

EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DEL ACEITE ESENCIAL DE
Lippia alba SOBRE LA TOXICIDAD DEL MERCUROCROMO
EN RAICES DE *Allium cepa*.

ANTONIA PAOLA VERA OSPINA



SISTEMA UNIVERSITARIO ESTATAL DEL CARIBE COLOMBIANO

SUE-CARIBE

MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

CARTAGENA DE INDIAS, DICIEMBRE DE 2009

EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DEL ACEITE ESENCIAL DE
Lippia alba SOBRE LA TOXICIDAD DEL MERCUROCROMO
EN RAICES DE *Allium cepa*.

ANTONIA PAOLA VERA OSPINA

Trabajo grado realizado como requisito para optar el título de
Magíster en Ciencias Ambientales

JESÚS TADEO OLIVERO VERBEL, Ph.D.

Director

BEATRIZ EUGENIA JARAMILLO COLORADO, Ph.D.

Co-Directora



SISTEMA UNIVERSITARIO ESTATAL DEL CARIBE COLOMBIANO

SUE-CARIBE

MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

CARTAGENA DE INDIAS, DICIEMBRE DE 2009

NOTAS DE APROBACIÓN DEL JURADO

PRESIDENTE DEL JURADO

JURADO

JURADO

CARTAGENA DE INDIAS, DICIEMBRE DE 2009

Agradecimientos

Gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el período de estudio.

Al Sistema Universitario Estatal del Caribe Colombiano (SUE-CARIBE) por permitirnos formar parte de él y ser el pilar en nuestro avance académico.

A la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Cartagena, por el soporte institucional dado para la realización de este trabajo.

Al grupo de Investigación de Química Ambiental y Computacional de la Universidad de Cartagena, por la guía y apoyo en la realización de este trabajo.

Al grupo de Investigación LIFFUC de la Universidad de Cartagena, por su apoyo y colaboración.

Al Centro de Excelencia CENVAM (Universidad Industrial de Santander), por el apoyo a este trabajo de investigación.

Al Dr. Jesús Olivero por su asesoría y dirección en el trabajo de investigación.

A mi Co-directora la Dra. Beatriz Jaramillo, por su asesoría y consejos en el desarrollo de este trabajo.

A mi gran amiga Nivis por brindarme su apoyo incondicional, por todos los momentos compartidos y por compartir juntas otro escalón en nuestra formación académica.

A mis compañeros Karina, Jorge, Dilia, Irina, Moisés y Nafer por su apoyo y colaboración.

Hago extensivo mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron o participaron en la realización de esta investigación.

DEDICATORIA

A Dios, quien ha permitido que la sabiduría dirija y guíe mis pasos, quien ha iluminado mi sendero cuando más oscuro ha estado, quien me ha dado fortaleza para continuar cuando apunto de caer he estado. Por llenar mi vida de dicha y bendiciones y por ser siempre la luz en mi camino.

A la memoria de Martha Cecilia y Jorge Orlando, seres que se han marchado físicamente, a los cuales extraño con todo mi corazón, espero que desde el cielo compartan conmigo este nuevo triunfo y sigan guiando mi camino, llenándome de bendiciones.

A mi madre Nubia por su sacrificio desmedido y desinteresado para procurar mi bienestar. A mi abuela Edith, mis tíos William y Junior y a mis primos por estar conmigo en todo momento, apoyándome y brindándome todo su amor, aun en los momentos difíciles. Los quiero con todo mi corazón y este trabajo es para ustedes, aquí esta todo lo que ustedes me brindaron, solo espero poder devolver un poco todo lo que me han dado a través todos los años de vida.

A Fredyc por su amor, apoyo y compañía en cada etapa del camino recorrido juntos y por mostrarme con una sonrisa que el amor de verdad puede existir.

TABLA DE CONTENIDO

	<i>Pág.</i>
LISTA DE TABLAS	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	16
RESUMEN	20
1. INTRODUCCIÓN	26
2. MARCO TEORÍCO	28
2.1. Metales Pesados	28
2.1.1. Mercurio	28
2.1.1.1. Generalidades sobre el Mercurio	28
2.1.1.2. Características Físicoquímicas del Mercurio	29
2.1.1.3. Fuentes de Contaminación Ambiental con Mercurio	29
2.1.1.3.1. Fuentes Naturales	29
2.1.1.3.2. Fuentes Antropogénicas	30
2.1.1.4. Biogeoquímica del Mercurio, Transporte y Distribución	31
2.1.1.5. Genotoxicidad del Mercurio y sus derivados	32
2.1.1.5.1. Mercurocromo	33
2.1.2. Cadmio	36
2.1.2.1. Generalidades del Cadmio	36
2.1.2.2. Fuentes de Contaminación	36

2.1.2.3.	Toxicidad del Cadmio	36
2.2.	ASPECTOS GENERALES SOBRE GENOTOXICIDAD	39
2.2.1.	Porcentaje de Índice Mitótico (IM)	40
2.2.2.	Aberraciones Cromosómicas (AC)	40
2.3.	<i>Allium cepa</i> como modelo biológico de genotoxicidad	45
2.3.1.	Generalidades sobre <i>Allium cepa</i>	45
2.3.2.	Ensayos realizados con <i>Allium cepa</i>	47
2.4.	ASPECTOS GENERALES SOBRE ACEITES ESENCIALES	48
2.4.1.	Generalidades sobre <i>Lippia alba</i> Miller	50
3.	METODOLOGÍA	53
3.1.	CONDICIONES DEL BIOENSAYO	53
3.1.1.	Proveedor-Tipo de cebolla	53
3.1.2.	Limpieza de la zona radicular	53
3.1.3.	Tipo de agua	54
3.1.4.	Fuente de luz, período de estimulación y temperatura	55
3.1.5.	Cambio de unidad experimental	55
3.1.6.	Recambio total o parcial de las soluciones de experimentación	55
3.2.	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN TÓXICA Y EFECTO GENOTÓXICO DEL MERCUROCROMO EN MERISTEMOS DE <i>Allium cepa</i>	56
3.2.1.	Cultivo celular	56

3.2.2.	Prueba Toxicológica	57
3.2.3.	Prueba citológica: fijación, coloración, montaje y medición	58
3.3.	EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Lippia alba</i>	60
3.3.1.	Cultivo celular	60
3.3.2.	Prueba toxicológica	60
3.3.3.	Prueba citológica: fijación, coloración, montaje y medición	61
3.4.	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	61
4	RESULTADOS	63
5	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	85
6	CONCLUSIONES	89
7	RECOMENDACIONES	91
8	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	92

LISTA DE TABLAS

	<i>Pág.</i>
Tabla 1. Efecto sobre la selección del tipo de cebolla y proveedor, sobre la Longitud Radicular (LR) y el porcentaje de Índice Mitótico (%IM), en un período de 72 horas de exposición y luz directa (lámpara fluorescente blanca) y temperatura de laboratorio (24 - 25 °C). Promedio de tres mediciones más o menos el error estándar.	65
Tabla 2. Efecto de la selección del tipo de cebolla y proveedor, sobre a la Longitud Radicular (LR) y el porcentaje de Índice Mitótico (%IM), en un período de 72 horas de exposición en ausencia de luz (locker) y temperatura de laboratorio (24 -25 °C). Promedio de tres mediciones más o menos el error estándar	66
Tabla 3. Efecto del tipo de agua, sobre la Longitud Radicular (LR), el porcentaje de Índice Mitótico (%IM) y el % de Índice de aberraciones (%IA), utilizando cebollas blancas en un período de 72 horas de exposición. Promedio de tres mediciones más o menos el error estándar.	67

Tabla 4. Efecto del tipo de unidad experimental y cambio total o parcial del medio de cultivo sobre la Longitud Radicular (LR) y el porcentaje de Índice Mitótico (%IM), en un período de 72 horas de exposición en ausencia de luz (locker) y temperatura de laboratorio (24 -25 °C). Promedio de tres mediciones más o menos el error estándar.

67

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Fórmula estructural del Mercurocromo.	35
Figura 2. Representación de esfera para la estructura tridimensional del mercurocromo.	35
Figura 3. Microfotografías de puentes cromosómicos en núcleos de <i>Allium cepa</i> .	38
Figura 4. Microfotografía de letargo núcleos de <i>Allium cepa</i> .	42
Figura 5. Microfotografía de células multipolares núcleos de <i>Allium cepa</i> .	42
Figura 6. Microfotografía de cromosoma aislado núcleos de <i>Allium cepa</i> .	44
Figura 7. Microfotografía de fragmento núcleos de <i>Allium cepa</i>	44
Figura 8. Microfotografía de micronúcleo en núcleos de <i>Allium cepa</i> .	44
Figura 9. Fotografía de la planta de <i>Allium cepa</i> .	46
Figura 10. Fotografía de la planta de <i>Lippia alba</i> Mill.	52
Figura 11. Período de estimulación para el crecimiento de las raíces de <i>Allium cepa</i> .	57
Figura 12. Grupos de trabajo de bulbos de cebolla para evaluación de la concentración tóxica y el efecto genotóxico del mercurocromo en meristemos de <i>Allium cepa</i> .	58

Figura 13.	Preparación citológica para la observación de células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> .	59
Figura 14.	Fases mitóticas	59
Figura 15.	Grupos de trabajo de bulbos de cebolla para evaluación del efecto protector del aceite de <i>Lippia alba</i> contra la toxicidad del mercurocromo.	61
Figura 16.	Efecto de las soluciones de cadmio evaluadas sobre el índice mitótico en raíces de cebolla durante las 24, 48 y 72 horas de exposición.	68
Figura 17.	Efecto de las soluciones de cadmio evaluadas sobre el índice de aberraciones en raíces de cebolla durante las 24, 48 y 72 horas de exposición.	70
Figura 18.	Efecto del mercurocromo sobre el índice mitótico en raíces de cebolla durante las 24 y 72 horas de exposición. El control negativo corresponde a agua potable y el positivo a una solución de Cd 22.5 µM	71
Figura 19.	Efecto del mercurocromo sobre el índice mitótico en raíces de cebolla durante las 24 y 72 horas de exposición. El control negativo corresponde a agua potable y el positivo a una solución de Cd 22.5 µM.	72

Figura 20.	Efecto del mercurocromo sobre el índice de aberraciones en raíces de cebolla a las 24 y 72 horas de exposición. El control negativo corresponde a agua potable y el positivo a una solución de Cd 22.5 μ M.	73
Figura 21.	Efecto del mercurocromo sobre el índice de aberraciones en raíces de cebolla a las 24 y 72 horas de exposición. El control negativo corresponde a agua potable y el positivo a una solución de Cd 22.5 μ M	74
Figura 22.	Efecto del mercurocromo sobre la longitud en raíces de cebolla durante las 24 y 72 horas de exposición. El control negativo corresponde a agua potable y el positivo a una solución de 22.5 μ M.	75
Figura 23.	Efecto del mercurocromo sobre la longitud en raíces de cebolla durante las 24 y 72 horas de exposición. El control negativo corresponde a agua potable y el positivo a una solución de 22.5 μ M	76
Figura 24.	Efecto del mercurocromo sobre el peso en raíces de cebolla durante las 24 y 72 horas de exposición. El control negativo corresponde a agua potable y el positivo a una solución de 22.5 μ M	77

Figura 25.	Efecto del mercurocromo sobre el peso en raíces de cebolla durante las 24 y 72 horas de exposición. El control negativo corresponde a agua potable y el positivo a una solución de 22.5 μ M	78
Figura 26.	Efecto del mercurocromo en ausencia y presencia del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> sobre el índice mitótico en raíces de cebolla durante las 24 y 72 horas de exposición. El control negativo corresponde a una solución de DMSO y el positivo a una solución de Cd 22.5 μ M.	80
Figura 27.	Efecto del mercurocromo en ausencia y presencia del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> sobre el índice de aberraciones en raíces de cebolla durante las 24 y 72 horas de exposición. El control negativo corresponde a una solución de DMSO y el positivo a una solución de Cd 22.5 μ M	81

Figura 28.	Efecto del mercurocromo en ausencia y presencia del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> sobre la longitud en raíces de cebolla durante las 24 y 72 horas de exposición. El control negativo corresponde a una solución de DMSO y el positivo a una solución de Cd 22.5 μ M.	83
Figura 29	Efecto del mercurocromo en ausencia y presencia del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> sobre el peso en raíces de cebolla durante las 24 y 72 horas de exposición. El control negativo corresponde a una solución de DMSO y el positivo a una solución de Cd 22.5 μ M.	84
Figura 30	Adelgazamiento de las raíces de <i>Alium cepa</i> en presencia de mercurocromo. Las flechas señalan la zona de la raíz que presenta afectación (adelgazamiento).	86
Figura 31a.	Raíces expuestas a Cd	87
Fibura 31b.	Raíces expuestas a DMSO.	87

LISTA DE ABREVIATURAS

AC: Aberraciones cromosómicas.

ADN: Acido desoxirribonucleico.

ARN: Acido Ribonucleico.

ATSDR:

CA: Cromosomas aislados.

Cd: Cádmiio.

CM: Células multipolares.

cm: Centímetros

Cr: Cromo

DMSO: Dimetil sulfoxido

EPA: Agencia de Protección Ambiental (siglas en inglés)

FDA: Administración de Drogas y Alimentos (siglas en inglés)

FR: Fragmento

HCl: Ácido clorhídrico

Hg: Mercurio

IA: Índice de Aberraciones

IARC: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer.

IM: Índice mitótico

INVIMA: Instituto Nacional para la Vigilancia y Control de Medicamentos

LE: Letargo.

LR: Longitud Radicular

mm: Milímetro

MN: Micronúcleos.

NAD⁺: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Oxidado

NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Reducido

Pb: Plomo

PU: Puente

SEM: Error estándar de la media

WHO: World Health Organización

μ M : Micromolar

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la genotoxicidad y citotoxicidad del mercurocromo (merbromina) y el efecto protector del aceite esencial obtenido de la planta *Lippia alba* (Mill.). Se utilizó como sistema de prueba el Test de *Allium cepa*, el cual permite relacionar propiedades físico-químicas, concentración, tiempo de exposición, factores biológicos y nutricionales con la fitotóxicidad y genotoxicidad de un contaminante químico. Se utilizaron meristemos radiculares de cebolla blanca obtenidos de la incubación de los bulbos en agua potable, expuestos posteriormente a soluciones de mercurocromo (0.01, 0.1, 1, 10, 50, 100, 250 y 500 μM), a tiempos de exposición de 24 y 72 horas y empleando como blanco agua potable. El mismo procedimiento fue utilizado en un ensayo independiente para el aceite de *L. alba*. El efecto protector del aceite esencial de *L. alba* sobre la toxicidad del mercurocromo en los meristemos fue evaluado exponiéndolos a una concentración de 10 y 500 μM del mismo, más el aceite esencial (100 μM) con sus controles respectivos (DMSO y Cd). Para cada ensayo fue obtenido el índice mitótico (IM), la inhibición del crecimiento radicular, peso y la inducción de aberraciones cromosómicas, incluyendo puentes, cromosomas aislados y fragmentados. Los experimentos fueron realizados por triplicado con dos réplicas en cada caso y las diferencias entre medias para los diferentes grupos fueron evaluadas empleando ANOVA de una vía seguido de un Test de Turkey- Kramer para comparaciones múltiples ($p < 0.001$). Los resultados obtenidos indicaron que el mercurocromo posee una actividad tóxica en el rango de concentraciones entre 10 a 500 μM , siendo más marcado el efecto en el índice de aberraciones a las concentraciones de 100, 250 y 500 μM . El efecto protector del aceite esencial de *L. alba* fue observado al analizar las diferencias significativas que se presentaron cuando se compararon los valores de los parámetros evaluados, a saber

Índice Mitótico (IM), Índice de Aberraciones (IA), longitud y peso de las raíces para las dos concentraciones de mercurocromo ensayadas (10 y 500 μM), en ausencia y presencia del aceite esencial (100 ppm).

1. INTRODUCCIÓN

El actual desarrollo global en las últimas décadas ha estado caracterizado por un incremento en la utilización de sustancias químicas tóxicas asociadas con diferentes tipos de actividades (industrial, urbana, hospitalaria, comercial y agrícola (Ronco *et al.*, 2002), las cuales afectan tanto la salud humana como la de los ecosistemas en países desarrollados y en vías de desarrollo. Los estimados de compuestos orgánicos y de metales liberados en el ambiente son del orden de algunos millones de toneladas por año (Forget *et al.*, 2000), convirtiendo estos en enemigos ocultos pero persistentes; es por ello que, como un instrumento alternativo y que complementa los tradicionales análisis químicos para la determinación de toxicidad de muestras ambientales, surgen los bioensayos (CETESB, 1991). Los realizados *in vitro*, han ganado aceptación en las estrategias de biomonitorio, fundamentalmente porque suministran resultados confiables, simples y rápidos (Gustavson *et al.*, 2000). Estos bioensayos pueden auxiliar en la evaluación de los efectos a la salud (toxicidad humana y animal) y de los efectos ecológicos, de millares de sustancias químicas tóxicas que son introducidas por varias vías en el ambiente y permiten su aplicación en programas de monitoreo en la evaluación de la toxicidad (CETESB, 1991).

Para determinar el nivel de riesgo ambiental de los metales pesados son utilizados varios bioensayos (Arkhipchuk *et al.*, 2000); entre ellos, las plantas terrestres presentan especies representativas de los agroecosistemas hortícolas (Iannacone *et al.*, 2000). Calow (1993) señaló la potencialidad del uso de cebolla (*Allium cepa* L.), para evaluar la toxicidad y el riesgo de sustancias químicas peligrosas al ambiente. Las plantas vasculares han sido recomendadas por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) y por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA), ambas agencias

gubernamentales de los Estados Unidos, debido a su buena sensibilidad, en comparación con semillas de otras especies de plantas terrestres (Wang, 1991). El ensayo ecotoxicológico con semillas de plantas vasculares presenta ventajas (costo, efecto) sobre otras especies terrestres, lo que permite usar cuantitativamente el crecimiento de la raíz. Wang (1991) indicó que el crecimiento de raíz como punto final de lectura, es más sensible a la toxicidad que la germinación de semillas, la cual presenta un alto coeficiente de variación (Rosa *et al.*, 1999). Calow (1993) presentó un resumen de los protocolos de bioensayos de germinación de semilla y de elongación de raíz con diferentes especies de plantas, siendo comparables al protocolo usado en el presente estudio.

La sensibilidad de las especies a los metales pesados varía considerablemente a través de reinos y *Phyla*, siendo las plantas vasculares ligeramente más tolerantes (Rosa *et al.*, 1999). Las diferentes respuestas de las plantas vasculares a metales pesados pueden ser atribuidas a factores genéticos y fisiológicos (Calow, 1993). Lerda (1992) encontró que el Pb reduce el crecimiento radicular y la frecuencia de células mitóticas y el incremento de la frecuencia de células aberrantes en *A. cepa*. La intensidad del efecto está en función de la concentración del Pb. Pal y Nandi (1990) y Liu *et al.* (1995) evaluaron el efecto citológico del Hg en las raíces de bulbos de *A. cepa*.

La determinación de algunos aspectos de la ecotoxicidad de metales pesados empleando bioensayos sencillos y prácticos para catalogar toxicológicamente muestras ambientales contaminadas por Pb, Hg y Cr, contribuye a tomar medidas para evaluar la perturbación de los ecosistemas y promover alternativas de biorremediación (Shanker *et al.*, 1996; Iannacone *et al.*, 2000).

2. MARCO TEÓRICO

En esta revisión se presentan algunos aspectos generales relacionados con los metales pesados, mercurio, aceites esenciales, *Lippia alba*, genotoxicidad, aberraciones cromosómicas y *Allium cepa*.

2.1. Metales Pesados

Los metales pesados son tema de importancia tanto en el campo ambiental como en el de salud pública (Ferrer, 2003). Sus efectos incluyen alteraciones hematológicas, metabólicas, inmunitarias y sobre el desarrollo embrionario (Ramírez, 2006). Entre los metales pesados considerados como contaminantes ambientales, el mercurio presenta gran interés desde el punto de vista toxicológico, debido a su variedad de aplicaciones en fuentes antropogénicas (Prasad, 2004) (fabricación de baterías, pinturas, papel, amalgamas) (Streets *et al.*, 2005), productos cosméticos y farmacológicos (Heron *et al.*, 2004) y debido a su alta volatilidad, ya que una vez emitido a la atmósfera llega a los medios acuáticos transformándose en metilmercurio (Wong, 2003); se encuentra con frecuencia en diferentes matrices ambientales (agua, aire, sedimento), dando como consecuencia una vida media biológica larga, bajo nivel de excreción y poder de acumulación progresivo (Zhang y Wong, 2007).

