R. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los envases activos e inteligentes. Revista del comité científico. Madrid: AESAN; 2010. ISSN 1885-6586.
21. Souza AC, Goto GEO, Minardi JA, Coelho ACV, Tadini CC. Cassava starch composite films incorporated with cinnamon essential oil: antimicrobial activity. Microstructure, mechanical and barrier properties. Food Sci. Technol. 2013; 54: 346-52.
22. Sung SY, Sin LT, Tee TT, Bee ST, Rahmat AR, Rahman WAWA et al. Antimicrobial agents for food packing applications. Trends Food Sci. Tech. 2013; 33(2): 110-123.
23. Terradas M, Martin M, Tusell L, Genescá A. Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell. Mutat. Res. 2010; 705: 60-67.
24. Ye C, Dai L, Hu WL. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from onion (*Allium cepa* L.). Food control 2013; 30: 48-53.
25. Zalacain M, Sierrasesúmaga L, Patiño A. The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. An. Sist. Sanit.Navar. 2005; 28: 227-35.

9. ANEXO

Comunicaciones derivadas de este trabajo:

- ✓ **Comunicación oral** que se presentará en Las Jornadas de Toxicología Españolas e Iberoamericanas 2016, organizadas por la Asociación Española de Toxicología (AETOX) y se celebrará en Sevilla en junio de 2016.

REALIZACIÓN DE ENSAYO DE MICRONÚCLEOS Y COMETA PARA LA EVALUACIÓN GENOTÓXICA DEL ORGANOSULFURADO PROPIL PROPANO TIOSULFINATO

Medrano C¹, Mellado-García P¹, Diez-Quijada L¹, Puerto M¹, Prieto A.I¹, Pichardo S¹, Cameán AM¹.

¹Área de Toxicología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla, Profesor García González n^o 2, 41012 Sevilla, España

Los aceites esenciales han sido ampliamente utilizados en la industria alimentaria para intentar aumentar la vida útil de los alimentos. Muchas de estas propiedades son atribuidas a su contenido en compuestos azufrados volátiles presentes en diferentes especies del género *Allium sp.* La genotoxicidad de dichos compuestos tiene que ser comprobada antes de ser incorporados en el envasado como componente activo. En este sentido y siguiendo las recomendaciones de la EFSA para la evaluación de sustancias que entran en contacto con los alimentos, el objetivo de este estudio fue investigar la genotoxicidad de propil propano tiosulfonato (PTS). Para ello, dicho compuesto fue evaluado en células Caco-2 mediante el ensayo cometa (estándar y modificado) durante 24 y 48 horas de exposición (70-280 μM) y sobre las células L5178Y tk^{+/-} mediante el ensayo de micronúcleos (MN) (2.1- 25 μM) con y sin la adición de la fracción microsómica S9. Los resultados obtenidos para el ensayo cometa estándar indicaron que no existen roturas simples en el ADN a 24 horas. Además, el tratamiento posterior con endonucleasa III y formamidopirimidina ADN glicosilasa no mostró diferencias significativas en los grupos tratados respecto al control. Basándonos en los valores del

ensayo de MN, el PTS indujo un leve pero significativo aumento de la frecuencia de MN en las células binucleadas, pero sólo a las concentraciones más altas ensayadas en presencia y ausencia de S9. Este trabajo demuestra el bajo riesgo genotóxico del PTS; sin embargo, con el fin de completar estos datos, otros ensayos de mutagenicidad *in vitro* e *in vivo* son necesarios para confirmar la seguridad de este compuesto.

Agradecimientos: los autores agradecen al Ministerio de Innovación y Ciencia del Gobierno de España (AGL201238357C0201) cofinanciados con fondos FEDER, a la Junta de Andalucía (AGR-7252); y al servicio de microscopía del Citius de la Universidad de Sevilla por el apoyo técnico prestado.

Palabras clave: PTS, genotoxicidad, Ensayo de micronúcleos, Ensayo cometa.



- ✓ **Comunicación poster** que se presentará en el 52nd Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2016) y se celebrará en Sevilla en septiembre de 2016.

IN VITRO GENOTOXICITY ASSESSMENT BY MICRONUCLEUS TEST AND COMET ASSAY USING AN ORGASULFUR COMPOUND.

*Mellado-García P¹, Díez-Quijada L¹, Medrano C¹, Puerto M¹, Prieto AI¹, Pichardo S¹, Cameán AM^{*1}.*

¹Area of Toxicology. Faculty of Pharmacy. Universidad de Sevilla, Profesor García González n^o2, 41012 Sevilla, España

Essential oils (EO) and their main compounds have been extensively used due to their application in the food industry for improving the shelf life of food. Many of these effects are attributed to the thiosulfonates, that are volatile sulfur compounds presented in vegetables as onion (*Allium sativum*) and garlic (*Allium cepa*). Therefore its safety should be confirmed by different toxicity assays. In this sense, according to the recommendation from the EFSA for the genotoxic assessment of substances in food and feed, the aim of this study was to investigate the genotoxicity of propyl propane thiosulfinate (PTS) present in a commercial *Allium* spp. extract, Proallium AP®. It was evaluated in Caco2 cells by the comet assay (standard and modified) (70-280 µM) during 24 and 48 hours of exposure, and on L5178Y tk+/ for micronucleus test (MN) (2.1- 25µM) with and without adding S9. Preliminary results from the standard comet assay revealed no significant increase in DNA strand breakage at 24h; moreover, differences were reported at 280 µM after 48h of exposure. Furthermore, post-treatment with endonuclease III or formamido pyrimidine glycosylase showed no difference between treated and untreated groups. On the other hand, based on the values of the MN test, PTS induced a slight but significant increase in the frequency of MN in binucleated cells, but only at the highest concentration tested in absence and presence of S9 mix. Further in vivo genotoxicity tests are needed to confirm its safety before its use as active additive in food packaging. Acknowledgment: the Spanish Ministry of Science and Innovation (AGL2012-38357-C02-01) co-financed by FEDER Funds, and Junta de

Andalucía (AGR-7252); and the Microscopy Service of CITIUS from the University of Seville for technical support.

Keywords: PTS, genotoxicity, Micronucleus test, Comet assay

TOPIC: Food Safety/Food Allergies