2.1.1. Mercurio

2.1.1.1. Generalidades sobre el mercurio. El mercurio es un metal pesado de fácil vaporización que causa numerosos efectos adversos en la salud humana y en los ecosistemas naturales (Kazantzis, 2002); puede existir en el ambiente en varias especies químicas: mercurio 0 ó elemental, Hg (conocido en el argot popular como azogue); mercurio ¹⁺ monovalente: ión mercurioso o mercurio (I), (Hg-Hg); mercurio ²⁺ divalente: ión mercúrico o mercurio (II), Hg

y compuestos organomercuriales (Jaffe *et al.*, 2005). Estos últimos son compuestos organometálicos en los cuales el mercurio está unido covalentemente a uno o dos átomos de carbono para formar compuestos del tipo RHgX y RHgR' , respectivamente. Donde R y R' son grupos orgánicos, siendo algunos de los compuestos más comunes las sales de: metilmercurio (CH_3HgX), fenilmercurio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{HgX}$), metoxietilmercurio ($\text{CH}_3\text{OC}_2\text{H}_4\text{HgX}$) y el dimetilmercurio ($\text{CH}_3)_2\text{Hg}$. En los ejemplos anteriores son incluidos compuestos donde X es cloruro, bromuro, ioduro, nitrato o acetato. (Fergusson, 1990; Aparicio, 2006).

2.1.1.2. Características fisicoquímicas del mercurio. El mercurio es el único elemento metálico líquido a temperatura ambiente. Posee brillo parecido a la plata y a 25°C tiene una densidad de 13.456 g/mL. A 20°C la presión de vapor es 0.00212 mm de Hg (WHO, 1990). Entre las propiedades químicas más importantes que caracterizan las especies de mercurio (II) y las alquilmérgicas (RHg^+) aparece su alta afinidad para formar enlaces covalentes con el azufre. Esta propiedad es la que explica la mayor parte de las propiedades biológicas del metal. Cuando el azufre está en forma de grupos sulfidriilo, el mercurio divalente reemplaza el átomo de hidrógeno para formar mercaptanos, $\text{X-Hg-SR}'$ y $\text{Hg}(\text{SR})_2$, donde X es un grupo electronegativo y R un aminoácido como la cisteína. Los mercuriales orgánicos forman mercaptanos del tipo $\text{RHg-SR}'$ (Olivero y Jhonson, 2002).

2.1.1.3. Fuentes de contaminación ambiental con mercurio. Existen dos tipos de fuentes de contaminación por mercurio: las fuentes naturales y las antropogénicas.

2.1.1.3.1. Fuentes naturales. La mayor fuente natural de mercurio es la desgasificación de la corteza terrestre, las emisiones de los volcanes y la

evaporación desde los cuerpos de agua (Grayand y Hines, 2006). Las liberaciones de mercurio principalmente son en forma inorgánica, bien elemental o iónica. La mayor parte de éstas son depositadas en la región de origen, mientras que las del mercurio elemental, y una variedad de otros compuestos, entran en el ambiente acuático a través de lixiviación natural y lavado del suelo, rocas y atmósfera por lluvias (Pahan *et al.*, 1990). La precipitación pluvial juega un papel importante en la circulación del mercurio en la naturaleza, es así como las concentraciones de mercurio en las aguas pluviales depende de los compuestos de mercurio que son encontrados en la atmósfera y de sus solubilidades (Ullrich *et al.*, 2001).

2.1.1.3.2. Fuentes antropogénicas. La cantidad total de mercurio liberada a la atmósfera debido a actividades antropogénicas ha sido estimada en 2.000-6.000 toneladas por año (Lamborg *et al.*, 2002). La contaminación ocasionada por el hombre es realizada de muchas formas: la descargas de desechos y la emisión directa a la atmósfera en la explotación minera del metal y del oro (Boudou *et al.*, 2005), la quema de los combustibles fósiles representa una fuente importante de contaminación atmosférica, así como la incineración de desechos sólidos, los cuales incluyen mercurio volatilizado de baterías desechadas y durante la fundición de cobre y zinc (Fitzgerald y Clarkson, 1991).

Otros usos no menos importantes del mercurio son su utilización como fungicida, herbicida y conservante de semillas en agricultura. Es empleado en la producción de papel, en la industria electroquímica, las industrias de pinturas, pilas, y de catalizadores, y en la combustión de carbones (Wendroff, 1990). También es empleado, para la producción de cloro-álcali (Pavlish, 2003) instrumentos de manufactura, de laboratorios químicos y en odontología (amalgamas) (Streets *et al.*, 2005; Goldman y Shannon, 2001).

2.1.1.4. Biogeoquímica del mercurio, transporte y distribución. La volatilidad es uno de los aspectos de mayor importancia en el ciclo biogeoquímico del mercurio. En la atmósfera está ampliamente distribuido en forma de gas y partículas. Entre el 90-95% de este elemento es gaseoso, incluyendo vapor de mercurio (Hg^0), compuestos inorgánicos (cloruros y óxidos) y alquilmercurio (principalmente CH_3HgCl).

Concentraciones típicas de mercurio gaseoso total en zonas no contaminadas son de $1.5\text{-}2.0\text{ ng/m}^{-3}$ en la baja troposfera. Algunos autores sugieren que el HgCl_2 , comúnmente conocido como “mercurio gaseoso reactivo” es la especie química que domina el flujo total de deposición atmosférica de este metal por su alta reactividad superficial y su solubilidad en agua (Sheu y Mason, 2001).

Casi todo el mercurio inorgánico disuelto en aguas oceánicas existe en forma disociada como ión $[\text{HgCl}_4]^{2-}$. En las fuentes de agua continentales, sin embargo, donde hay poco cloruro, el mercurio puede existir como $\text{Hg}(\text{OH})_2$.

La interconversión en medio acuoso entre todos los estados de oxidación del mercurio requiere la presencia de microorganismos. El mercurio es emitido a la atmósfera a partir de las fuentes naturales y antropogénicas en forma de vapor elemental (Hg^0), posteriormente es precipitado por las lluvias que lo depositan en los cuerpos de agua y finalmente en el sedimento desde donde es metilado y luego bioacumulado (Downs *et al.*, 1998). Las formas más solubles de mercurio (por ejemplo Hg^{2+}), son sintetizadas a través de la conversión de Hg^0 a Hg^{2+} , reacción de oxidación que ocurre en presencia de microorganismos aeróbicos en el que participa la catalasa, una enzima importante en el ciclo del oxígeno (Olivero y Jhonson, 2002).

Los microorganismos aeróbicos también pueden llevar a cabo la oxidación del mercurio a partir del HgS en el sedimento, oxidando el sulfuro a sulfito y luego a sulfato. El ión mercúrico (Hg^{2+}), sin embargo, puede ser reducido en un proceso de desintoxicación por microorganismos (por ejemplo *Pseudomonas sp.*) a Hg^0 en presencia de NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido reducido) que se oxida a NAD^+ (Nicotinamida Adenina Dinucleótido oxidado). El NAD^+ es una coenzima cuya función es actuar como agente en la transferencia de átomos de hidrógeno en las reacciones de oxidación – reducción (Olivero y Jhonson, 2002).

El Hg^0 generado en el mecanismo de desintoxicación puede vaporizarse desde el medio acuoso y reentrar en la atmósfera. Esta volatilización de Hg^0 es uno de los procesos claves en el ciclo biogeoquímico del mercurio. Algunas bacterias emplean otro mecanismo de desintoxicación que convierte el Hg^{2+} bien sea en metilmercurio CH_3Hg^+ , o en dimetilmercurio, $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$. El uso de estos métodos de desintoxicación por microorganismos para crear mercurio elemental y $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ asegura que el mercurio sea removido del medio ambiente y remitido luego a la atmósfera. Igualmente, la formación de CH_3Hg^+ por microorganismos puede ser considerado un paso de desintoxicación para los mismos, ya que el ión CH_3Hg^+ , podría ser inmovilizado en el sedimento o en el suelo por adsorción a las partículas de bentonita (barro) cargadas negativamente. Este proceso asegura la remoción del CH_3Hg^+ en forma efectiva como un tóxico del ambiente microbiano (Olivero y Jhonson, 2002).

2.1.1.5. Genotoxicidad del mercurio y sus derivados. Existe una gran cantidad de derivados mercuriales, siendo los más conocidos el mertiolate, cloruro de mercurio, bicloruro de mercurio, óxidos de mercurio y mercurocromo, todos de consideración tóxica tanto ambiental como

ocupacional (Kazantzis, 2002). Hasta la década del 70, el uso de sustancias antimicrobianas que contenían mercurio fueron empleadas de forma extensa en hospitales en países como el Reino Unido, Estados Unidos, Alemania, Japón, entre otros (Hobman *et al.*, 2001). Para entonces, conjuntamente a los reportes de casos por reacciones alérgicas cutáneas debido al uso de estas sustancias, se conocía que las bacterias adquirían la capacidad de resistencia al mercurio y antibióticos; incluso esta resistencia persistió tiempo después de ser descontinuada la aplicación de sustancias cuyo compuesto activo era el mercurio. En la actualidad la FDA prohíbe el uso del mercurio y 15 de sus compuestos, incluidos el mercurocromo y el timerosal; éste último ha sido utilizado como coadyuvante en la producción de vacunas, dando lugar a lesiones del cerebro y a enfermedades autoinmunes (Clarkson, 2002; Fortunato *et al.*, 2005; Zambrano 2004). Sin embargo, algunos de los compuestos mercuriales aún siguen presentes, como es el caso del mercurocromo (Ratan *et al.*, 2001); éste contiene 27% de mercurio y es utilizado en concentraciones de 2% en agua (INVIMA 2006; Zambrano, 2004) cuyo uso ha disminuido notablemente o desaparecido totalmente en los países desarrollados, pero que en los países subdesarrollados o en vías de desarrollo, todavía posee un gran valor, debido a su bajo costo, fácil disponibilidad y relativa eficacia. A continuación una breve descripción de este último.

2.1.1.5.1. Mercurocromo (Merbromina- $C_{20}H_8Br_2HgNa_{20}$). Mercurocromo (Figuras 1 y 2) es el nombre comercial de la merbromina y usualmente de tinturas de merbromina hechas con merbromina y alcohol o agua (usualmente merbromina al 2% en alcohol o agua); es una sal disódica órganomercúrica fluorescente. Sus cualidades antisépticas fueron descubiertas en el Hospital Johns Hopkins por el doctor Hugh H. Young en 1919. Este compuesto químico llegó a ser popular muy pronto entre los

padres y doctores como antiséptico de uso común para heridas menores. Los iones mercúricos del Mercurocromo inhiben las enzimas que contienen grupos sulfhídricos; estos iones pueden combinarse con los grupos aminoácidos y otros compuestos químicos biológicamente importantes, siendo esto el principal mecanismo para su actividad bacteriostática y bactericida (Kishore, 1999; Jawetz *et al.*, 1991; Satoh, 2000). Los Estados Unidos y la Administración para Alimentos y Fármacos (FDA) han retirado la etiqueta de "generalmente reconocido como seguro" deteniendo su distribución en los Estados Unidos en 1998, por los temores de posibles envenenamiento por mercurio. Sin embargo el mercurocromo es efectivo solamente cuando es usado sobre una superficie de la piel limpia ya que es inactivado en presencia de materias orgánicas (Jawetz *et al.*, 1991). Algunos usos no convencionales del mercurocromo incluyen el tratamiento de úlceras que no quieren sanar (Abramson, 1981) e infecciones provocadas por hongos en los oídos (Chander *et al.*, 1996). Sin embargo el uso del mercurocromo produce efectos secundarios; existen casos reportados de alergia y dermatitis por contacto (Galindo *et al.*, 1997; Ayala *et al.*, 2000); de infección iatrogénica producida por *Mycobacterium chelonae* (Foz *et al.*, 1978), anemia aplásica (Slee *et al.*, 1979), y aún envenenamiento por mercurio (Yeh *et al.*, 1978). Las últimas dos complicaciones están asociadas con el uso prolongado del mercurocromo.

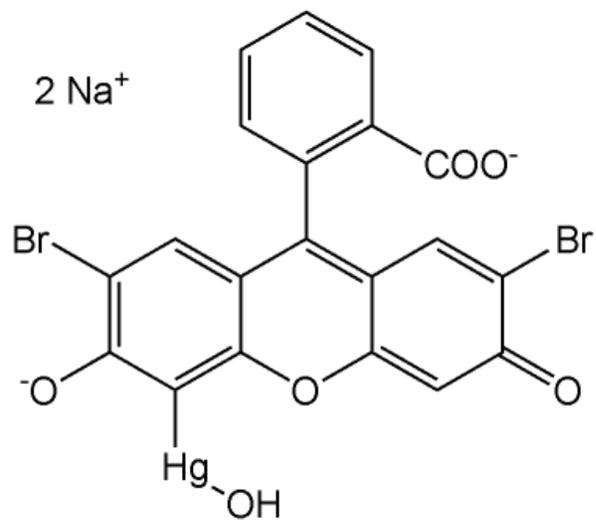


Figura 1. Fórmula estructural del mercurocromo.

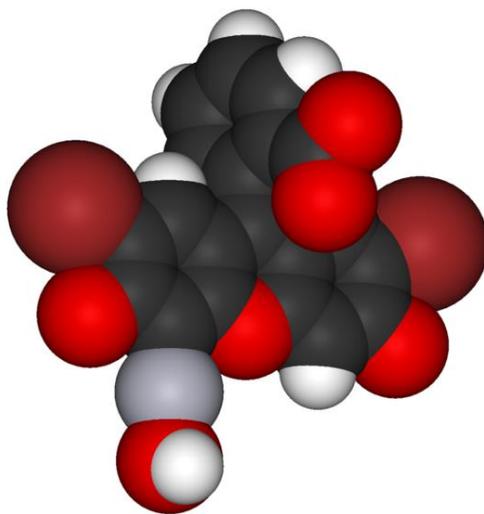


Figura 2. Representación de esfera para la estructura tridimensional del mercurocromo.

2.1.2. Cadmio

2.1.2.1. Generalidades del Cadmio

El Cadmio es un elemento no esencial, metal suave de color blanco-plateado encontrado naturalmente en niveles bajos en las rocas y suelo (Research Triangle Institute, 1999), considerado uno de los metales pesados productores a altas concentraciones, de alteraciones genotóxicas y mutagénicas (Waalkes, 2003); clasificado como cancerígeno en humanos por la agencia para la investigación de cáncer (IARC, 1993).

2.1.2.2. Fuentes de Contaminación

El cadmio es liberado al ambiente por sistemas de calentamiento, industrias que utilizan metales y tráfico urbano. Es empleado en procesos industriales como la elaboración de baterías de níquel-cadmio (IARC, 1993), electroenchapado, como componente en la metalurgia y aleaciones para soldadura, pigmentos, como estabilizador en la industria del plástico, combustible para la quema de materiales de desecho (a menudo depositados como desechos sólidos). Además, es reconocido como un contaminante importante debido a su alta toxicidad y gran solubilidad en agua (Pinto *et al.*, 2004). Otra fuente de exposición no menos importante es a través del consumo de alimentos como bebidas, granos y carnes, los cuales pueden llegar a contener más de 1 mg/kg. Varias organizaciones mundiales han determinado que la cantidad máxima diaria permisible es de 1 µg/kg/día.

2.1.2.2. Toxicidad del Cadmio

La exposición al cadmio puede resultar en una gran variedad de efectos adversos en humanos y animales. Dependiendo de la dosis, ruta y tiempo de exposición, el cadmio puede dañar varios órganos incluyendo los pulmones, hígado, riñones, huesos, testículos y placenta (Bernard y Lauwerys, 1984; Elinder y Kjellstrom, 1986; Fassett, 1975; Jarup *et al.*, 1998), además de las

actividades teratogénicas y carcinogénicas que posee (IARC, 1993; Pearson y Prozialeck, 2001). Con relación al sistema cardiovascular, la exposición al cadmio ha sido asociada con una amplia variedad de patologías, incluyendo hemorragias (Nolan y Shaikh, 1986) arteriosclerosis (Navas-Acien *et al.*, 2005), hipertensión (Varoni *et al.*, 2003) y cardiomiopatías (Jamall y Smith, 1985; Kopp, 1986).

Sin considerar la ruta de exposición, esencialmente todo el cadmio que alcance la circulación sistémica es enlazado a las proteínas y otros materiales en la sangre (Barbier *et al.*, 2005; Bridges y Zalups, 2005; Nordberg *et al.*, 1986; Zalups y Ahmad, 2003). El cadmio circulante puede estar ya sea, atado fuertemente a proteínas enlazadas de metales tales como la metalotioneína (Webb, 1986), o puede pobremente asociarse con otros materiales, tales como la albúmina, aminoácidos o compuestos sulfhídricos como glutatión o cisteína. Debido a la alta afinidad del cadmio por la metalotioneína, el cadmio que está enlazado (Cd–metalotioneína) no está disponible para la ingesta por la mayoría de los tejidos, aunque el complejo Cd–metalotioneína puede ser llevado a tejidos específicos tales como los epitelios de los túbulos proximales (Foulkes, 1978; Squibb *et al.*, 1984) donde él puede contribuir con los efectos nefrotóxicos del cadmio (Cherian *et al.*, 1976; Dorian *et al.*, 1992; Dudley *et al.*, 1985; Kotsonis y Klaassen, 1978). En contraste, la interacción del cadmio con la mayoría de otros materiales en la sangre es de una afinidad más baja (Fuhr y Rabenstein, 1973; Rabenstein, 1989; Trisak *et al.*, 1990).

Consecuentemente, el cadmio que está asociado con estos materiales puede disociarse y enlazarse a otras moléculas blanco sobre la superficie de las células y, en algunos casos, entrar a la misma (Barbier *et al.*, 2005; Bruggeman *et al.*, 1992; Foulkes, 2000; Foulkes y Blanck, 1990), aunque hay

evidencia también para la ingesta directa del conjugado Cd–tiol en algunos tejidos (Bridges y Zalups, 2005; Zalups y Ahmad, 2003).

El cadmio es peligroso en el ambiente ya que muchas plantas y animales pueden absorberlo y concentrarlo en sus tejidos; sus efectos deletéreos se evidencian en las plantas a través de enrollamiento de las hojas, clorosis, necrosis (Behboodi y Samadi, 2004), disminución del crecimiento vegetal, daño oxidativo, entre otros (Marcano *et al.*, 1999; Sanitá di Toppi y Gabbrielli, 1999; Benavides *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2002; ATSDR, 2003; Valverde *et al.*, 2001; Gichner *et al.*, 2004; Savenstrand y Strid, 2004).

El cadmio conduce a una producción reducida de nuevas células debido a la actividad mitótica en los meristemos apicales (Zhang y Yang, 1994; Zhang y Xiao, 1998; Liu *et al.*, 2003), y a partir de la inhibición de la elongación de las células en las regiones de extensión (Voutsinas *et al.*, 1997). Junto con la disminución de la actividad mitótica en los meristemos apicales, las aberraciones mitóticas aparecen, consistiendo en C-mitosis, puentes anafásicos, stickness y micronúcleos (Zhang y Yang, 1994; Fiskesjö, 1997; Panda y Panda, 2002), apoptosis y necrosis (Behboodi y Samadi, 2004). La mayoría de los daños cromosomales están relacionados con la clastogénesis y en evaluación puede ser empleada en pruebas de corto tiempo para genotoxicidad. Los ensayos basados en la genotoxicidad sobre plantas han demostrado una correlación positiva con aquellos basados sobre animales. Ellos son altamente sensibles, de fácil manejo y costo, de allí, que son de particular relevancia en los países desarrollados. Los efectos del cadmio sobre la actividad meristemática cambian en relación con las especies y el genotipo. Un número de genotipos de plantas pea ha sido utilizado como sistema experimental para investigar los aspectos fisiológicos, metabólicos y moleculares de la administración del cadmio (Metwally *et al.*, 2005). Sin

embargo, aunque las características cariológicas de pea (número bajo de cromosomas, $2n= 14$) hace fácil las observaciones de daño cromosómico, muy pocos datos existen acerca del impacto del cadmio sobre la actividad meristemática de los ápices de las raíces, y su evaluación es una indicación útil de la sensibilidad/ tolerancia del metal en consideración (Von Rosen, 1954; Das *et al.*, 1997).

2.2. ASPECTOS GENERALES SOBRE GENOTOXICIDAD

La toxicología genética identifica y analiza la acción de aquellos agentes que, a niveles subtóxicos de exposición, producen algún tipo de alteración en el material genético o en sus componentes asociados; ésta cumple dos funciones, por una parte, la implementación de métodos para evaluar el riesgo de los agentes genotóxicos presentes en el ambiente, cuya interacción con el material genético puede alterar la integridad del genoma humano y, por otra, la aplicación de estas metodologías para la detección y el conocimiento de los mecanismos de actuación de los carcinógenos. La acción de los agentes genotóxicos puede dar lugar a la inducción de cambios en la secuencia de ADN provocando la aparición de mutaciones puntuales y a gran escala de aberraciones cromosómicas visibles (Caballero y Patiño, 2007).

Investigaciones previas han sugerido que el estudio de las alteraciones en el Índice Mitótico (IM), bloqueo del crecimiento e inducción de aberraciones cromosómicas (AC), son marcadores biológicos para el estudio potencial de sustancias mutagénicas y carcinogénicas presentes en el ambiente como contaminantes (Caballero y Patiño, 2007).

2.2.1. Porcentaje de Índice Mitótico (IM). Es una medida para el estado de la proliferación de una población de células. Es definido como el cociente

entre el número de núcleos en mitosis y el número total de núcleos (Molero, *et al.*, 2006).

$\% \text{ IM} = \text{N}^{\circ} \text{ de núcleos en mitosis} / \text{Total de núcleos observados} \times 100.$

2.2.2. Aberraciones Cromosómicas (AC). Son alteraciones en la estructura de los cromosomas resultantes de un cambio o interrupción del material cromosómico. La mayor parte de ellas son letales para las células, y otras pueden causar efectos genéticos, somáticos o hereditarios (Swierenga *et al.*, 1991); existen dos tipos de aberraciones las de tipo numérico y las de tipo estructural (Lloyd *et al.*, 1975). Las primeras implican variaciones en el número de cromosomas, a nivel global de la dotación genómica (euploidía) o en determinados cromosomas dentro de la dotación (aneuploidía) estos cambios cromosómicos numéricos pueden ser producidos al no haber división en la mitosis. Si uno de ellos no es conectado apropiadamente al eje mitótico, una célula hija puede terminar con un cromosoma adicional y la otra con uno menos.

El origen de cambios cromosómicos estructurales es probablemente más complicado. Algunos pueden resultar por interrupciones de la doble cadena en el envolvimiento de los cromosomas implicados, lo que puede llevar a supresiones o recombinaciones; originando multitud de cambios en la estructura de estos, por pérdida, ganancia o reordenación de secciones particulares de los mismos, permaneciendo por lo general constante el número de cromosomas, lo que revela un alto grado de falsas recombinaciones en células tumorales; algunos cambios son evidentes y otros puede que no sean perceptibles a nivel citogénico (Schulz, 2005).

Un incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas (AC) está relacionado con la exposición a agentes genotóxicos, conociéndose que

existe una asociación entre la frecuencia de AC y el riesgo de desarrollar cáncer. Informaciones sobre la incidencia de cáncer en individuos con alta frecuencia de AC, permite que el análisis de estas pueda ser utilizado para estimar el riesgo de cáncer y enfermedades genéticas (Paz, 2000).

Las aberraciones cromosómicas estructurales más observadas son:

- **Puentes.** Unión de los dos polos del huso por medio de uno o mas cromosomas (Figura 3) (Venegas *et al.*, 2002).
- **Letargos.** Son cromosomas rezagados que pueden ser incluidos en el núcleo de las células hijas (Figura 4) (Venegas *et al.*, 2002).
- **Anafase de células multipolares.** Células que presentan más de dos polos del huso, debido a la mala segregación de los cromosomas homólogos durante la metafase (Figura 5) (Adams, 2002).



Figura 3. Microfotografías de puentes cromosómicos en núcleos de *Allium cepa*.

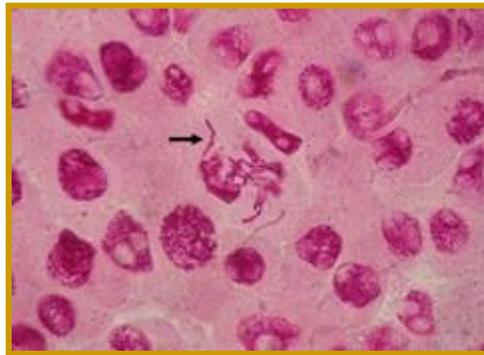


Figura 4. Microfotografía de letargo en núcleos de *Allium cepa*.

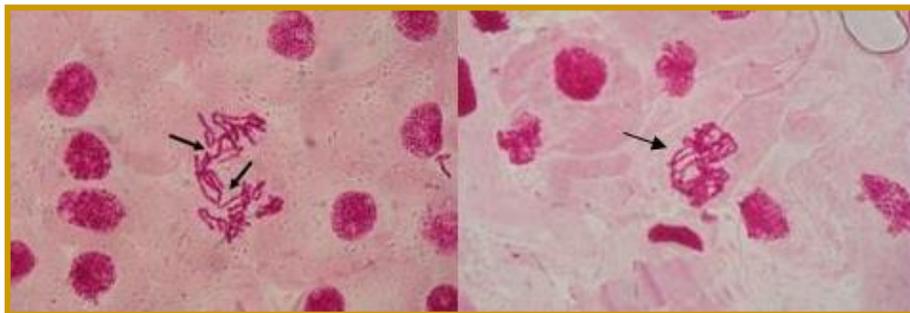


Figura 5. Microfotografía de células multipolares en núcleos de *Allium cepa*.

- **Cromosomas Aislados.** Generados por rupturas cromosómicas o por mala segregación de cromosomas enteros durante la división celular, quedando en ambos casos, una cantidad de DNA fuera de los núcleos hijos (Figura 6) (Venegas *et al.*, 2002).
- **Fragmentos.** Rupturas de cromosomas que no son incorporados en el núcleo hijo en la mitosis porque carecen de centrómero (Figura 7) (Venegas *et al.*, 2002).
- **Micronúcleo.** Núcleo adicional y separado del núcleo principal de una célula, producido durante la telofase de la mitosis o la meiosis a partir de cromosomas retrasados o de fragmentos cromosómicos derivados de cambios estructurales espontáneos o inducidos experimentalmente (Figura 8) (Laffon *et al.*, 2004).

Para evaluar las alteraciones en el Índice Mitótico (IM), bloqueo del crecimiento e inducción de aberraciones cromosómicas (AC), diversas investigaciones proponen a las plantas superiores como organismos para realizar pruebas de detección de sustancias tóxicas en el ambiente; una de ellas es el bioensayo con raíces de *Allium cepa* con la cual dichos ensayos muestran una buena correlación con pruebas realizadas en mamíferos, además de ser de fácil manejo y bajo costo (Mastrangelo, 2006; Andrioli *et al.*, 2006).

Con objeto de evaluar la genotoxicidad de todos los agentes mutagénicos relevantes, actualmente es recurrente la realización de un conjunto de

ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*, debido a que una sola prueba no detecta todos los posibles agentes mutagénicos.

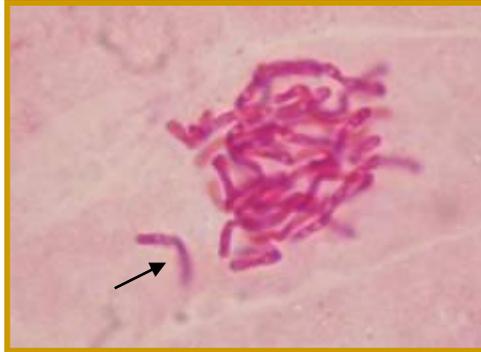


Figura 6. Microfotografía de cromosoma aislado.en núcleos de *Allium cepa*.



Figura 7. Microfotografía de fragmento en núcleo de *Allium cepa*.

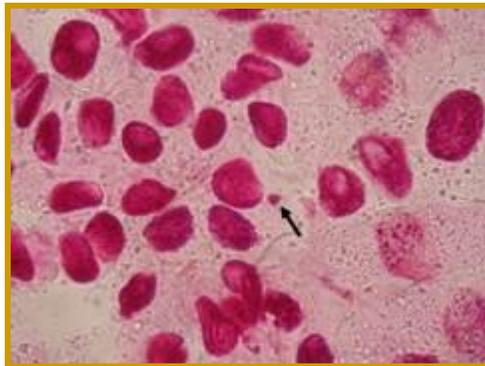


Figura 8. Microfotografía de micronúcleo en núcleo de *Allium cepa*.

2.3. *Allium cepa* como modelo biológico de toxicidad

Actualmente es común la utilización de plantas superiores, por ser organismos eucarióticos, y por lo tanto más comparables a la mayoría de las especies de la flora y la fauna superiores, para monitorear la contaminación química (Rodríguez, 2003; Fiskesjö G, 1985). Por ello han sido adaptados bioensayos rápidos, empleando plantas como organismos de prueba, debido a la respuesta que presentan ante cualquier sustancia química (Dovgaliuk *et al.*, 2001) o mezcla compleja de tóxicos presentes (De Lima y Jordao, 2001; Fang *et al.*, 2001; Grover y Kaur, 1999).

En este sentido, el ensayo de *Allium cepa* (cebolla) permite la cuantificación del impacto ecotoxicológico que puede tener un efluente sobre el ecosistema seleccionado, pues es conocida la capacidad de este sistema de ensayo para relacionar propiedades físico-químicas, concentración, tiempo de exposición, factores biológicos y nutricionales con la fitotóxicidad y la genotóxicidad de un contaminante químico (Landis y Yu, 1999; Moriarty, 1999). Sumado a lo anterior se encuentra su anatomía radicular, sus grandes cromosomas fácilmente observables, su relativo bajo costo y la posible extrapolación de sus resultados a los seres humanos.

2.3.1. Generalidades sobre *Allium cepa*. En las plantas superiores los meristemas proliferan siguiendo una cinética en equilibrio dinámico, lo que puede evaluarse a través de una serie de indicadores tales como: la velocidad de crecimiento, población de células en división celular, duración del ciclo celular, índice mitótico y frecuencia de células en los diferentes estados morfológicos, entre otros (Cano *et al.*, 2002).

Los meristemas de *Liliáceas*, como la cebolla (Figura 9), son frecuentemente utilizados para estudios de la dinámica celular porque constituyen un sistema

in vitro ideal, así como para estudiar los mecanismos regulatorios que afecten el ciclo celular. Actualmente es conocido como prueba de *Allium* (*Allium* test) y es utilizada para determinar los efectos de diferentes xenobióticos o principios activos obtenidos de plantas y animales (Cano *et al.*, 2002).



Figura 9. Fotografía de la planta de *Allium cepa*.

La cebolla (*A. cepa*) es una hortaliza distinguida por la particularidad de su aroma y de su sabor; la intensidad de estos atributos está determinada por la concentración de ciertas sustancias almacenadas en sus tejidos, tales como compuestos órgano-sulfurados, azúcares simples y complejos, fenoles (Rank y Hviid, 1993).

En 1939, Mensinkai hace una singular descripción de los cromosomas de la cebolla. Encuentra que ésta tiene ocho pares de cromosomas ($2n = 16$) de gran tamaño y con una morfología bien definida; describe sus cromátidas y posición de su centrómero, con un número relativamente reducido de

cromosomas, permitiendo una adecuada observación en el microscopio. Los bulbos de la cebolla sumergidos en agua sólo requieren de 48 a 72 horas para brotar raíces con suficientes células que permitan visualizar todas las etapas de la división celular. Por ello, es posible realizar prácticas de laboratorio donde son observados los cromosomas y sus daños (Fernández *et al.*, 2005).

En virtud de las características señaladas, las cebollas pueden ser expuestas a una sustancia química que se desea analizar y posteriormente observarse sus cromosomas para comparar si el patrón cromosómico de esta especie fue modificado. La importancia de estos estudios es tal, que existe un protocolo de *Allium cepa* para algunas aberraciones cromosómicas: rompimientos del cromosoma o de sus cromátidas, micronúcleos, formación de puentes y cromosomas con centrómero inactivado entre otras (Fernández *et al.*, 2005).

2.3.2. Ensayos realizados con *Allium cepa*. La detección de genotoxicidad en químicos peligrosos ha sido estudiada por muchos años a través del uso de plantas. Los ensayos de mutagenicidad son realizados empleando uno de los métodos más antiguos, específicamente la observación de aberraciones cromosómicas. En los años treinta fue observado que la colchicina podía causar disturbios en el huso acromático y poliploidía en las células meristemáticas radicales de las raíces de *Allium cepa*; además, fue demostrado que varias soluciones de sales inorgánicas inducían diferentes tipos de aberraciones cromosómicas en las raíces de la cebolla. Desde entonces muchos ensayos de mutagenicidad han sido desarrollados usando microorganismos, células de mamíferos y otros sistemas biológicos, siendo los ensayos con plantas empleados rutinariamente para genotoxicidad en muchos laboratorios (Rank *et al.*, 2002).

Muchos mutágenos y carcinógenos conocidos actúan a través de mecanismos oxidativos que dañan al ADN; consecuentemente, existen reportes de antioxidantes naturales capaces de minimizar los efectos de los compuestos genotóxicos (Cápiro *et al.*, 2001): vitaminas, minerales, fenoles y aceites esenciales, han demostrado efectos inhibitorios sobre la genotoxicidad, tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro*, es por ello, que en la actualidad las investigaciones están encaminadas a la búsqueda de nuevos compuestos con actividades biológicas a partir de fuentes naturales (Mimica *et al.*, 2003). Dentro de ellos un considerable número de estudios han sido orientados hacia la evaluación de actividades antimicrobianas de extractos y aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas (Tafurt *et al.*, 2005; García *et al.*, 2001; Nascimento *et al.*, 2000).

2.4. ASPECTOS GENERALES SOBRE ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales (AE) son mezclas naturales complejas (20-60 compuestos en diferentes concentraciones), líquidos y aromáticos a temperatura ambiente, de naturaleza oleosa y volátil, insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos (Bakkali *et al.*, 2008; Marcano y Hasegawa, 2002), obtenidos a partir de plantas y especias, las cuales en su mayoría contienen compuestos de estructuras terpénicas y fenilpropánicas, almacenadas en los tejidos secretores de vegetales aromáticos. Se caracterizan además porque solamente dos o tres compuestos están presentes en altas concentraciones (20-70%) comparado con los otros constituyentes que pueden encontrarse en proporciones muy bajas e inclusive a nivel de trazas (Bakkali *et al.*, 2008). Generalmente son esos componentes mayoritarios los que determinan las propiedades biológicas de los aceites esenciales. Los constituyentes de los aceites esenciales incluyen dos grupos de compuestos de diferentes origen biosintético (Dewick, 1997). El grupo principal está compuesto por terpenoides y el otro por

constituyentes aromáticos (alcoholes, fenoles y aldehídos) y alifáticos, todos caracterizados por su bajo peso molecular (Bakkali *et al.*, 2008). Estos aceites son conocidos y utilizados desde la antigüedad en un gran número de aplicaciones: ambientadores, cosméticos y medicinas; obtenidos de materiales vegetales tales como flores, semillas, hojas, corteza, tallo, frutos y raíces (Prabuseenivasan *et al.*, 2006). Una especie aromática puede contener más de 150 componentes como parte de su aceite esencial. Ruberto y Baratta (2000), demostraron la actividad antioxidante de aproximadamente 100 compuestos puros provenientes de aceites esenciales, con una diferencia significativa de timol, carvacrol y eugenol. Así mismo, Choi *et al.* (2000), evidenciaron la actividad antioxidante de más de 20 compuestos puros, entre las que destaca el geraniol, terpinoleno y γ -terpineno.

Estudios realizados con aceites esenciales han reportado que poseen una amplia actividad microbiológica como: antiprotozoario (Said *et al.*, 2005), antifúngica, antibacteriana, antimalárica (Marcano y Hasegawa, 2002), acaricida (Perrucci *et al.*, 1995), insecticida (Tripathi *et al.*, 2002), y antiviral (Schnitzler *et al.*, 2001). También presentan propiedades farmacológicas como: anti-inflamatorios (Grassmann *et al.*, 2000) anticonvulsivos (Sayyah *et al.*, 2002) y antioxidantes (Cápiro *et al.*, 2001). La principal aplicación farmacológica de los aceites esenciales en los últimos años, ha sido en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer (Lantry *et al.*, 2000). Los estudios realizados han demostrado que pueden ser eficaces en la quimio prevención de leucemia (Clark *et al.*, 2002), melanoma (Lluria *et al.*, 2002), cáncer de colón (Carnesecchi *et al.*, 2001), cáncer de seno (Shi, W., y Gould, M. 2002), cáncer de ovario (Bailey *et al.*, 2002), y otros procesos mutagénicos y/o carcinogénicos provocados por diversos agentes genotóxicos entre los que destacan los metales pesados como el cadmio

(Benavides *et al.*, 2005). Otros efectos biológicos estudiados para los aceites comprenden citotoxicidad, fototoxicidad, mutagenicidad nuclear, mutagenicidad citoplásmica, carcinogenicidad y anti-mutagenicidad (Bakkali *et al.*, 2008)

2.4.1. Generalidades sobre el aceite esencial de *Lippia alba*.

Lippia alba (Verbenaceae) es una especie aromática que se caracteriza por su intenso y penetrante olor a limón, lima o menta, contiene de 0.1 a 1.2% del aceite volátil, alcanza alturas de hasta 2 m de alto, con hojas de 2 a 7 cm de largo y presenta flores en espigas de color lila, púrpura o blanco de uso generalizado, en Centro y Sur América (Figura 10) (Pascal *et al.*, 2001; Manenzhe *et al.*, 2004) India (Singh *et al.*, 2000) y Australia (Day y McAndrew, 2003). Los nombres locales y tradicionales son numerosos en América, de acuerdo a su uso tradicional, y en general derivan de su olor aromático o propiedades medicinales. La planta es conocida también como *Lippia geniculata* HBK o *Lantana alba* Mill y, en Colombia, por sus nombres populares “Pronto alivio” (Antioquia), “Curatodo” y Orégano de cerro” (Magdalena). El nombre más común en Brazil es *cidreira*, pero este también puede ser usado para otras 17 plantas aromáticas de limón con usos similares (Matos *et al.*, 1996). En países de habla hispana y estados de Francia, es frecuentemente nombrada de otras especies aromáticas, e.g: *salvia morada* (Senatore y Rigano, 20001), *orégano de cerro* (Stashenko *et al.*, 2003), *anís de España* (Pino *et al.*, 1997), *mirto* (Alanís *et al.*, 2005), *verveine blanche*, *sauge du Brasil* (Sastre y Breuil, 2007).

La composición química del aceite esencial de *L. alba* depende sensiblemente del origen geográfico de la planta, las condiciones de su cultivo, la edad y la parte de la planta empleada para la extracción, y de

algunos otros factores geobotánicos; en las hojas son detectados esteroides, taninos, flavonoides, saponinas, aminoácidos y sustancias amargas, presenta alta concentración de monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos oxigenados (Hennebelle *et al.*, 2008). Estudios realizados en *Lippia alba* colombiana mostraron que contiene como componente mayoritario la carvona (40-57%), seguido del limoneno (24-37%), el biciclosesquifelandreno (2-22%), la piperitenona (1-2%), la piperitona (0.8-1.2%) y el β -burboneno (0.6-1.5%). (Stashenko *et al.*, 2004). También es utilizada en la búsqueda de nuevos productos y combinaciones de sustancias químicas de origen natural, con potencial aplicación en diferentes industrias, tales como la alimentaria, farmacéutica, textil, química orgánica, cosmética y de perfumes (Stashenko *et al.*, 2003).

Para la carvona, uno de los componentes principales de *Lippia alba* fue reportado un efecto mutagénico débil en el *Test de Ames*, el cual es un ensayo biológico para evaluar el potencial mutagénico de compuestos químicos, utilizando cepas de la bacteria *Salmonella typhimurium* que llevan mutaciones en genes implicados en la síntesis de histidina (Stammati *et al.*, 1999)



Figura 10. Fotografía de la Planta de *Lippia alba* (Mill).

3. METODOLOGÍA

La metodología desarrollada en este trabajo fue fundamentada en la evaluación de xenobióticos o principios activos, empleando plantas superiores (*Allium cepa*) como sistema biológico, en los cuales la observación de aberraciones cromosómicas constituye el principal método de análisis (Fiskesjô, 1985). La evaluación del efecto protector del aceite esencial de *Lippia alba*, ante la toxicidad del mercurocromo en meristemos de *Allium cepa*, fue llevada a cabo a través del desarrollo de las siguientes etapas.

- Condiciones del bioensayo.
- Determinación de la concentración tóxica y efecto genotóxico de mercurocromo en meristemos de *Allium cepa*.
- Evaluación del efecto protector del aceite de *Lippia alba* ante la toxicidad del mercurocromo.

Cada bioensayo se hizo por triplicado por réplica, para un total de dos réplicas, a excepción del bioensayo para la evaluación del efecto tóxico del mercurocromo sobre el peso de las raíces a las diferentes concentraciones ensayadas; para este caso se realizaron tres réplicas con el fin de eliminar las inconsistencias presentadas entre el primer y segundo ensayo realizados.

3.1. CONDICIONES DEL BIOENSAYO

Diferentes variables fueron consideradas para la adecuación de las condiciones de trabajo reportadas en la literatura (Turkoglu, 2008; Yi *et al.*, 2007; Mastrangelo *et al.*, 2006; Andrioli *et al.*, 2006; Evseeva *et al.*, 2003; Durán y Espitia, 2009), entre las cuales tenemos: proveedor, tipo de cebolla,

tipo de agua, limpieza de la zona radicular, temperatura, fuente de luz, período de estimulación, cambio de unidad experimental, remoción total o parcial de las soluciones de experimentación. A continuación se describen cada una de las variables antes mencionadas:

3.1.1. Proveedor - Tipo de Cebolla. Cebollas blancas y moradas con aproximadamente 2.5 cm de diámetro, secas y sin formación de hojas y/o raíz, fueron adquiridas en diferentes almacenes de cadena de la ciudad de Cartagena: Éxito (Matuna, San Diego, Castellana, Ejecutivos y Cartagena), Olímpica (Matuna, Badillo, Bocagrande, Ejecutivos y SAO); para cada tipo de cebolla fueron tomadas seis unidades por almacén.

3.1.2. Limpieza de la Zona Radicular. Adquiridos los diferentes tipos de cebolla, éstas fueron trasladadas al Laboratorio de Química Ambiental y Computacional de la Universidad de Cartagena, donde se sumergieron en agua de grifo por espacio de 10 minutos, con el objetivo de facilitar la remoción de las catafilas exteriores; posteriormente fue retirado el exceso de agua con toallas absorbentes y con un bisturí de acero inoxidable de hoja número 22; conjuntamente fue retirado el disco inferior correspondiente a la zona radicular teniendo la precaución de no realizar cortes profundos que destruyeran los primordios alterando así el crecimiento de la raíces.

3.1.3. Tipo de Agua. Con el objetivo de establecer la calidad del agua a emplear en el presente estudio, fueron evaluados cuatro tipos de aguas: Agua destilada, agua de grifo y aguas embotelladas (Brisa y Cristal). Para cada tipo de agua se emplearon cebollas blancas y moradas, las cuales fueron adecuadas y mantenidas bajo las mismas condiciones ya descritas. Finalizado el paso anterior, las cebollas se colocaron en vasos plásticos transparentes de 70 mL, con el tipo de agua correspondiente, realizando

recambio total de las mismas (tipo de agua) cada 24 horas hasta completar el período de estimulación. Para el ensayo citológico fueron evaluados los tiempos de 24, 48 y 72 horas respectivamente con el objetivo de establecer el índice mitótico (IM) e índices de aberraciones (IA).

3.1.4. Fuente de Luz - Período de Estimulación - Temperatura. Para la definición de estas variables fueron adquiridas cebollas blancas y moradas en el almacén de cadena establecido en las etapas anteriores, realizando el proceso de adecuación respectivo. Las cebollas se dividieron en grupos de la siguiente forma: cebollas expuestas a luz directa (lámpara fluorescente blanca), con una temperatura ambiente entre 24 -25 ° C, para las cuales cada 24 horas les fue medido el IM, hasta completar 72 horas; este período denominado de estimulación, es el tiempo durante el cual las raíces alcanzan un crecimiento de 1.5 -2.5 cm y es el indicado para la exposición al agente tóxico a evaluar; el proceso anterior fue realizado también para el grupo de cebollas colocadas en ausencia de luz (locker).

3.1.5. Cambio de la Unidad Experimental. Los grupos de cebolla para esta fase fueron organizados de la siguiente forma: un primer grupo conformado por cebollas que no se reemplazaron en ningún tiempo del ensayo (igual unidad experimental) y un segundo grupo compuesto por cebollas, analizadas en intervalos de tiempo de 24 horas hasta cumplir 72 horas y descartadas inmediatamente después de ser analizadas (diferente unidad experimental).

3.1.6. Recambio Total o Parcial de las Soluciones de Experimentación. Cebollas moradas y blancas fueron divididas en grupos para ser tratadas por un lado con recambio total de agua y/o soluciones de trabajo y por el otro con

reposición de volumen perdido, donde cada recambio ó reposición fue realizado cada 24 horas hasta completar 72 horas (período de estimulación).

3.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN TÒXICA Y EFECTO GENOTÓXICO DEL MERCUROCROMO EN MERISTEMOS DE *Allium cepa*.

Estandarizadas las condiciones de trabajo se procedió de la siguiente forma:

3.2.1. Cultivo Celular

Cebollas blancas (*Allium cepa*) de 2.5 cm de diámetro, secas y sin formación de hojas y/o raíz, fueron adquiridas en los almacenes Exito, ubicados en la ciudad de Cartagena y trasladadas al Laboratorio de Química Ambiental y Computacional de la Universidad de Cartagena para ser sometidas a los procesos de limpieza y adecuación correspondientes. Los bulbos de cebolla blanca fueron colocados en vasos plásticos transparentes de 70 mL con agua potable embotellada, iluminación directa (lámpara fluorescente blanca) y temperatura entre 24-25 °C (Figura 11), realizando cambio total del agua cada 24 horas hasta culminar el período de estimulación de 72 horas, alcanzando así, meristemos radicales con longitudes entre 1.5 - 2.5 mm.



Figura 11. Período de estimulación para el crecimiento de las raíces de *Allium cepa*.

3.2.2. Prueba Toxicológica

Finalizado el período de estimulación y obtenidas las longitudes de las raíces deseadas en las cebollas, fueron constituidos los grupos de trabajo, realizando cada ensayo por triplicado, período de experimentación de 72 horas y renovación total durante dicho período de las soluciones a evaluar, empleando vasos plásticos transparentes de 70 mL; lo anterior fue establecido de la siguiente manera (Figura 12): control negativo (agua embotellada), control positivo (cadmio 22.5 μM) y concentraciones del agente tóxico mercurocromo 0.01, 0.1, 1, 10, 50, 100, 250 y 500 μM , las cuales fueron preparadas a partir de una solución patrón de 500 μM de mercurocromo. El tóxico empleado (mercury dibromofluorescein disodium salt), fue obtenido de Sigma Aldrich.



Figura 12. Grupos de trabajo de bulbos de cebolla para evaluación de la concentración tóxica y el efecto genotóxico del mercurocromo en meristemos de *Allium cepa*.

3.2.3. Prueba Citológica: Fijación - Coloración – Montaje – Medición.

Para la preparación citológica fueron empleados ápices radiculares cortados 2 mm antes de la cofia (tres por unidad experimental) de cebolla blanca, tomados en cada intervalo de tiempo correspondiente (24 a 72 horas); dichos ápices fueron sometidos a proceso de hidrólisis con ácido clorhídrico 1N, en cajas de Petri por espacio de 10 minutos, con el objeto de lograr un debilitamiento de la lámina media, ruptura de la pared celular y separación de las células. Finalizado el paso anterior, los ápices fueron retirados del ácido con una espátula de acero inoxidable y colocados en láminas porta objetos de vidrio donde les fue agregado a cada uno, con una pipeta Pasteur, una gota de fucsina básica (colorante derivado del clorhidrato de rosanilida de amplio uso en cortes histológicos) por espacio de 10 minutos; transcurrido esto, fue retirado de los bordes el exceso de colorante con toallas absorbentes teniendo la precaución de no tocar los ápices y adicionado un cubre objeto para realizar el aplastamiento mecánico llamado también squash, quedando así listas las preparaciones citológicas para ser

observadas (Figura 13). Fueron analizadas aproximadamente 3000 células por grupo de tratamiento, determinando a su vez las fases mitóticas: profase, metafase, anafase y telofase (Figura 14) y las aberraciones fueron clasificadas como fragmentos o puentes cromosómicos, los cuales son característicos de eventos clastogénicos causados por el rompimiento de los cromosomas, anomalías cromosómicas de las células en división (Mastrangelo *et al*, 2006). Las observaciones microscópicas fueron realizadas utilizando un microscopio Olympus BX41TF y objetivo de 100X. El conteo de mitosis y aberraciones fue realizado mediante la siguiente formula:
 $\% \text{ IM} = (\text{Número de células en mitosis} / \text{Número total de células}) \times 100$; $\% \text{ IA} = (\text{Número de células aberradas} / \text{Número total de células})$



Figura 13. Preparación citológica para la observación de células meristemáticas de *Allium cepa*.



Figura 14. Fases Mitóticas: **1. PROFASE:** La cromatina comienza a condensarse. A medida que avanza este estadio desaparece el nucleolo. Los “cromosomas” aparecen como filamentos delgados. **2. METAFASE:** Cada cromosoma, integrado por dos cromátidas hermanas, se dispone con su centrómero en el plano ecuatorial. **3. ANAFASE:** Las cromátidas hermanas se separan y comienzan a migrar hacia los polos opuestos de la célula. Ahora los cromosomas se observan formados por una sola cromátida, con los centrómeros dispuestos hacia los polos y los telómeros hacia el centro de la célula. **4. TELOFASE:** No es posible individualizar los cromosomas. La cromatina comienza a descondensarse en ambos núcleos hijos

3.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DEL ACEITE DE *Lippia alba*.

El aceite esencial de *Lippia alba* utilizado en este estudio fue suministrado por el Centro de Excelencia CENIVAM (Universidad Industrial de Santander), mediante la técnica de hidrodestilación.

3.3.1. Cultivo Celular

En esta etapa se procedió de forma similar para el cultivo celular en la determinación de la concentración tóxica y efecto genotóxico del mercurocromo (Ver 4.2.1.).

3.3.2. Prueba Toxicológica

Transcurrido el período de estimulación y obtenidas las longitudes deseadas en las cebollas fueron constituidos los grupos de trabajo, realizando cada ensayo por triplicado, período de experimentación de 72 horas y renovación total durante dicho período de las soluciones a evaluar empleando vasos plásticos transparentes de 70 mL; lo anterior se estableció de la siguiente forma (Figura 15): control negativo (DMSO), control positivo (Cd 22.5 μ M), soluciones de mercurocromo (10 y 500 μ M) y las mezclas de mercurocromo (10 y 500 μ M) más el aceite de *Lippia alba* (100 μ M) en dimetilsulfóxido (DMSO). Las diluciones para cada concentración del aceite de *Lippia alba* fueron preparadas en tubos eppendorf y agitadas en un Vortex Maxi Mix Plus TM, al momento de cada montaje, evitando así la degradación del mismo y una mayor homogeneidad de la mezcla.



Figura 15. Grupos de trabajo de bulbos de cebolla para evaluación del efecto protector del aceite de *Lippia alba* contra la toxicidad del mercurocromo.

3.3.3. Tratamiento Citológico: Fijación - Coloración – Montaje – Medición.

En esta etapa se procedió de manera similar para la determinación de la concentración tóxica y efecto genotóxico del mercurocromo en meristemos de *Allium cepa* (Ver 4.2.3.).

3.4. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos de los bioensayos son presentados como las medias \pm error estándar de la media (SEM) para un mínimo de 3 experimentos realizados por triplicado. Las medias para los marcadores evaluados en las diferentes concentraciones utilizadas fueron comparadas empleando ANOVA, previa revisión de la normalidad y de varianza empleando Kolmogorov-Smirnov y Barlett, respectivamente. El índice mitótico (IM) fue obtenido del cociente del número de células en mitosis sobre 1000 células observadas. Un análisis de correlación entre diferentes concentraciones y tiempos de exposición al aceite esencial, sobre la longitud de la raíz, el peso de la raíz, índice mitótico y aberraciones cromosómicas fue realizado. Para todos los casos el nivel de significancia a utilizar fue $p < 0.001$.

4. RESULTADOS

La caracterización y medición de tóxicos o sus componentes no es suficiente para asegurar la ausencia de efectos indeseables, puesto que tanto la mezcla de los residuos como posibles transformaciones en el ambiente pueden modificar su efecto. De ahí que el uso de ensayos biológicos está siendo considerado cada vez con mayor intensidad para la evaluación de la toxicidad global de contaminantes; tal es el caso del *Test* de *Allium cepa* el cual ha sido validado en muchos estudios, demostrando ser uno de las pruebas más eficientes para la monitorización de genotoxicidad de contaminantes ambientales. A continuación se presentan las consideraciones tenidas en cuenta en la realización del bioensayo con *Allium cepa*.

4.1. Condiciones del bioensayo

Para la realización del bioensayo con *Allium cepa* fue necesario la evaluación de una serie de parámetros para obtener las condiciones óptimas en el desarrollo de los meristemos apicales; estos parámetros fueron: Proveedor, tipo de cebolla, tipo de agua, limpieza de la zona radicular, temperatura, fuente de luz, período de estimulación, cambio de unidad experimental, remoción total o parcial de las soluciones de experimentación y selección del control positivo y su respectiva concentración.

Las cebollas blancas provenientes del almacén Éxito en condiciones de luz blanca (Tabla 1) y en ausencia de la misma (Tabla 2) presentaron mejores características de crecimiento (Longitud radicular y porcentajes de índice mitótico) que las cebollas moradas y blancas provenientes del proveedor Olímpica.

Al comparar los resultados de la Tabla 1 con aquellos mostrados en la Tabla 2, se observa que el crecimiento de las cebollas blancas en condiciones de luz es más adecuado que cuando el ensayo fue realizado en el locker en ausencia de luz (Tabla 2). Por lo anterior, para los siguientes experimentos durante el desarrollo de este estudio se procedió a trabajar con cebollas blancas provenientes del Éxito en condiciones de luz blanca y a temperatura de laboratorio, aproximadamente entre 24-25 ° C.

En el ensayo realizado con el objetivo de establecer la calidad del agua a emplear en el presente estudio, utilizando cebollas blancas bajo las condiciones establecidas previamente, se obtuvieron los resultados que son presentados en la Tabla 3. Aquí se puede observar que el agua Brisa presentó un menor índice de aberraciones y un mayor índice mitótico que las otras tres aguas ensayadas. Cabe destacar que en el ensayo no se utilizó oxigenación para las aguas de grifo y destilada, siendo ésta posiblemente la razón por la cual los índices mitóticos en ambas estén un poco por debajo del presentado por las aguas comerciales.

Los resultados obtenidos para el ensayo de recambio de unidad experimental (bulbos de cebolla) como del agua y las soluciones de trabajo aparecen en la Tabla 4, estos permitieron establecer que para la realización de los ensayos se deben hacer dichos recambios ya que se presenta un mejor crecimiento de las raíces, de acuerdo con lo indicado por la longitud y por los valores más altos de índice mitótico. También se pudo apreciar durante la realización de la prueba que al no realizarse el recambio del agua o de las soluciones de trabajo, se presentaba una turbidez en el seno del líquido y la aparición de un precipitado en el fondo del recipiente, debido posiblemente a la liberación de aceites esenciales u otros metabolitos secundarios, propios de la cebolla.

Como consecuencia de la turbidez las raíces se tornaban de aspecto blando y quebradizo y daban una sensación oleaginosa al tacto.

Tabla 1. Efecto del tipo de cebolla y proveedor, sobre la Longitud Radicular (LR) y el porcentaje de Índice Mitótico (%IM), en un período de 72 horas de exposición y luz directa (lámpara fluorescente blanca) y temperatura de laboratorio (24-25 °C). Promedio de tres mediciones más o menos el error estándar.

PROVEEDOR	SECTOR	TC*	LR**	% IM
ÉXITO	San Diego	Morada	+ - +	19.5 ± 0.07
		Blanca	+ + +	23.6 ± 0.04
	Matuna	Morada	+ - -	18.3 ± 0.45
		Blanca	+ + +	22.1 ± 0.85
	Ejecutivos	Morada	+ - -	18.7 ± 0.37
		Blanca	+ + +	22.7 ± 0.34
	Castellana	Morada	- - +	18.1 ± 0.56
		Blanca	+ + +	22.9 ± 0.49
	Cartagena	Morada	+ - -	18.5 ± 0.77
		Blanca	+ + +	22.4 ± 0.22
OLIMPICA	Matuna	Morada	+ - +	19.2 ± 0.42
		Blanca	+ + +	21.7 ± 0.47
	Badillo	Morada	- - -	18.8 ± 0.44
		Blanca	- + +	20.1 ± 0.45
	Bocagrande	Morada	- - -	18.2 ± 0.03
		Blanca	+ + +	21.2 ± 0.54
	Ejecutivos	Morada	- - -	19.8 ± 0.25
		Blanca	+ + +	20.3 ± 0.17
	SAO	Morada	- - -	19.3 ± 0.38
		Blanca	+ - -	20.2 ± 0.46

+++ : > 2 cm. de crecimiento; ++ : < 2 cm. de crecimiento; + : Hasta 1 cm. de crecimiento; --- : < 0.5 cm. de crecimiento; * TC: Tipo de Cebolla; **LR: Longitud Radicular, %IM: Índice mitótico.

Tabla 2. Efecto del tipo de cebolla y proveedor, sobre la Longitud Radicular (LR) y el porcentaje de Índice Mitótico (%IM), en un período de 72 horas de exposición en ausencia de luz (locker) y temperatura de laboratorio (24 -25 °C). Promedio de tres mediciones más o menos el error estándar.

PROVEEDOR	SECTOR	TC*	LR**	% IM
ÉXITO	San Diego	Morada	+ - +	18.5 ± 0.23
		Blanca	+ + +	20.6 ± 0.26
	Matuna	Morada	+ - -	17.3 ± 0.40
		Blanca	+ + +	20.1 ± 0.43
	Ejecutivos	Morada	+ - -	15.7 ± 0.47
		Blanca	+ + +	19.7 ± 0.45
	Castellana	Morada	- - +	18.1 ± 0.19
		Blanca	+ + +	19.9 ± 0.56
	Cartagena	Morada	+ - -	14.5 ± 0.48
		Blanca	+ + +	21.4 ± 0.45
OLIMPICA	Matuna	Morada	+ - +	16.2 ± 0.50
		Blanca	+ + +	18.7 ± 0.45
	Badillo	Morada	- - -	15.8 ± 0.20
		Blanca	- + +	17.1 ± 0.42
	Bocagrande	Morada	- - -	18.2 ± 0.34
		Blanca	+ + +	19.2 ± 0.53
	Ejecutivos	Morada	- - -	19.8 ± 0.45
		Blanca	+ + +	21.3 ± 0.50
	SAO	Morada	- - -	14.3 ± 0.57
		Blanca	+ - -	18.2 ± 0.43

+++ : > 2 cm. de crecimiento; ++ : < 2 cm. de crecimiento; + : Hasta 1 cm. de crecimiento; --- : < 0.5 cm. de crecimiento; * TC: Tipo de Cebolla; **LR: Longitud Radicular, %IM: Índice mitótico.

Tabla 3. Efecto del tipo de agua, sobre la Longitud Radicular (LR), el porcentaje de Índice Mitótico (%IM) y el % de Índice de aberraciones (%IA), utilizando cebollas blancas en un período de 72 horas de exposición. Promedio de tres mediciones más o menos el error estándar.

TIPO DE AGUA	LR**	% IM	%IA
Agua Destilada	- + +	15.2	0.60 ± 0.09
Agua de Grifo	+ + -	17.4	0.72 ± 0.02
Agua Brisa	+ + +	22.6	0.38 ± 0.06
Agua Cristal	+ + +	20.4	0.61 ± 0.09

+++ : > 2 cm. de crecimiento; ++ : < 2 cm. de crecimiento; + : Hasta 1 cm. de crecimiento; --- : < 0.5 cm. de crecimiento; **LR: Longitud Radicular, %IM: Índice mitótico, %IA: Índice de aberraciones.

Tabla 4. Efecto del tipo de unidad experimental y cambio total o parcial del medio de cultivo sobre la Longitud Radicular (LR) y el porcentaje de Índice Mitótico (%IM), en un período de 72 horas de exposición en ausencia de luz (locker) y temperatura de laboratorio (24 -25 °C). Promedio de tres mediciones más o menos el error estándar.

CONDICIÓN	LR**	% IM
Igual unidad experimental	+ - -	12.3 ± 0.55
Diferente unidad experimental	+ + +	22.5 ± 0.29
Recambio total de agua o soluciones	+ + +	20.3 ± 0.42
Recambio parcial de agua o soluciones	+ - -	13.4 ± 0.40

+++ : > 2 cm. de crecimiento; ++ : < 2 cm. de crecimiento; + : Hasta 1 cm. de crecimiento; --- : < 0.5 cm. de crecimiento; **LR: Longitud Radicular, %IM: Índice mitótico.

Con el fin de realizar la determinación óptima de la concentración de cadmio (Cd) a ser utilizada como control positivo durante el desarrollo del presente trabajo, fue utilizada inicialmente para esta actividad una concentración de 200 μM de Cd (Caballero y Patiño, 2007), evaluando cómo se afectaba el IM y el IA. Sin embargo, a pesar de reportarse a esta concentración alteraciones microscópicas, en el presente estudio no fue posible observar ninguna alteración del tejido meristemático; por lo tanto se procedió a la evaluación de una serie de concentraciones de Cd que permitieran observar el desarrollo de cada uno de los parámetros establecidos para los estudios de evaluación genotóxica. Las concentraciones de cadmio evaluadas fueron: 8.90, 22.50, 44.50, 66.75 y 89.0 μM , respectivamente. Los resultados obtenidos de estas evaluaciones se presentan en la Figura 16.

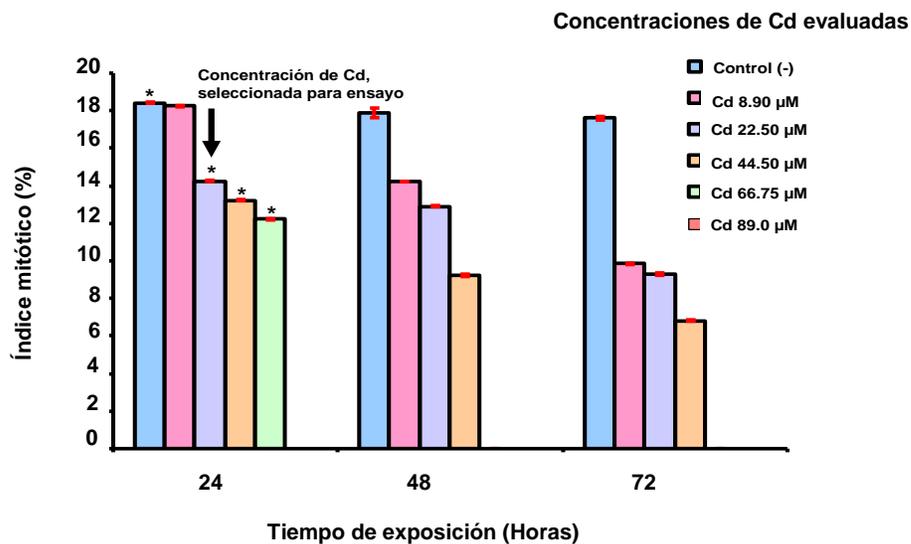


Figura 16. Efecto de las soluciones de cadmio evaluadas sobre el índice mitótico en raíces de cebolla durante las 24, 48 72 horas de exposición. *Diferencia significativa entre el control negativo (agua) y las concentraciones de cadmio a las 24 horas de exposición.

De acuerdo con estos resultados se puede observar que a las 24 horas, existe diferencia significativa entre el control negativo (agua) y las concentraciones de cadmio comprendidas entre 22.5 μM a 89.0 μM . Apreciando también como la exposición de las raíces al cadmio, hace que se aumenten los efectos tóxicos del metal con relación al tiempo, ya que a las 48 y 72 horas, se observa que existen diferencias significativas entre todas las concentraciones de cadmio y el control negativo (agua). Lo anterior, permitió seleccionar como concentración mínima inhibitoria del IM la de 22.5 μM , como control positivo, para los siguientes bioensayos.

De manera similar se procedió a la evaluación del efecto del cadmio sobre el IA. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 17, donde se observa que existe diferencia significativa entre el control negativo (agua) y todas las concentraciones de Cd utilizadas a las 24, 48 y 72 horas. Las aberraciones presentadas por las células estaban constituidas principalmente como puentes anafásicos, cromosomas fragmentados y metafases alteradas. Por lo anterior, debido a que se observaron aberraciones para todas las concentraciones de Cd utilizadas, se decidió tomar la concentración de 22.50 μM en los experimentos posteriores como control positivo ya que ésta era la mínima dosis de cadmio que indujo alteraciones cromosómicas y además ejercía un efecto inhibitorio significativo del IM durante el tiempo de exposición de las raíces.

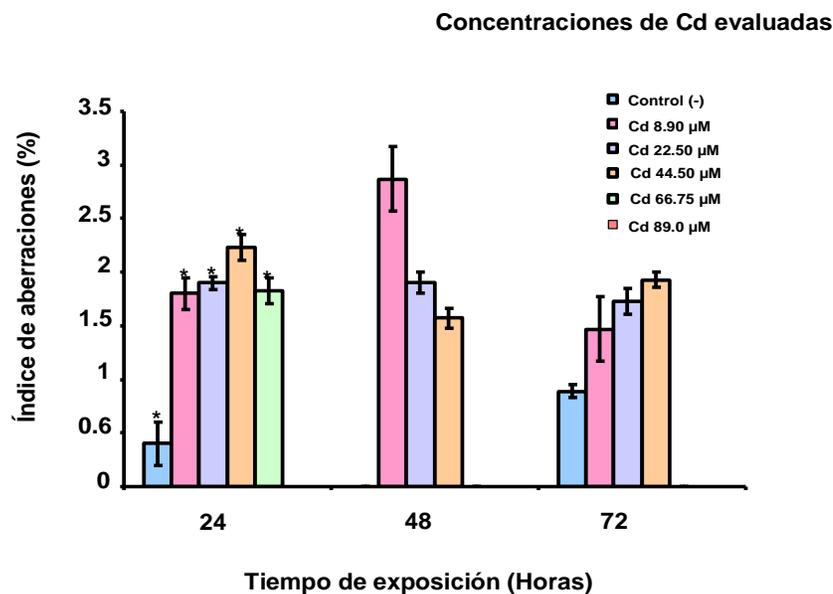


Figura 17. Efecto de las soluciones de cadmio evaluadas sobre el índice de aberraciones en raíces de cebolla durante las 24, 48 y 72 horas de exposición. *Diferencia significativa entre el control negativo (agua) y las concentraciones de cadmio a las 24 y 72 horas de exposición.

3. Efectos producidos por el mercurocromo sobre las raíces de *Allium cepa*.

Seleccionada la concentración de cadmio (22.50 µM) a emplear como control positivo en el bioensayo, se procedió a evaluar una serie de diluciones logarítmicas de mercurocromo (0.01, 0.1, 1, 10, 50, 100 µM) y concentraciones adicionales de 250 y 500 µM; con el objetivo de determinar aquellas concentraciones que tuvieran un efecto tóxico sobre las células meristemáticas de las raíces de *A. cepa* medidas a través de los diversos parámetros estudiados, a saber: porcentaje de índice mitótico (%IM), porcentaje de índice de aberraciones (%IA), longitud y peso a diferentes períodos de exposición (24 y 72 horas) del tóxico.

Los resultados obtenidos para el efecto del mercurocromo sobre el índice mitótico aparecen en la Figura 18. Como se puede observar existe una diferencia significativa entre el Cd y el control negativo a ambos tiempos de exposición. Para el mercurocromo las diferencias significativas se produjeron a partir de la concentración 10 μM , la cual fue considerada en este estudio como la concentración mínima indicada para la posterior evaluación del efecto protector usando aceite volátil de *Lippia alba*.

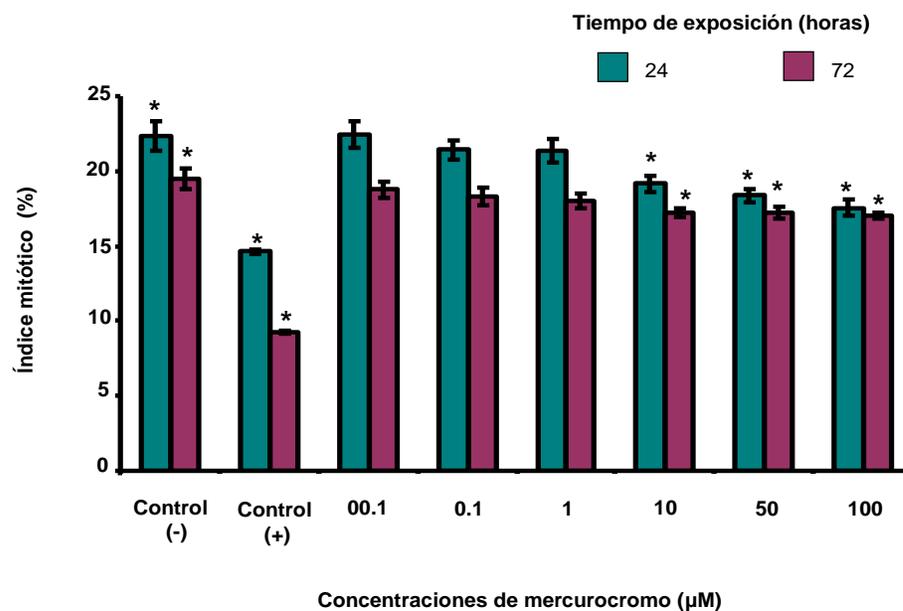


Figura 18. Efecto del mercurocromo sobre el índice mitótico en raíces de cebolla durante las 24 y 72 horas de exposición. El control negativo corresponde a agua potable y el positivo a una solución de Cd 22.5 μM . *Diferencia significativa entre los dos períodos de exposición.

A pesar de existir un efecto inhibitorio del mercurocromo sobre el índice mitótico, éste efecto fue menos marcado al que se produjo con el cadmio, ya que al comparar los valores de estos en la Figura 18, se encontró diferencia

significativa entre todas las concentraciones del compuesto mercurial y la del cadmio usada como control positivo.

Con el fin de conocer si el mercurocromo a concentraciones más altas podría tener un efecto similar sobre el índice mitótico que la concentración de 22.5 μM de cadmio, se realizó un ensayo adicional con dos concentraciones mayores de mercurocromo: 250 y 500 μM . Los resultados de este ensayo aparecen en la Figura 19. Apreciando que el control negativo (agua) mostró una diferencia significativa ($p < 0.0001$), tanto con el cadmio como con las dos concentraciones de mercurocromo ensayadas. Al compararse los efectos producidos por el mercurocromo con el efecto producido control positivo, se observó diferencia significativa entre ellos a ambos tiempos de exposición, lo cual significa que aún a concentraciones tan altas como las ensayadas, el cadmio tiene un efecto inhibitor sobre el IM más marcado que el mercurocromo.

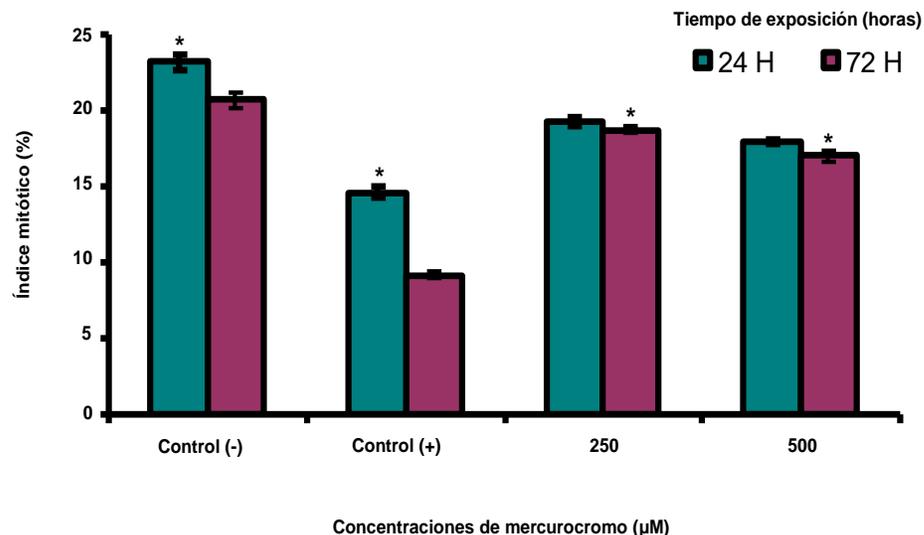


Figura 19. Efecto del mercurocromo sobre el índice mitótico en raíces de cebolla durante las 24 y 72 horas de exposición. El control negativo

corresponde a agua potable y el positivo a una solución de Cd 22.5 μM
*Diferencia significativa entre el control negativo y el control positivo; además de las concentraciones de mercurocromo.

La evaluación del índice de aberraciones (Figura 20) indica que existe diferencia significativa entre los controles negativo (agua) y positivo (Cd) en los períodos de exposición ensayados (24 y 72 h), mientras que para las concentraciones de mercurocromo por debajo de 100 μM , a pesar de observarse la presencia de aberraciones, no se presentaron diferencias significativas al ser comparadas con el control negativo, en los mismos períodos. Por otra parte, el control positivo (Cd) presentó diferencia significativa con todas las concentraciones de mercurocromo utilizadas, en ambos períodos de exposición (24 y 72 h). Esto confirma los resultados obtenidos para los índices mitóticos con relación al mayor efecto tóxico del cadmio cuando se compara con el mercurocromo. Es de notar que a 100 μM de mercurocromo no se observaron aberraciones en este estudio.

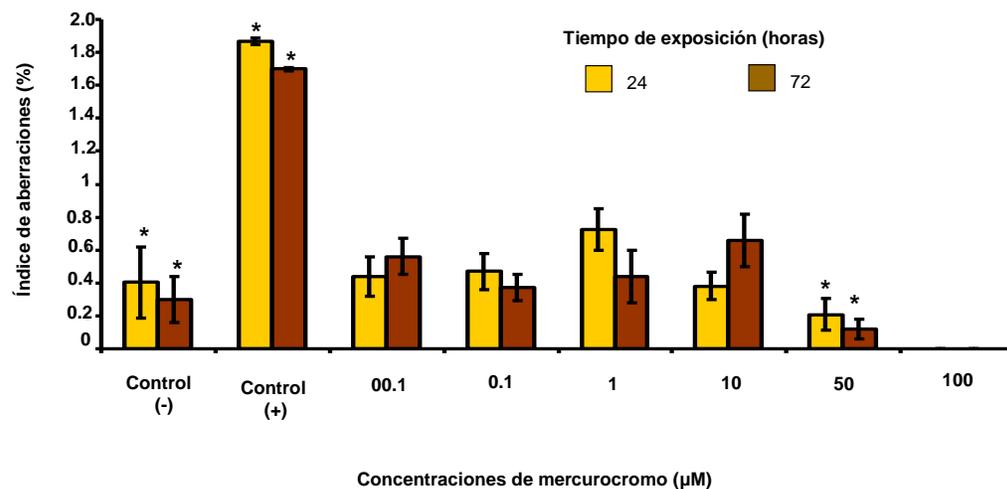


Figura 20. Efecto del mercurocromo sobre el índice de aberraciones en raíces de cebolla a las 24 y 72 horas de exposición. El control negativo

corresponde a agua potable y el positivo a una solución de Cd 22.5 μM . *Diferencias significativas correspondientes a los controles positivo y negativo a ambos períodos de exposición.

Para las concentraciones de mercurocromo utilizadas de 250 y 500 μM (Figura 21) no se observaron aberraciones cromosómicas, a pesar de observarse un efecto inhibitor sobre el IM. Este comportamiento fue similar al presentado por la concentración de 100 μM . Las diferencias significativas fueron dadas entre los controles negativo y positivo.

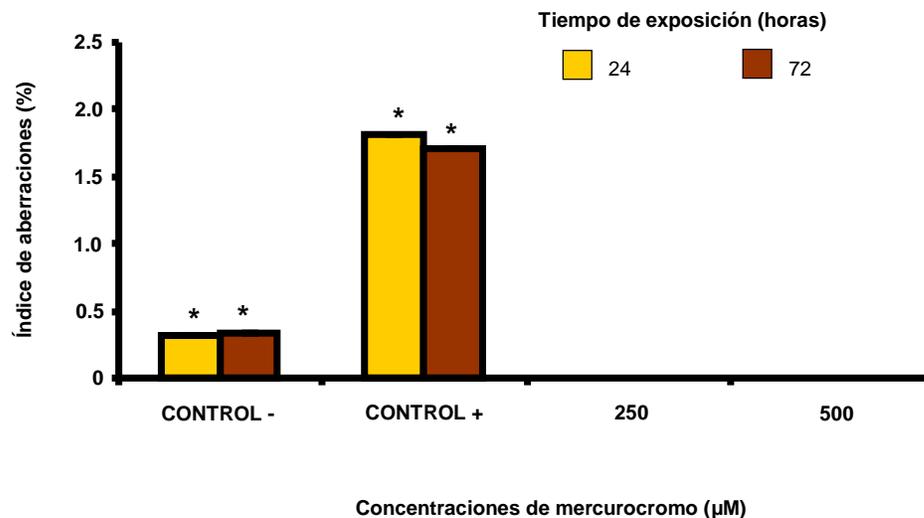


Figura 21. Efecto del mercurocromo sobre el índice de aberraciones en raíces de cebolla a las 24 y 72 horas de exposición. El control negativo corresponde a agua potable y el positivo a una solución de Cd 22.5 μM . *Diferencia significativa correspondientes a los controles negativo y positivo a ambos períodos de exposición.

Cuando se compararon las longitudes radicales (Figuras 22 y 23) expuestas a las diferentes concentraciones de mercurocromo ensayadas a ambos períodos de exposición (24 y 72 horas) con los controles negativo y

positivo, se observó que para las concentraciones comprendidas entre 0.01 hasta 50 μM , no se presentaron diferencias significativas con el agua usada como control negativo, mientras que para las concentraciones de 100, 250 y 500 μM , si existe una diferencia significativa ($p < 0.001$), indicando con esto un efecto tóxico sobre el crecimiento de las raíces a estas concentraciones.

La comparación de los resultados obtenidos para el crecimiento de las raíces en presencia de mercurocromo y cadmio, indicó un efecto inhibitorio más pronunciado de éste último, ya que se presentaron diferencias significativas ($p < 0.001$) entre todas las concentraciones ensayadas de mercurocromo con la del control positivo, especialmente a las 24 horas de exposición. Estas diferencias fueron menores a las 72 horas.

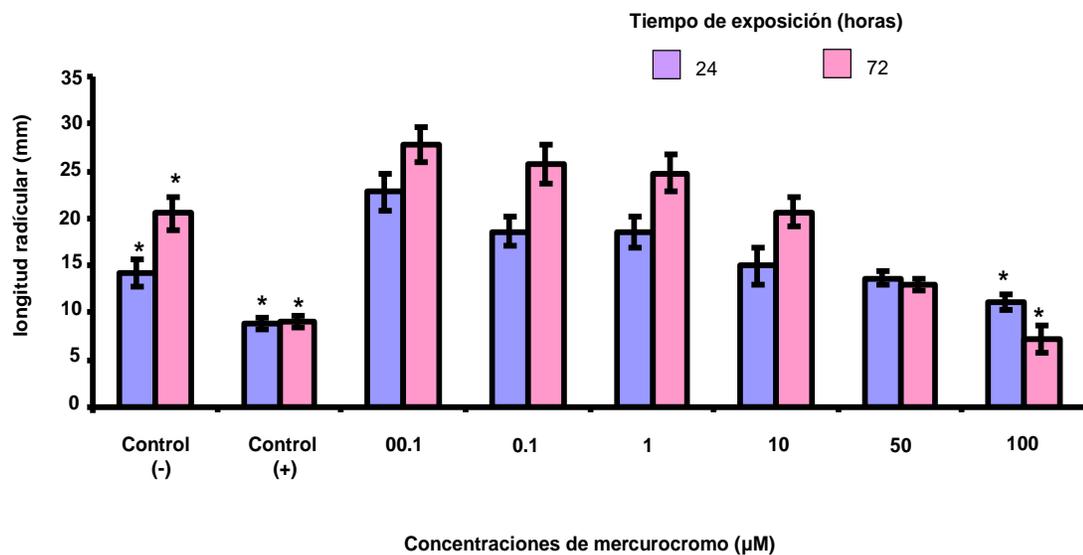


Figura 22. Efecto del mercurocromo sobre la longitud en raíces de cebolla durante las 24 y 72 horas de exposición. El control negativo corresponde a agua potable y el positivo a una solución de 22.5 μM . *Diferencias significativas correspondientes a los controles negativo y positivo y la concentración de mercurocromo 100 μM .

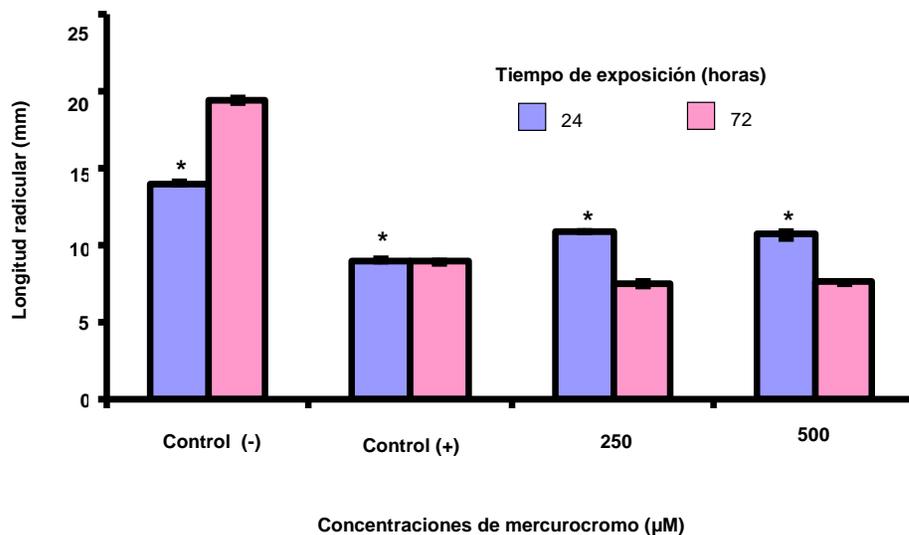


Figura 23. Efecto del mercurocromo sobre la longitud en cebolla durante las 24 y 72 horas de exposición. El control negativo corresponde a agua potable y el positivo a una solución de 22.5 µM. *Diferencias significativas correspondientes a los controles negativo y positivo y las concentraciones de mercurocromo 250 y 500 µM.

Con relación al efecto del mercurocromo sobre el peso de las raíces, la evaluación de éste parámetro a períodos de exposición (24 y 72 horas; Figura 24) indicó una diferencia significativa entre los controles positivo (Cd) y negativo (agua). Para el mercurocromo a concentraciones comprendidas entre 0.01 – 10 µM no se observó efecto tóxico sobre el peso de las raíces; a 50 µM presentó una actividad tóxica moderada, mientras que existió diferencia significativa con relación al control negativo a concentraciones por encima de 100 µM (Figuras 24 y 25). Esto es un reflejo del efecto tóxico que presenta el mercurocromo sobre la longitud de las raíces a las mismas concentraciones entre 100 – 500 µM. Cuando se comparó el efecto producido entre sí, de las concentraciones de mercurocromo 100, 250 y 500

μM no se observó diferencias significativas. Sin embargo, existe una diferencia significativa entre el efecto tóxico producido por el cadmio cuando se compara con todas las concentraciones de mercurocromo utilizadas en el ensayo, corroborando la mayor toxicidad del cadmio sobre el peso radicular de los bulbos.

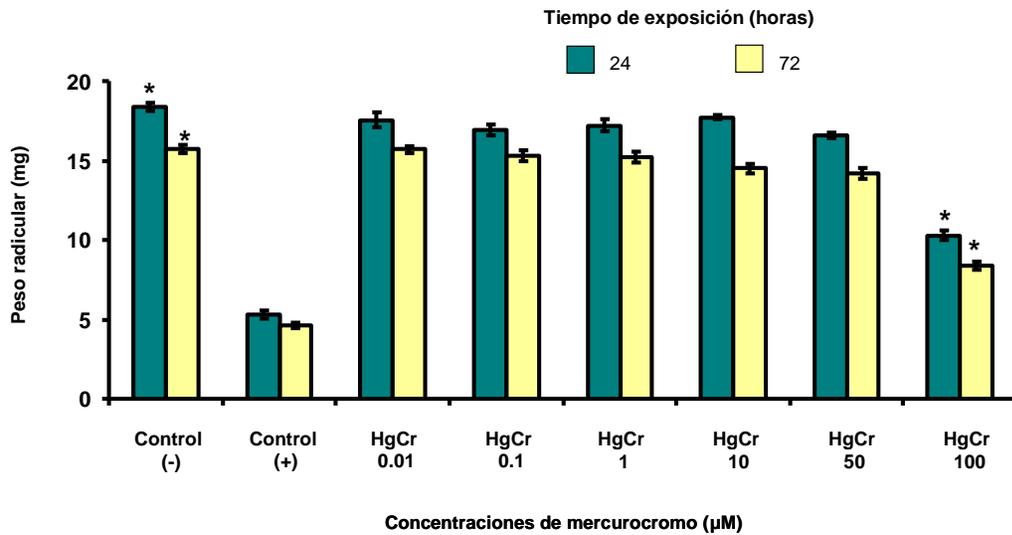


Figura 24. Efecto del mercurocromo sobre el peso en raíces de cebolla durante las 24 y 72 horas de exposición. El control negativo corresponde a agua potable y el positivo a una solución de $22.5 \mu\text{M}$. *Diferencias significativas entre el control negativo y la concentración de mercurocromo $100 \mu\text{M}$.

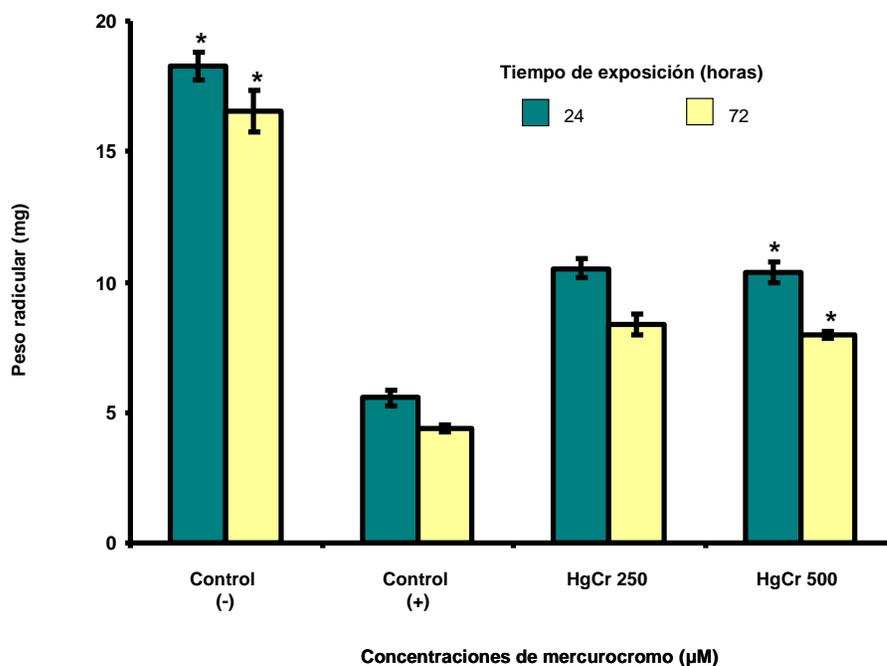


Figura 25. Efecto del mercurocromo sobre el peso en raíces de cebolla durante las 24 y 72 horas de exposición. El control negativo corresponde a agua potable y el positivo a una solución de 22.5 µM. *Diferencias significativas entre el control negativo y las concentraciones de mercurocromo 250 y 500 µM.

4. Evaluación del efecto protección del aceite esencial de *Lippia alba* sobre los efectos tóxicos del mercurocromo.

Concluidos todos los ensayos para la determinación de las concentraciones tóxicas de mercurocromo, se procedió a la evaluación del efecto protector del aceite esencial de *Lippia alba*; cabe resaltar que con el fin de evitar la volatilización y/o descomposición del aceite esencial, todas las concentraciones donde éste fue evaluado, se prepararon al momento de ser expuestos los bulbos de cebolla al mismo.

En estos ensayos fueron evaluadas dos concentraciones de mercurocromo: la concentración de 10 μM , la cual resultó ser la mínima concentración de mercurocromo que produjo daños genotóxicos y la de 500 μM , la cual fue la máxima concentración ensayada de este compuesto. Estas dos concentraciones de mercurocromo fueron evaluadas en ausencia y presencia de una concentración inicial del aceite de *Lippia alba* (100 μM). Esta concentración inicial correspondió a la máxima concentración del aceite esencial de una serie logarítmica de diluciones comprendidas entre 0.01 y 100 μM propuesta inicialmente para la ejecución de este trabajo.

De acuerdo con los resultados obtenidos al evaluar las dos concentraciones de mercurocromo (10 y 500 μM) con relación al índice mitótico de las raíces (Figura 26), se encontró que tanto para las 24 como a las 72 horas de exposición la concentración de 10 μM no presentó diferencia significativa con el control negativo (DMSO); por el contrario, si se pudo observar un efecto tóxico del mercurocromo a 500 μM , de acuerdo con la diferencia significativa al compararse con el control negativo. Por otro lado, como se puede observar en la Figura 26, la adición del aceite esencial de *Lippia alba* a los bulbos cuyas raíces estaban expuestas a las dos concentraciones de mercurocromo ensayadas no presentaron diferencia significativa cuando se compararon con el control negativo, pero al contrario estas diferencias significativas se hacían presentes cuando se comparaban con los valores de los índices mitóticos obtenidos para el mercurocromo en ausencia del aceite esencial; lo anterior se traduce en un efecto protector del aceite de *Lippia alba* (100 μM) durante el tiempo de exposición de las raíces al mercurocromo.

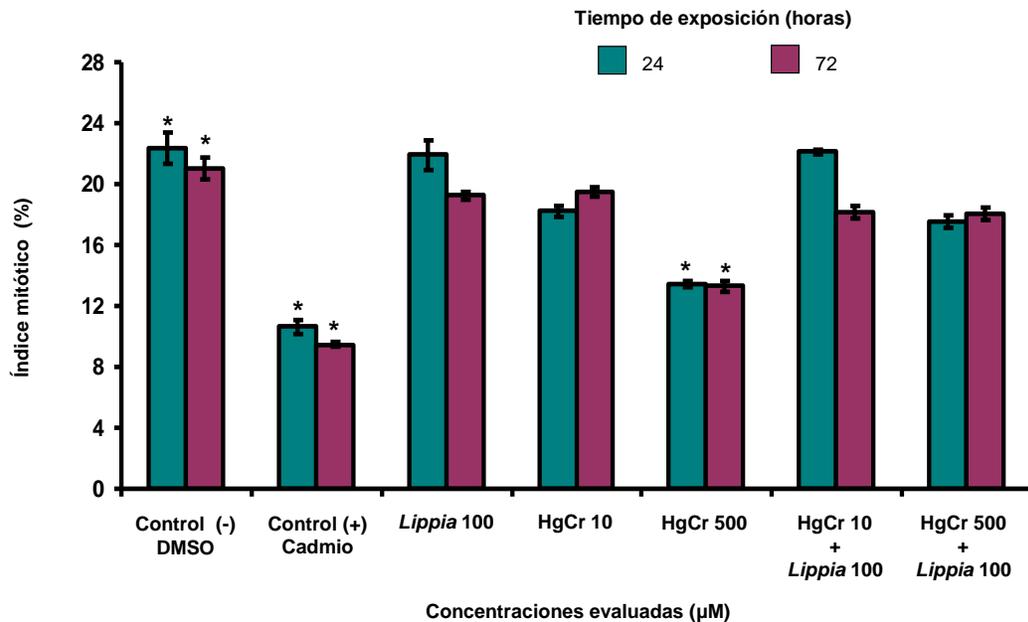


Figura 26. Efecto del mercurocromo en ausencia y presencia del aceite esencial de *Lippia alba* sobre el índice mitótico en raíces de cebolla durante las 24 y 72 horas de exposición. El control negativo corresponde a una solución de DMSO y el positivo a una solución de Cd 22.5 μM. *Diferencia significativa entre el control negativo y mercurocromo a 500 μM.

De acuerdo con lo observado en la Figura 27, a la más alta concentración de mercurocromo ensayada (500 μM) no se observó la presencia de aberraciones, a diferencia de la concentración 10 μM, la cual presentó diferencia significativa con el control negativo. La adición del aceite de *Lippia alba* (100 μM) a la concentración de mercurocromo de 10 μM, presentó diferencia significativa comparado con los valores obtenidos para esta misma concentración de mercurocromo sin el aceite, tanto a las 24 como a las 72 horas de exposición. Lo anterior indica que el aceite de *L. alba* ejerce un efecto protector contra la producción de aberraciones en el tejido

meristemático de las raíces expuestas al mercurocromo a la concentración de 10 μM . Como era de esperarse existe diferencia significativa entre los dos controles (DMSO y Cd) usados en este estudio.

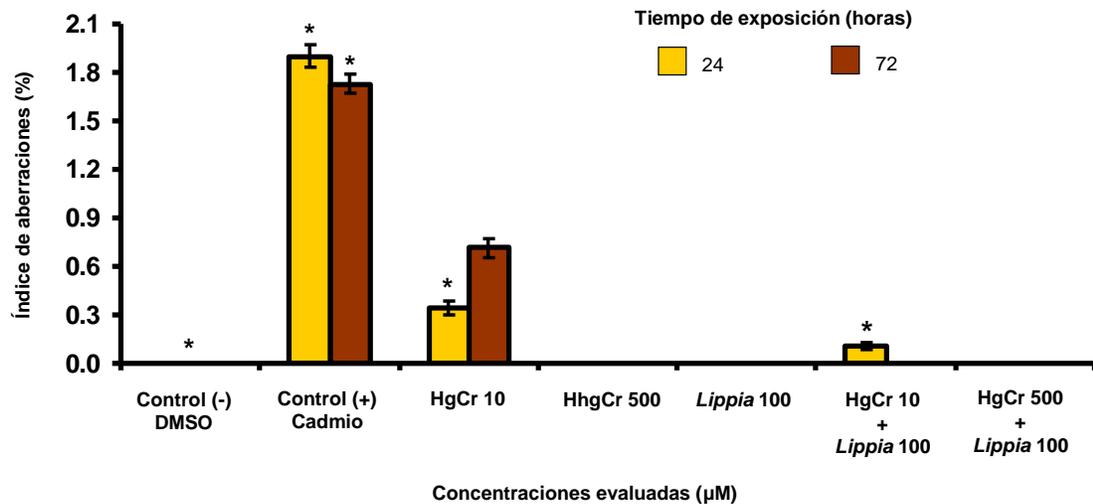


Figura 27. Efecto del mercurocromo en ausencia y presencia del aceite esencial de *Lippia alba* sobre el índice de aberraciones en raíces de cebolla durante las 24 y 72 horas de exposición. El control negativo corresponde a una solución de DMSO y el positivo a una solución de Cd 22.5 μM . *Diferencias significativas correspondientes al control negativo y mercurocromo 10 μM ; además de la mezcla de mercurocromo 10 μM más *Lippia* 100 μM .

Con el fin evaluar el posible efecto protector del aceite de *Lippia alba* contra la toxicidad producida por el mercurocromo sobre el crecimiento de la raíz se efectuarón dos réplicas de un bioensayo a dos tiempos de exposición diferente (24 y 72 h), que arrojó los resultados mostrados en la Figura 28. De acuerdo con estos, se puede observar que a las 24 h la concentración de 10 μM de mercurocromo no presentó diferencia significativa cuando se comparó con el DMSO al 0.5% usado como blanco, lo cual indicó ausencia del efecto

tóxico del mercurocromo a esta concentración sobre el crecimiento en longitud de la raíz. Sin embargo a las 72 h se presentó una moderada actividad tóxica ($p < 0.01$). Como se puede observar en la Figura 28, al adicionar el aceite esencial de *Lippia alba* se presenta una diferencia significativa al comparar los resultados obtenidos para el mercurocromo 10 μM solo, con aquellos obtenidos para la mezcla de mercurocromo 10 μM más el aceite esencial de *Lippia alba* 100 μM , lo cual significa un efecto protector del aceite.

Al analizar los resultados obtenidos a las 24 y 72 h de exposición de las raíces de los bulbos a la concentración de 500 μM de mercurocromo, se puede observar que estos presentan una diferencia significativa ($p < 0.001$) cuando se compara con el DMSO al 0.5%, corroborándose el efecto inhibitor del crecimiento producido por el mercurocromo como se indicó previamente en este estudio. La adición del aceite esencial de *L. alba* 100 μM no produjo diferencia significativa a las 24 h, cuando se compararon los resultados obtenidos por la concentración de 500 μM , indicando esto ausencia de efecto protector. Sin embargo, a las 72 horas si se presentó una diferencia significativa que permite sugerir un efecto protector importante contra la toxicidad del mercurocromo, ejercida por el aceite esencial de *L. alba*.

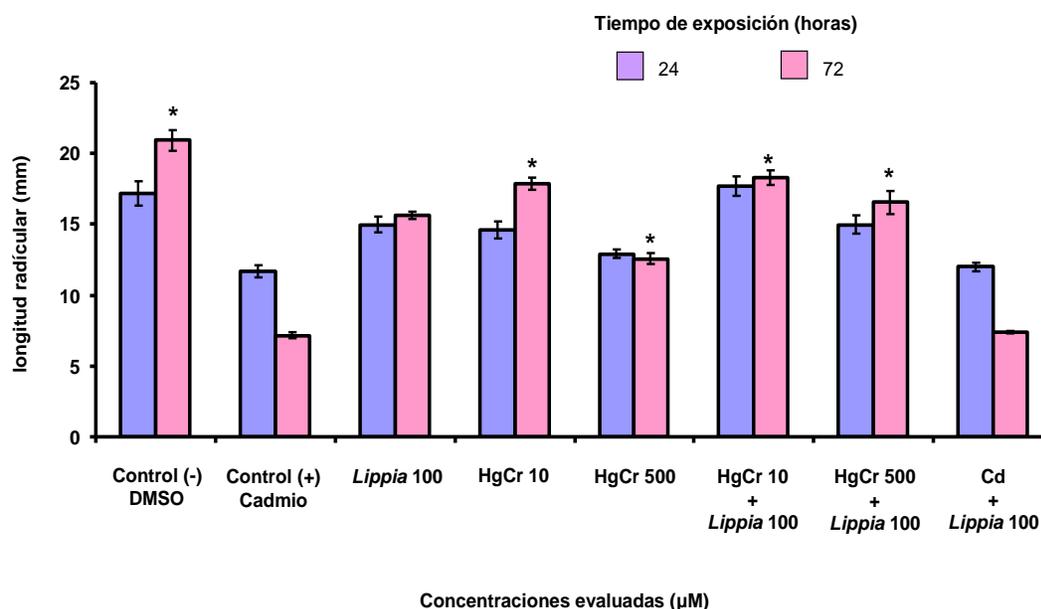


Figura 28. Efecto del mercurocromo en ausencia y presencia del aceite esencial de *Lippia alba* sobre la longitud en raíces de cebolla durante las 24 y 72 horas de exposición. El control negativo corresponde a una solución de DMSO y el positivo a una solución de Cd 22.5 μM. *Diferencias significativas entre el control negativo y mercurocromo 10 y 500 μM; además de las mezclas de mercurocromo 10 y 500 μM más el aceite de *Lippia* 100 μM a las 72 horas de exposición.

El efecto protector del aceite de *Lippia alba* se deduce al observar las diferencias significativas que se presentan cuando se compararon los valores de los pesos de las raíces para las dos concentraciones de 10 y 500 μM de mercurocromo ensayado en ausencia y presencia del aceite esencial (Figura 29). Como se puede observar los resultados obtenidos a las 24 y 72 horas de exposición de las raíces al mercurocromo, antes y después de adicionar el aceite de *Lippia alba*, son muy similares. Lo anterior significa que el aceite no incrementa su actividad protectora a través del tiempo, con relación al peso

de la raíces, a diferencia de lo que se observó en este estudio para el caso del crecimiento en longitud de las mismas.

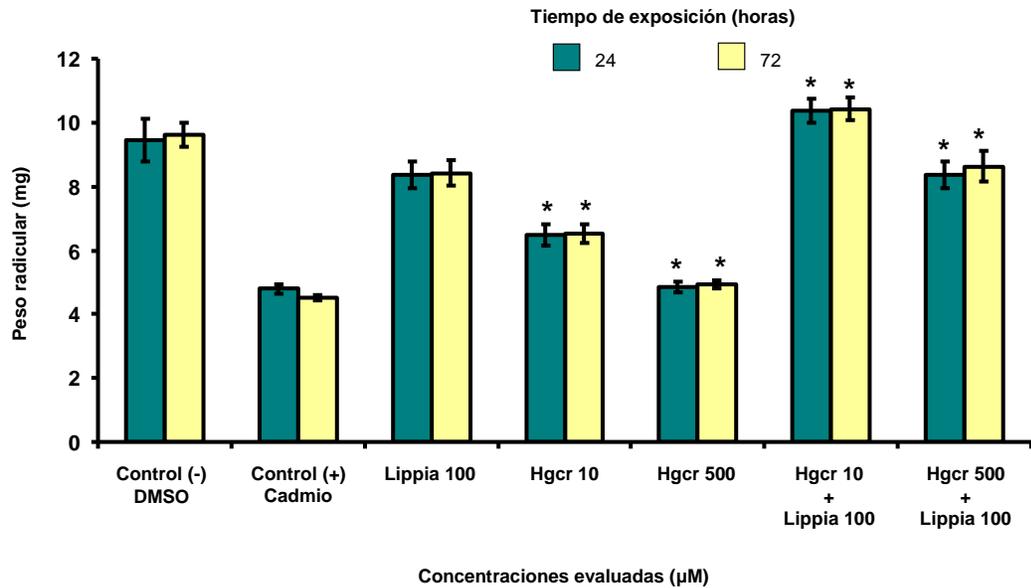


Figura 29. Efecto del mercurocromo en ausencia y presencia del aceite esencial de *Lippia alba* sobre el peso en raíces de cebolla durante las 24 y 72 horas de exposición. El control negativo corresponde a una solución de DMSO y el positivo a una solución de Cd 22.5 µM.

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De acuerdo con los resultados obtenidos, las alteraciones físicas como ganchos, nódulos, formación de raíces laterales, adelgazamiento y ablandamiento de las mismas encontradas en las raíces tratadas con mercurocromo a las concentraciones de 10, 50, 100, 250 y 500 μM (Figura 30), coinciden con estudios realizados en los cuales fue empleado cadmio como agente genotóxico (Wojcik y Tukendorf, 1999) como lo muestra la Figura 31a; lo anterior puede explicarse debido a que el cadmio puede ser acumulado por las plantas, principalmente en las raíces y hojas, produciendo desórdenes en su fisiología e inhibiendo el crecimiento y afectando la morfología de la misma, por competir bioquímicamente con metales esenciales tales como el Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} y Ca^{2+} en la raíz, y disminuyendo la concentración de clorofila hasta en 60 % en las hojas (Zoghiami *et al.*, 2006). Para el DMSO (control negativo) en un experimento realizado a concentraciones de uso no fue observado ningún tipo de malformación manteniéndose su color y firmeza durante el ensayo (Figura 31b). Cabe destacar que el efecto ejercido por el cadmio es mucho más marcado que el producido por el mercurocromo.

Los daños presentados en el peso y la longitud de las raíces de *Allium cepa* expuestas a diferentes concentraciones de mercurocromo a lo largo de este estudio fueron visibles a concentraciones de 10 y 500 μM , a diferencia de las raíces expuestas al control negativo (DMSO) las cuales mostraron un crecimiento y peso normal con el pasar del tiempo, corroborándose de esta manera el efecto tóxico del mercurocromo sobre el crecimiento de las mismas; estos resultados permiten establecer similitudes con reportes de otros autores quienes establecieron alteraciones con otras sustancias tóxicas (Montiel *et al.*, 2006) en otros cultivos celulares, reflejado por un bloqueo en

el crecimiento de las raíces de diferentes plantas tales como el género *Helianthus* (Chakravarty y Srivastava, 1992), *Vicia fava* (Mo y Li, 1992), *Hordeum vulgares* (Zhang y Yang, 1994), *Z. mays* (Andrade *et al.*, 2008), *Paris quadrifolia* L., Trilliaceae (Juozas *et al.*, 2003). De igual forma, Fusconi *et al.*, 2006 reportó resultados similares utilizando Cd como agente genotóxico, mostrando que este metal causó una inhibición en el crecimiento de las raíces de *Pisum sativum*, cuando observó su crecimiento en soluciones de cadmio a 250 μ M, después de 24 horas de tratamiento.

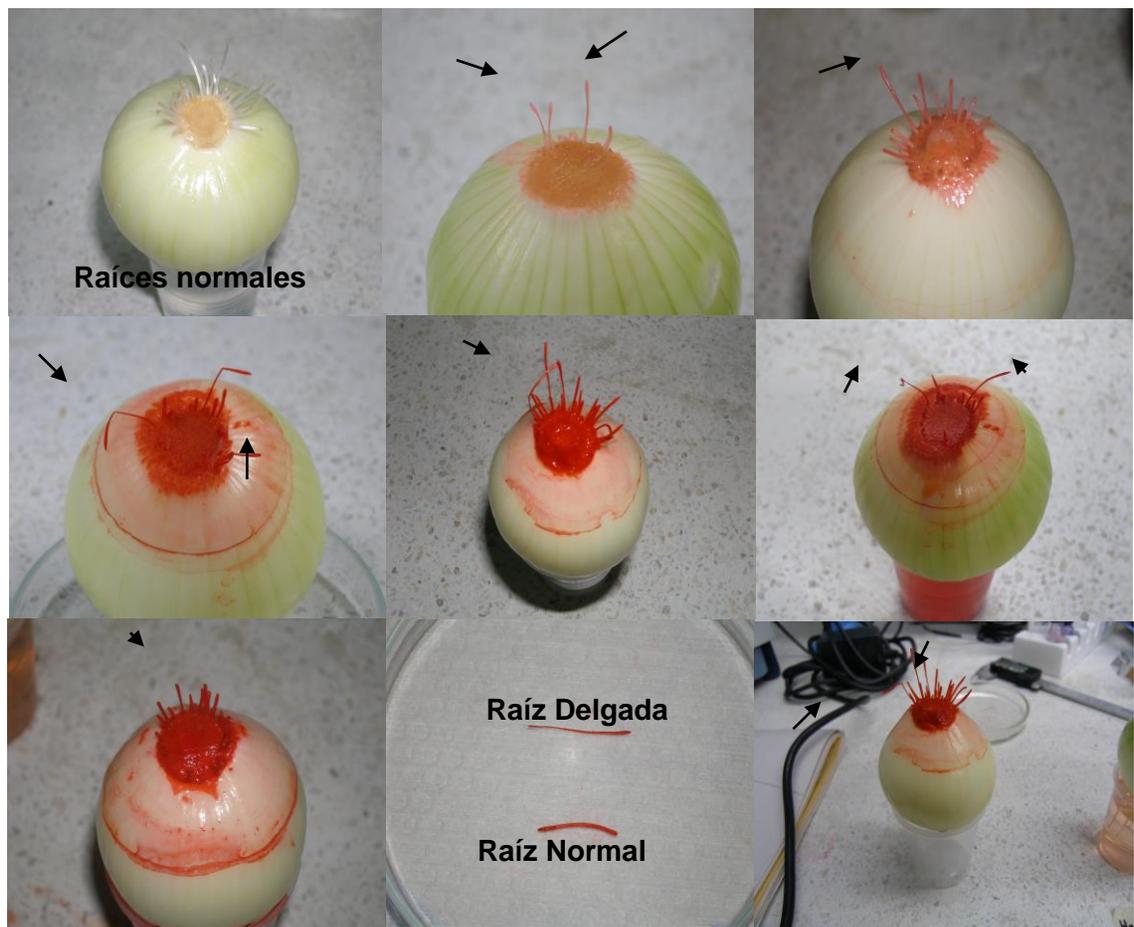


Figura 30. Adelgazamiento de las raíces de *Allium cepa* en presencia de mercurocromo. Las flechas señalan la zona de la raíz que presenta afectación (adelgazamiento).

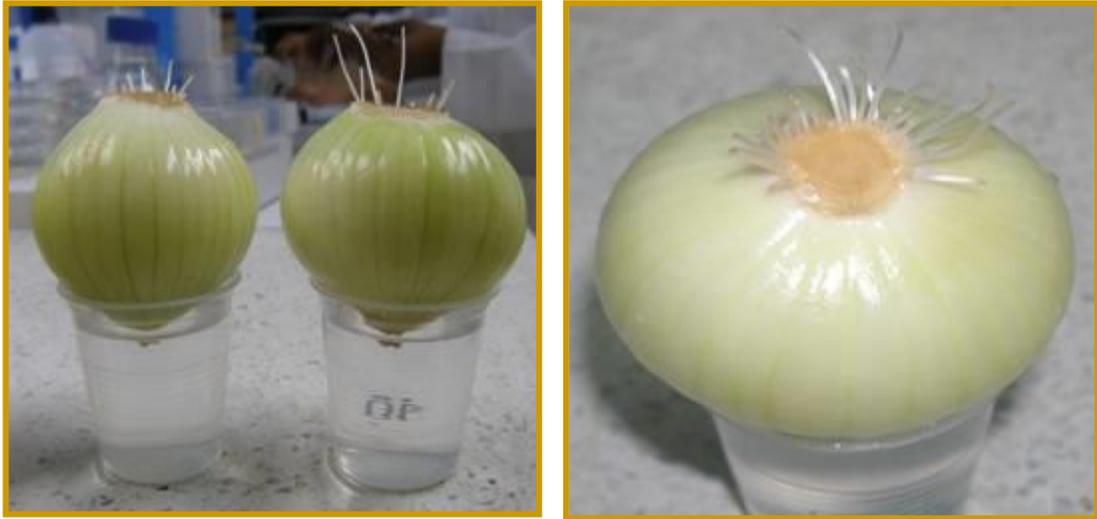


Figura 31a. Raíces expuestas a Cd **Figura 31b.** Raíces expuestas a DMSO

La inhibición en longitud de las raíces observadas en este estudio puede explicarse probablemente por mecanismos relacionados con el funcionamiento de la membrana plasmática, y que involucran diferentes especies químicas, todas ellas de importancia en la fisiología vegetal, tales como el cinc (Zn^{2+}), magnesio (Mg^{2+}) y al calcio (Ca^{2+}). Las bajas concentraciones de iones zinc favorecen un aumento de la auto-oxidación de la membrana plasmática, órgano en el cual están ubicados los principales sitios de selectividad en la adquisición de cationes y aniones, provocando graves perturbaciones del ambiente celular; en consecuencia un tránsito desordenado de elementos metálicos o metaloides, que conducen finalmente a la inactivación de enzimas específicas en la síntesis de proteínas y de ARN, (World Health Organization, 1990) responsables directos del desarrollo de las raíces.

El análisis microscópico para las alteraciones cromosómicas realizado a las raíces de *Allium cepa*, durante la exposición de las mismas a las diferentes concentraciones de mercurocromo fueron dadas durante las etapas del ciclo celular correspondientes a la metafase y anafase, indicando puentes cromosómicos, cromosomas aislados y fragmentados como los daños genéticos más frecuentes; resultados que se apoyan en estudios realizados por Mastrangelo *et al.*, 2006; Lazutka *et al.*, 2003. En relación con lo anterior puede inferirse la influencia del derivado metálico en los resultados experimentales obtenidos (Hartwig, 1995; Cardellá, 2000), a pesar de que las células vegetales poseen mecanismos de protección contra los metales pesados (Garbisu y Alkorta, 2001) se puede decir que los daños genotóxicos identificados en nuestro estudio son resultado de la generación de especies reactivas de oxígeno durante las reacciones de reducción y oxidación que sufren los metales pesados en el interior de las células y por la interferencia en los procesos de reparación y replicación del ADN (Hartwig, 1995). Una vez incorporados estos metales a los tejidos, se bioacumulan siendo capaces de reaccionar con moléculas orgánicas, que presenten en su estructuras grupos sulfhidrilo y, en menor medida, radicales amino, fosfato, carboxilo, imidazol e hidroxilo, los cuales están presentes en enzimas, proteínas esenciales y ácidos nucleicos (Carrascal *et al.*, 2005).

Los resultados expuestos sugieren que el aceite esencial de *Lippia alba* ejerce un efecto protector sobre la disminución en la presencia de aberraciones cromosómicas, peso y longitud de las raíces de *Allium cepa* expuestas a mercurocromo 10 y 500 μM .

6. CONCLUSIONES

- El mercurocromo a las concentraciones de 10, 250 y 500 μM presentó efecto tóxico sobre el crecimiento radicular, índice mitótico e inducción de aberraciones cromosómicas en las células meristemáticas de *Allium cepa*, demostrándose el grado de sensibilidad de esta especie a la exposición con productos órganomercuriales.
- El INVIMA tiene aprobada una loción para uso tópico que contiene 2% de merbromina (INVIMA, 2006) equivalente a una concentración de 26000 μM , la cual es aproximadamente 2600 veces más alta que la mínima concentración (10 μM) que produjo efectos genotóxicos sobre las células meristemáticas de *Allium cepa* en este estudio.
- El cadmio a la concentración de 22.5 μM presentó un evidente efecto tóxico sobre el crecimiento, índice mitótico e inducción de aberraciones cromosómicas, tales como puentes cromosómicos, cromosomas aislados y fragmentados, en las células meristemáticas de *Allium cepa*. Este efecto se hace más evidente con el tiempo de exposición, corroborándose el efecto tóxico de este metal de acuerdo a reportes previos en la literatura.
- A la concentración de 100 μM del aceite esencial empleada en este estudio, no se produjo disminución del índice mitótico de las células meristemáticas ni del crecimiento de las raíces de *Allium cepa* en comparación con el control negativo (DMSO). Esto indica que a esta concentración el aceite de *Lippia alba* no presenta efecto genotóxico, a pesar de que para la carvona, componente principal del aceite esencial de

Lippia alba se ha reportado efecto mutagénico débil en el Test Ames (Stammati *et al.*; 1999; Bakkali *et al.*, 2008).

- El aceite esencial de *Lippia alba* a la concentración de 100 μM , disminuyó la aparición de aberraciones cromosómicas (puentes cromosómicos, cromosomas fragmentados y aislados) y cambios morfológicos (adelgazamiento de las raíces) producidos por la exposición de células meristemáticas de *Allium cepa* a mercurocromo 10 μM , indicando un efecto protector o antígenotóxico del aceite de *Lippia alba*.

7. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios de genotoxicidad utilizando el bioensayo de *Allium cepa* con diferentes productos comerciales que contengan merbromina como principio activo, con el fin de comunicar los resultados a las autoridades competentes y a la comunidad en general de los riesgos que sobre la salud tendría el uso de estos productos.
- Realizar otros bioensayos de genotoxicidad a nivel celular utilizando tejidos animales y/o humanos, que permitan correlacionar los resultados obtenidos en la evaluación del efecto genotóxico del mercurocromo obtenidos en este estudio.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abramson, D. 1981. The treatment of indolent ulcers with ten percent aqueous mercurochrome. *Milit Med.* 146:311-315.

Adams, M. 2002. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. Environmental Sciences Division Oak Ridge National Laboratory. American Fisheries Society Bethesda, Maryland. 625.

Alanís, A., Calzada, F., Cervantes, J., Torres, J., y Ceballos, G. 2005. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology.* 100:153-157.

Andrade, L., Campos, J., y Davide, L. 2008. Cytogenetic alterations induced by SPL (spent potliners) in meristematic cells of plant bioassays. *Ecotoxicology and Env. Safety.*

Andrioli, N., Wulff, A., y Mudry, M. 2006. *Allium cepa* como biomonitor de toxicidad y genotoxicidad de metronidazol. *Theoria.* 15:9-16.

Aparicio, D. 2006. Caracterización de la flora bacteriana marina resistente a derivados mercuriales presentes en el sedimento de la Bahía de Cartagena Colombia. Tesis de Grado Maestría en Microbiología. Universidad de Cartagena.

Arkhipchuk, V., y Garanko, N. 2002. A novel nucleolar biomarker in plant and animal cells for assessment of substance cytotoxicity. *Environ. Toxicol.* 17:187-194.

ATSDR. 2003. <http://www.atsdr.cdc.gov/clist.html>.

Ayala, J., Nieto, C., Santana, C., Urbón, A., y Gracia, R. 2000. Accidental oral mercurochrome poisoning. *An. Esp. Pediatr.* 53(5):479-81.

Bailey, H., Levy, D., Harris, L., Schink, J., Foss, F., Beatty, P., y Wadler, S. 2002. A Phase II Trial of Daily Perillyl Alcohol in Patients with Advanced Ovarian Cancer: Eastern Cooperative Oncology Group Study E2E96. *Gynecol. Oncol.* 85:464-8.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., y Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils. A review. *Food and Chemical Toxicol.* 46:446-475.

Barbier, O., Jacquillet, G., Tauc, M., Cougnon, M., y Poujeol, P. 2005. Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney, Nephron. *Physiology.* 99(4): 105–110.

Behboodi, B., y Samadi, L.. 2004. Detection of apoptotic bodies and oligonucleosomal DNA fragments in cadmium-treated root apical cells of *Allium cepa* Linnaeus. *Plant Sci.* 167:411–416.

Benavides, M., Gallego, S., y Tomaro, M. 2005. Cadmium toxicity in plants *Braz. J. Plant Physiol.* 17:131-136.

Bernard, A., y Lauwerys, R. 1984. Cadmium in human population. *Experientia* 40 (2):143–152.

Boudou, A., Maury-Brachet, R., Coquery, M., Durrieu, G., y Cossa, D. 2005. Synergic Effect of Gold Mining and Damming on Mercury Contamination in Fish. *Environ. Sci. Technol.* 39:2448-2454.

Bridges, C., y Zalups, K. 2005. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicology and applied pharmacology.* 204(3):274-308.

Bruggeman, I., Temmink, J., y Bladeren, V. 1992. Effect of glutathione and cysteine on apical and basolateral uptake and toxicity of CdCl₂ in kidney cells (LLC-PK1), *Toxicology In Vitro.* 6:195–200.

Caballero, G., y Patiño, A. 2007. Evaluación de la actividad protectora de aceites esenciales de la flora colombiana contra los efectos genotóxicos del cadmio Sobre raíces de *Allium cepa*. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Farmacéuticas. Universidad de Cartagena.

Calow, P. 1993. Handbook of ecotoxicology. Blackwell Science Ltd., London, England. Vol. I. 478 p.

Cano, M., Peña, J., y González, H. 2002. Alteraciones de los índices de fases y mitótico en meristemos de *allium cepa*, inducidas por extractos de *lepidium meyenii walp* “maca”. *Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Ricardo Palma.* 3(1):21-22.

Cápiro, N., Sánchez, A., Fonseca, G., Baluja, L., Borges, E. 2001. Capacidad protectora de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. Ante el daño genético inducido por estrés oxidativo. *Rev. Cubana. Invest. Bioméd.* 20(1):34-37.

Cardellá, R. 2000. Componentes celulares y genética molecular. In: Bioquímica médica. La Habana: *Editorial de Ciencia y Técnica*. 549 – 557.

Carnesecchi, S., Schneider, Y., Ceraline, J., Durantón, B., Gosse, F., Seiler, N., y Raul, F. 2001. Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298:197-200.

Carrascal, M., Cano, M., Ramos, V., y Arenas, C. 2005. Contenidos en As, Cd, Pb, Cu y Zn en músculo e hígado de liebres (*Lepus europaea*) capturadas en el corredor verde del guardiamar. *Revista de Toxicología.* 22(1):19-25.

CETESB. 1991. Bioensaios Microbianos Aplicados no Controle de Contaminantes Tóxicos Ambientais; Serie Didáctica, *PROCOP*. 1-75 p.

Chakravarty, B., y Srivastava, S. 1992. Toxicity of some heavy metals in vivo and in vitro in *Helianthus annuus*. - *Mutat. Res.* 283: 287-294.

Chander, J., Maini, S., Subramanyan, S., y Handa, A. 1996. Otomycosis a clinico-mycological study and efficacy of mercurochrome in its treatment. *Mycopathologica.* 135:9-12.

Cherian, M., Goyer, R., y Delaquerriere-Richardson, L. 1976. Cadmium–metallothionein-induced nephropathy, *Toxicology and Applied Pharmacology* 38 (2):399–408.

Choi, H., Song, S., Ukeda, H., y Sawamura, M. 2000. Radical-Scavenging activities of Citrus essential oils and their components: detection using 1, 1-diphenyl-2-picrylhidrazyl. *J. Agric. Food. Chem.* 48:4156-4161.

Clark, S., Perman, S., Sahin, M., Jenkins, G., y Elegbede, J. 2002. Antileukemia activity of perillyl alcohol (POH): uncoupling apoptosis from G0/G1 arrest suggests that the primary effect of POH on Bcr/Abl-transformed cells is to induce growth arrest. *Leukemia.* 16:213-22.

Clarkson, T. 2002. The three modern faces of mercury. *Environ. Health Persp.* 110 (Suppl. 1):11–23.181.

Das, P., Samantary, S., y Rout, G. 1997. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environ. Pollution.* 98:29-36.

Day, M., y Mc Andrew, T. 2003. The biology and host range of *Falconia intermedia* (Hemiptera: Miridae), a potential biological control agent for *Lantana camara* (Verbenaceae) in Australia. *Biocontrol Science and Technology.* 13:13-22.

De Lima, D., y Jordao, B. 2001. Evaluation of the genotoxic potential of municipal wastewater discharged into the Paraguay River during periods of flood and drought. *Environmental Toxicology.* 16(2):113-116.

Dewick, P. 1997. Medicinal Natural Products. John Wiley & Sons, West Sussex, UK

Dorian, C., Gattone, V., y. Klaasen, C.1992. Renal cadmium deposition and injury as a result of accumulation of cadmium–metallothionein (CdMT) by the proximal convoluted tubules — a light microscopic autoradiography study with ¹⁰⁹CdMT, *Toxicology and Applied Pharmacology* 114(2):173–181

Dovgaliuk, A., Kaliniak, T., y Blium, I. 2001. Cytogenetic effects of toxic metal salts on apical meristem cells of *Allium cepa* L. seed roots. *Toxicology Genetic*. 35(2):3-10.

Downs, S., Macleod, C., y Lester, J. 1998. Mercury in precipitation and its relation to bioaccumulation in fish: A literature review. *Water, Air, Soil Pollut.* 108:149-187.

Dudley, R., Svoboda, D., y Klaassen, C. 1984. Time course of cadmium-induced ultrastructural changes in rat liver. *Toxicology and Applied Pharmacology* 76 (1):150–160.

Durán, H., y Espitia, J. 2009. Screening preliminar fitoquímico y estudio biológico del extracto etanólico del epicarpio de *Crescencia cujete* L. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Farmacéuticas. Universidad de Cartagena.

Elinder y Kjellstrom. 1986. Carcinogenic and mutagenic effects. of Cadmium *A Toxicological and Epidemiological Appraisal*, CRC Press, Boca Raton, FL. 205–229 p.

Evseeva, T., Geras, S., y Shuktomova, I. 2003. Genotoxicity and toxicity assay of water sample from a radium production industry storage cell territory by means of *Allium cepa*. *Journal of Environmental Radioactivity*. 68:235-248.

Fang, C., Wang, Y., Jiang, S., y Zhu, H. 2001. Study on the genotoxicity of dibromoacetic acid in drinking water. *Mutagenicity Research*. 30(5):266-269.

Fassett, D. 1975. Cadmium: biological effects and occurrence in the environment. *Annual Review of Pharmacology*. 15:425-435.

Fergusson, J. 1990. The heavy elements: Chemistry, environmental impact, and health effects. Pergamon Press. New Cork. 614 p.

Fernández, M., Lozada, J., García, L., y Caba, M. 2005. La cebolla: entre la comida mexicana y ¿La talidomida ? *La Ciencia y el Hombre*. 18(3).

Ferrer, 2003. Intoxicación por metales. *ANALES*. Sis San Navarra, 26(1):141-153.

Fiskesjö, G. 1985. The *Allium* test as standard in environmental monitoring. *Hereditas*. 102:99-112.

Fiskesjö, G., 1997, "Allium Test for Screening Chemicals; Evaluation of Cytological Parameters", in: *Plants for Environmental Studies*, Wancheng, W.; J. W. Gorsuch, J. S. Hughes eds., CRC Press, Florida. 8-329 p.

Fitzgerald, W., y Clarson, T. 1991. Mercury and monomethylmercury-present and future concerns. *Environ Health Perspect*. 96:159-166.

Forget, G., Ganon, P., Sánchez, W., y Dutka, B. 2000. Overview of methods and results of the eight country International Development Research Center (IDRC) *WaterTox* project. *Environm Toxicol.* 15:264-276.

Fortunato, R., Crespo, J., y Reis, M. 2005. Biodegradation of thimerosal containing effluents by a mercury resistant *pseudomonas putida* strain. *Water. Res.* 39:3511–3522.

Foulkes, E.1978. Renal tubular transport of cadmium–metallothionein, *Toxicology and Applied Pharmacology.* 45: 505–512.

Foulkes, E., y Blanck, S. 1990. Acute cadmium uptake by rabbit kidneys: mechanism and effects. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 102(3):464–473.

Foz, A., Roy, C., Jurado, J., Arteaga, E., Ruiz, J., y Moragas, A. 1978. *Mycobacterium chelonae* iatrogenic infections. *J Clin Microbiol.* 7:319-321.

Fuhr, B., y Rabenstein, D.1973. Nuclear magnetic resonance studies of the solution chemistry of metal complexes. IX. The binding of cadmium, zinc, lead, and mercury by glutathione, *Journal of the American Chemical Society.* 95(21): 6944–6950.

Fun, C., y Svendsen, A. 1990. The essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. *J. Essential Oil Res.* 2:265-7.

Fusconi, A., Repetto, O., Bona, E., Massa, N., Gallo, C., Dumas-Gaudot, E., y Berta, G. 2006. Effects of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. *Environ. Exp. Botany*. 58:253-260.

Galindo, P., Feo, F., García, R., Gómez, E., Borja, J., y Fernández, F. 1997. Mercurochrome allergy. Immediate and delayed hypersensitivity. *Allergy*. 52:1138-41.

García, B., García, G., Rojo, D., y Sánchez, G. 2001. Plantas con propiedades antioxidantes. *Rev. Cubana. Invest. Biomed.* 20(3):231-5.

Garbisu, C., y Alkorta, I. 2001. Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technology*. 77:229-236.

Gichner, T., Patková, Z., Száková, J., y Demnerová, K. 2004. Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutat. Res.* 559:49-57.

Goldman, L., y Shannon, M. 2001. American Academy of Pediatrics Committee on Environmental Health. Technical Report: Mercury in the Environment: *Implications for Pediatricians*. *Pediatrics*. 108:197-205.

Grassmann, J., Hippeli, S., Dornisch, K., Rohnert, U., Beuscher, N., y Elstner, E. 2000. Antioxidant properties of essential oils. Possible explanations for their anti-inflammatory effects. *Arzneimittelforschung*. 50:135-9.

Grayand, J., y Hines, M. 2006. Mercury Distribution, Transport y Geochemical and Microbial Transformations from Natural and Anthropogenic Sources. *Applied Geochemistru*. 21(11):1819-1820.

Grover, I., y Kaus. 1999. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the Allium root anaphase aberration and micronucleus assays. *Mutatgenecity Research*. 426(2):183-188.

Gustavson KE, Sonsthagen SA, Crunkilton RA, Harkin J. 2000. Groundwater toxicity assessment using bioassay, chemical, and toxicity identification evaluation analysis. *Environm Toxicol*. 15:421-430.

Hartwig, A. 1995. Current aspects in metal genotoxicity. *Biometals*. 8:3-11.

Hennebelle, T., Sahpaz, S., Joseph, H., y Bailleul, F. 2008. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. Review. *J. of Ethnopharm*. 116:211-222.

Heron, J., y Golding, J. 2004. "Thimerosal exposure in infants and developmental disorders: a prospective cohort study in the United Kingdom does not show a causal association. *Pediatrics*. 114:577-583.

Hobman, L., Essa, M., y Brown, L 2001. Mercury resistance (mer) operons in enterobacteria. *Biochem. Soc. Trans*. 30:719–722.

Iannacone, J., Alvarino, L., Caballero, C., y Sánchez, J. 2000. Cuatro ensayos ecotoxicológicos para evaluar lindano y clorpirifos. *Gayana*. 64:139-146.

IARC (Internationale Agency for Research on Cancer). 1993. Cadmium and cadmium compounds. Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 58:119–237.

INVIMA. 2006. Normas Farmacológicas. Numeral 13.1.6. Antisépticos y Desinfectantes. Ministerio de la Protección Social.

Jaffe, D., Prestbo, E., Swartzendruber, P., Weiss-Penzias, P., Kato, S, y Takami, A. 2005. Export of atmospheric mercury from Asia. *Atmos Environ.* 39:3029–38.

Jamall, I., y Smith, J. 1985. Effects of cadmium on glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and lipid peroxidation in the rat heart: a possible mechanism of cadmium cardiotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* .80(1):33–42.

Jarup, M., Berglund, M., Elinder, C., Nordberg, G., y Vahter, M. 1998. Health effects of cadmium exposure — a review of the literature and a risk estimate, *Scandinavian Journal of Work and Environmental Health* 24 (Suppl 1):1–51.

Jawetz, E., Melnick, J., y Adelberg, E. 1991. The growth, survival and death of microorganisms. In Brooks GF, Butel JS, Ornston LN, Jawetz E, Melnick JL.

Juozas, L., Jogaitė, V., y Naujalis, J. 2005. Genetic diversity in fragmented population of herb-Paris (*Paris quadrifolia* L., Trilliace). *BIOLOGIJA.* 2:5–12.

Kazantzis. G. 2002. Mercury exposure and early effects: an overview. *Med Lav.* 93(3):139-47.

Kishore K. 1999. Antiseptics and disinfectants. In Seth SD ed. Textbook of Pharmacology, 2nd edn. Chapt 11. New Delhi: Churchill Livingstone Pvt Ltd: 620-626 p.

Kopp, S. 1986. Cadmium and the cardiovascular system. In: Foulkes, E.C. (Ed.), Cadmium, Handbook Exp. *Pharmacol. Springer-Verlag.* New York,195–280 p.

Kotsonis, F., y Klaassen, C.1978. The relationship of metallothionein to the toxicity of cadmium after prolonged oral administration to rats, *Toxicology and Applied Pharmacology* 46 (1):39–54.

Laffon, B., Pérez, B., y Méndez, J. 2004. Influencia de determinados polimorfismos de enzimas metabólicas en la genotoxicidad del estireno. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 70:95-123.

Lamborg, C., Fitzgerald, W., O`Donell, J., y Torgersen, T. 2002. Anon steady state compartmentalvmodel of global scale mercury biogeochemistry with interhemispheric atmospheric grandients. *Geochim Cosmochim. Acta*:66:1105-1118.

Landis, W., y Yu, M. 1999. Environmental toxicology. Impacts of chemical upon ecological systems. Lewis. Nueva York. 390 p.

Lantry, L., Zhang, Z., Crist, K., Wahg, H., Zeeck, A., Lubet, R., y You, M. 2000. Chemopreventive efficacy of promising farnesyltransferase inhibitors. *Exp. Lung Res.* 26:773-90.

Lazutka, R., Stapuliontype, A., Bjerketvedt, D., y Odland, A. 2003. Seasonal variation in the frequency of abnormal anaphases and mitotic index values in wild populations of herb-Paris (*Paris quadrifolia* L., Trilliaceae): implications for genetic monitoring. *Mutation Research.* 534:113-122.

Lerda, D. 1992. The effect of lead on *Allium cepa* L. *Mutat. Res.* 281:89-92.

Liu, D., Zhai, L., Jiang, W., y Wang, W. 1995. Effects of Mg^{2+} , Co^{2+} , and Hg^{2+} on the nucleus and nucleolus in the root tip cells of *Allium cepa*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 55:779-787.

Liu, Y., Xu, H., Yang, S., Tay, J., 2003. A general model for biosorption of Cd, Cu, and Zn by aerobic granules. *Journal of Biotechnology.* 102:233-239

Lloyd, D., Purrot, R., Dolphing, G., Bolton, D., y Eddwards, A. 1975. The relationship between chromosome aberration and low LET radiation dose to human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 28:75-90.

Lluria, P., Morreale, J., Alberts, D., Kaper, F., Giaccia, A., y Powell, M. 2002. Effects of perillyl alcohol on melanoma in the Tprass mouse model. *Cáncer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11: 573-9.

Manenzhe, N., Potgieter, N., y Van T. 2004. Composition and antimicrobial activities of volatile components of *Lippia javanica*. *Phytochemistry*. 65:2333-2336.

Marcano, D., y Hasegawa, M. 2002. Fitoquímica orgánica. 2ª Edición. Torino. Venezuela. 237-290 p.

Marcano, L., Carruyo, I., Montiel, X., Bracho, M., y Soto. 1999. Valoración del efecto tóxico del cadmio en células meristemáticas de cebolla *Allium cepa*. *Rev Fac. Agron. (LUZ)*.16:476-487.

Matos, F., Machado, M., Craveiro, A., y Alentar, J. 1996. Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in northeast Brazil. *Journal of Essential Oil Research*. 8:695-698.

Mastrangelo, S., Tomassetti, M., Carratu, M., Evandri, M., y Bolle, P. 2006. Quercetin Reduces Chromosome Aberrations Induced by Atrazine in the *Allium cepa* Test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 47:254-259.

Mensinkai, S. 1939. Cytogenetic studies in the genus *Allium*. *J. Genet.*, 39: 1-45.

Metwally, A., Safronova, V., Belimov, A., y Dietz, K. 2005. Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L. *Journal of Experimental Botany* 56: 167–178.

Mimica, N., Bozin, B., Sokovic, M., Mihajlovic, B., y Matavulj, M. 2003. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Plant Med.* 69:413-419.

Mo, W., y Li, M. 1992. Effects of CdCl₂ on the growth and mitosis of root tip cell in *Vicia faba*. *Chin. Bull. Bot.* 9:30-34.

Montiel, X., Carruyo, I., Fernández, Y., Marcano, L., y Torrealba, Z. 2006. Valoración del efecto tóxico de pentóxido de vanadio en meristemos de cebolla (*Allium cepa* L.). *Ciencia.* 15:1.

Molero, T., Molina, J., y Casassa, A. Proceso mitótico en células radicales de *Psidium* spp. tolerantes, susceptibles y resistentes a *Meloidogyne incognita* en el estado Zulia, Venezuela. *Biologico.* 40(1).

Moriarty, F. 1999. Ecotoxicology. The study of pollutants in ecosystem. 2 edición. Academia press. New York.

Nascimento, G., Locatelli, J., Freitas, P., y Silva, G. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Journal of Microbiology.* 31:247-256.

Navas, A., Silbergeld, E., Sharrett, R., Calderon, E., Selvin, E., y Guallar, E. 2005. Metals in urine and peripheral arterial disease. *Environmental Health Perspectives.* 113(2):164–169.

Nolan, C., y Shaikh, Z. 1986. The vascular endothelium as a target tissue in acute cadmium toxicity. *Life Sciences*. 39(16):1403–1409.

Nordberg, G., Kjellstrom, T., y Elinder, C. 1986. Cadmium and Health: A Toxicological and Epidemiological Appraisal, CRC Press, Boca Raton, FL.103–178p.

Olivero, J., y Johnson, B. 2002. El Lado Gris de la Minería del Oro: La Contaminación con Mercurio en el Norte de Colombia. Universidad de Cartagena. Editora Alpha, Cartagena, Colombia.

Otaiza, G. 1999. Breve diccionario de plantas medicinales. Colección Quirón. Los libros de El Nacional; Caracas, Venezuela; 247 p.

Pal, R., y Nandi, S. 1990. Cytological abnormalities induced by mercury water pollutants on *Allium cepa*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 45:767-774.

Panda, B., y Panda, K. 2002. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 395–414p.

Paz, C. 2000. Monitoreo citogenético en población ecuatoriana expuesta ocupacionalmente a pesticidas. *Rev. Fac. Cs. Med.* 25(1):15.

Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., y Ignacimuthu, S. 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 6:39-46.

Pascal, M., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez, D., y Villar, A. 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J. Ethnopharm.* 76:201-214.

Pearson, C., y Prozialeck, W. 2001. E-cadherin, beta-catenin and cadmium carcinogenesis. *Medical Hypotheses.* 56 (5):573–581.

Pavlish, J. 2003. Status Review Of Mercury Control Options For Coal-Fired Power Plants. *Fuel Processing Technology.* 82:89-165.

Perrucci, S., Macchioni, G., Cioni, PL., Flamini, G., y Morelli, I. 1995. Structure/activity relationship of some natural monoterpenes as acaricides against *Psoroptes cuniculi*. *J. Nat. Prod.* 58:1261-4.

Pino, A., Ortega, L., Rosado, P., Rodríguez, J., y Baluja, R. 1997. Composición y propiedades antibacterianas del aceite del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Revista cubana de Farmacia.* 30(1).

Pinto, A., Mota, A., Varennes, A., y Pinto F. 2004. Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. *Sci. Tot. Environ.* 326:239-247.

Prasad, M. 2004. Heavy Metal Stress in Plants: From Biomolecules to Ecosystems, second ed. Springer-Verlag., Berlin-Heidelberg.

Rabenstein, D. 1989. Metal complexes of glutathione and their biological significance. In: D. Dolphin, O. Auromovie and R. Poulson, Editors, *Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects*, Wiley, New York. 147–186 p.

Ramírez, A. 2006. Biomarcadores en monitoreo de exposición a metales pesados en metalurgia. *An Fac Med Lima*. 67(1).

Rank, J., y Hviid, M. 1993. A modified Allium test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. *Hereditas*. 118:49-53.

Rank, J., Lopez, L., Nielsen, M., y Moretton, J. 2002. Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. *Hereditas*. 136:13–18.

Ratan, S., Sen, A., Ratan, J y Pandey, R. 2001. Mercurochrome as an adjunct to local preoperative preparation in children undergoing hypospadias repair. *BJU International*. 88(3):259-262.

Research Triangle Institute, NC, 1996.

Rodríguez, R. 2003. Contaminación de acuíferos. Apuntes del Curso de Calidad de Aguas Subterráneas y su Protección, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz. Bolivia.

Romero, M., Palma, J., Gómez, M., Del Ríó, L., y Sandalio, L. 2002. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant Cell Environ.* 25:677–686.

Ronco, A., Gagnon, P., Diaz, M., Arkhipchuk, V., Castillo G, y Castillo, L. 2002. Overview of results from the watertox intercalibration and environmental testing phase II program: P.1; Statistical analysis of blind simple testing. *Environm Toxicol.* 17:232-240.

Rosa, C., Sierra, M., y Radetski, C. 1999. Use of plant tests in the evaluation of textile effluent toxicity. *Ecotoxicol. Environ. Res.* 2:56-61.

Ruberto, G., y Baratta, M. 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *J Food chemistry.* 69:167-174.

Said, S., Ramos, M., Mata, B., Vargas, J., y Villarreal, L. 2005. In vitro antiprotozoal activity of the leaves of *Artemisia ludoviciana*. *Fitoterapia.* 76(5): 466-468.

Sanitá di Toppi L, y Gabbrielli R. 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.*41:105-130.

Satoh, H. 2000. Occupational and environmental toxicology of mercury and its compounds. *Ind Health.* 38(2):153-64.

Satre, C., y Breuil, A. 2007. Plantes, milieu et paysages des Antilles francaises. Ecologie, biologie, identification, protection et usages. *Biotope*, collection Parthénope, Meze.

Savenstrand, H., y Strid, A. 2004. Six genes strongly regulated by mercury in *Pisum sativum* roots. *Plant Phys. Biochem.* 42:135–142.

Sayyah, M., Valizadeh, J., y Kamalinejad, M. 2002. Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of *Laurus nobil* against pentylenetetrazole- and maximal electroshock-induced seizures. *Phytomedicine.* 9:212-6.

Schnitzler, P., Schon, K., y Reichling, J. 2001. Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus against herpes simplex virus in cell culture. *Pharmazie.* 56: 343-7.

Schulz, W. 2005. Molecular Biology of Human Cancers. Springer. ISBN 1 – 4020 3186-6 (e- book). 21-22.

Senatore, F., y Rigano, D. 2001. Essential oil of two *Lippia alba* spp. (Verbenaceae) growing wild in Guatemala. *Flavour and Fragrance Journal.* 16: 169-171.

Shanker, K., Mishra, S., Srivastava, S., Srivastava, R., Dass, S., Prakash, S., y Srivastava, M. 1996. Study of mercury-selenium (Hg-Se) interactions and their impact on Hg uptake by the radish (*Raphanus sativus*) plant. *Food Chem. Toxicol.* 34:883-886.

Sheu, G., y Mason, R. 2001. Speciation of atmospheric mercury in the marine boundary layer and its influence on the air-sea exchange of mercury. *Environ. Sci. Technol.* 35, 1209-1216.

Shi, W., y Gould, M. 2002. Induction of cytostasis in mammary carcinoma cells treated with the anticancer agent perillyl alcohol. *Carcinogenesis.* 23:131-42.

Slee, P., Ottolander, G., y Wolff, F. 1979. A case of merbromin intoxication possibly resulting in aplastic anemia. *Acta Med Scand.* 205: 463-469.

Singh, G., Rao, G., Kapoor, P., y Singh, O. 2000. Chemical constituents and antifungal activity of *Lippia alba* Mill. Leaf essential oil. *Journal of Medicinal and Aromatic Plants Sciences.* 22:701-703.

Squibb, K., Pritchard, J., y Fowler, B. 1984. Cadmium–metallothionein nephropathy: relationships between ultrastructural/biochemical alterations and intracellular cadmium binding, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 229(1): 311–321.

Stashenko, E., Jaramillo, B., y Martínez, J. 2003. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 27(105): 579-597.

Stashenko, E., Jaramillo, B., y Martínez, J. 2004. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*. 1025:93–103.

Stammati, A., Bonsi, P., Zucco, F., Moezelaar, R., Alakomi, H., y von Wright, A. 1999. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. *Food Chem. Toxicol.* 37:813-823.

Streets, D., Hao, J., Wu, Y., Jiang, J., Chan, M., y Tian, H. 2005. Anthropogenic mercury emissions in China. *Atmos Environ.* 39:7789–806.

Swierenga, S., Heddle, J., Sigal, E., Gilman, J., Brillinger, R., Douglas, y G., Nestmann, E. 1991. Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories. IV. Chromosome aberrations and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and human lymphocyte cultures. *Mutation Research*. 246:301–322.

Tafurt, G., Martínez, J., y Stashenko, E. 2005. Evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales en emulsiones degradadas por radiación ultravioleta. *Rev. Colomb. Quim.* 34:1.

Tripathi, A., Prajapati, V., Verma, N., Bahl, J., Bansal, R., Khanuja, S., y Kumar, S. 2002. Bioactivities of the leaf essential oil of *Curcuma longa* (var. ch-66) on three species of stored-product beetles (Coleoptera). *J. Econ. Entomol.* 95:183-9.

Trisak, S., Doumgdee, P., y Rode, B.1990. Binding of zinc and cadmium to human serum albumin, *International Journal of Biochemistry* 22(9):977–981.

Turkoglu, S. 2008. Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Food and chemical Toxicology*. 46:2035-2041.

Ullrich, S., Tanton, T., y Abdrashitova, S. 2001. Mercury in the aquatic environment: A review of factors affecting methylation, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 31:241–293.

Valverde, M., Trejo, C., y Rojas, E. 2001. Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA–metal interaction?. *Mutagenesis*.16:265–270.

Varoni, M., Palomba, D., Gianorso, S., y Anania, V. 2003. Cadmium as an environmental Factor of hypertension in animals: new perspectives on mechanisms. *Veterinary Research Communications*. 27(1):807-810.

Venegas, W., Poblete, S., Weigert, G., Márquez, C., Martínez, V., y Marcos, R. 2002. Seminario Internacional Contaminación Ambiental en Chile. Efectos Tóxicos y Genotóxicos de Agentes Químicos y Físicos. Universidad de Concepción.

Viana, G., Vale, T., Silva, C., y Matos, F. 2000. Anticonvulsant activity of essential oils and active principles from chemotypes of *Lippia alba* (MILL.) Ne Brown. *Biol Pharm Bull*. 23:1314-1317.

Von Rosen, G. 1957. Mutations induced by the action of metal ions in *Pisum*. *Hereditas*. 43:644-664.

Voutsinas, G., Zaran., F., y Kappas, A. 1997. The effect of environmental aneuploidy-inducing agents on the microtubule architecture of mitotic meristematic root cells in *Hordeum vulgare* *Cell Biol Int*. 21(7):411-8.

Waalkes, M. 2003. Cadmium carcinogenesis. *Mutat. Res*. 533:107–120.

Wang, W. 1991. Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water Air Soil Pollut*. 59:381-400.

Webb, M. 1986. Role of metallothionein in cadmium metabolism. In: E.C. Foulkes, Editor, *Cadmium, Handbook Exp. Pharmacology*, Springer-Verlag, New York. 281–337p.

Wendroff, A. 1990. Domestic mercury pollution. *Nature*. 347:623 p.

WHO. 1990. Methylmercury, environmental Health Criteria 101. World Health Organization. Genva, Switzerland.

Wojcik, M., y Tukendorf A. 1999. Cd-tolerance of maize, rye and wheat seedlings *Acta physiol. plant*. 21(2):99–107.

Wong, M. 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere*. 6:775-780.

Yeh, T., Pildes, R., y Firor, H. (1978). Mercury poisoning from mercurochrome therapy of an infected omphaloceles. *Clin Toxicol.* 113: 463-469.

Yi, H., Wu, L., y Jiang, L. 2007. Genotoxicity of arsenic evaluated by Allium-root micronucleus assay. *Science of the Total Environment.* 383:232-236.

Zalups, R., y Ahmad, S. 2003. Handling of the Homocysteine S-Conjugate of Methylmercury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14(12): 3147 – 3154.

Zambrano, B. 2004. Consideraciones generales sobre el mercurio, el timerosal y su uso en vacunas pediátricas. *Rev. Med. Uruguay.* 20:4-11.

Zhang, L., y Wong, M. 2007. Review Article Environmental mercury contamination in China: Sources and impacts. *Environment International.* 33:108–121.

Zhang, Y., y Xiao, H. 1998. Antagonistic effect of calcium, zinc and selenium against cadmium induced chromosomal aberrations and micronuclei in root cells of *Hordeum vulgare*. *Mutat Res.* 420(1-3):1-6.

Zhang, Y., y Yang, X. 1994. The toxic effects of cadmium on cell division and chromosomal morphology of *hordeum vulgare*. *Mutation Res.* 312:121-126.

Zoghlami-Boulila, L., Djebali, W., Chaib, W., y Ghorbel, M. 2006. Modification physiologiques et structurales induites par l'interaction cadmium-calcium chez la tomate (*Lycopersicon esculentum*). *C.R Biologies.* 329: 702-71