

EFFECTO DEL SULFITO DE SODIO EN LA MUTAGENICIDAD DEL CAFÉ EN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

EFFECT OF SODIUM SULFITE ON THE MUTAGENICITY OF COFFEE IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Piedad Lopera P.*
Margarita Zuleta B.**

Palabras claves: aditivos, mezclas complejas, mutación somática, mutagénesis *in vivo*, toxicidad del café.

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la mutagenicidad del café "instantáneo", del bisulfito de sodio y de la mezcla de estos dos compuestos utilizando el test de Mutación y Recombinación Somática en *Drosophila melanogaster* en la progeñe del cruce de las cepas $w^{co} sn^2$; se $h \times w$; se h .

Las dosis de café "instantáneo" utilizadas fueron 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.5, 1 y 2% (p/v). Sólo se observó efecto mutagénico en esta última dosis, que además mostró ser altamente tóxica. De las dosis de bisulfito utilizadas (0.25, 0.5, 1.5 y 10 mM), sólo las tres últimas resultaron mutagénicas. También pudo apreciarse claramente, que en mezclas de bisulfito de sodio (1 mM y 5 mM), con concentraciones no mutagénicas de café "instantáneo" (0.05%, 0.1% y 0.5%), el bisulfito pierde su efecto mutagénico y tanto el café como el bisulfito disminuyen su toxicidad, de acuerdo con la cantidad de bisulfito que es agregada al café. De esto puede deducirse que el bisulfito reacciona con algunas de las partículas tóxicas que contiene el café, disminuyéndose por tanto el efecto genotóxico de ambos compuestos.

ABSTRACT

In this work, the mutagenicity of "instant" coffee, sodium bisulfite and the mixture of both compounds was evaluated using the Mutation and Somatic Recombination test in *Drosophila melanogaster*, in the progenie from the cross $w^{co} sn^2$; se $h \times w$; se h .

The coffee doses employed were 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.5, 1 and 2% (w/v). A mutagenic effect was observed only with the highest, which happened to be highly toxic. Among the bisulphite doses utilized (0.25, 0.5, 1.5 and 10 mM) only the last three turn out to be mutagenic. Furthermore, in this test it was clearly observed that mixtures of sodium bisulphite (1 mM and 5 mM) with non mutagenic concentrations of instant coffee (0.05, 0.1 and 0.5%), the bisulphite loses its mutagenic effect and both coffee and bisulphite showed diminished toxicity depending up on the amount of bisulphite added to the coffee. From these results it can be deduced that bisulphite reacts with some toxic particles contained in coffee and, therefore, the genotoxic effect of both compounds decreases.

INTRODUCCION

La mayoría de los alimentos que consumimos contienen diferentes compuestos químicos, algunos de los cuales poseen actividad mutagénica, antimutagénica o comutagénica y producen genotoxinas por medio de diferentes factores, tales como su proceso de producción, el almacenamiento, el uso de aditivos y la contaminación.

Varios investigadores han demostrado la mutagenicidad del café por medio del test de Ames en varias cepas

de *Salmonella typhimurium*, sin activación metabólica (Nagao et al., 1979; Aeschbacher y Wurznher, 1980; Kosugi et al., 1983; Nakasato et al., 1984; Friederich et al., 1975). En esta mutagenicidad está involucrado el proceso de tostamiento de los granos (Kosugi et al., 1983), por medio del cual se forman varios mutágenos potentes como el benzo (a) pireno (IARC, 1973), el metilglioxal (Kasai et al., 1982; Sugimura y Sato, 1983; Fujita et al., 1985a; Sugimura et al., 1989) y el peróxido de hidrógeno (Levin et al., 1982; Fujita et al., 1985b). Se adiciona a este efecto el ocasionado por el sobrecalentamiento de

* Profesora, Depto de Química, Univ. de Antioquia, Apartado 1226, Medellín, Colombia.

** Profesora, Depto de Biología, Univ. de Antioquia, Apartado 1226, Medellín, Colombia.

la bebida ya preparada, lo que sin duda incrementa la mutagenicidad, ya que pueden formarse algunos pirolisados mutagénicos (Blair y Shibamoto, 1984) o aumentarse la concentración del peróxido de hidrógeno. Esto fue puesto en evidencia por Fujita *et al.*, (1985a) al encontrar que la solución fresca de café "instantáneo" (15 mg/ml) sólo contenía 3.5 ppm de peróxido de hidrógeno, pero después de guardar la bebida durante 24 h a 37°C, la concentración del peróxido aumentó a 5.0 ppm.

Se ha demostrado además que la mutagenicidad del café depende de la interacción con otros compuestos. Una muestra de esto se tiene en el efecto incrementador de la mutagenicidad que ejercen el ácido L-ascórbico (Suwa *et al.*, 1982) y la enzima superóxido dismutasa (Nagao *et al.*, 1986a) en sistemas bacterianos, *in vivo*. Pero también se ha observado que otros compuestos ejercen un efecto supresor de la mutagenicidad como en el caso de la catalasa contenida en la fracción citosólica de los hepatocitos de rata (Nagao *et al.*, 1979; Fujita *et al.*, 1985a; Ariza *et al.*, 1988). Y algunos sulfitos (sulfito y bisulfito de sodio y metabisulfito de potasio) también suprimen la acción mutagénica del café, según análisis realizados en *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* (Sugimura, 1982; y Suwa *et al.*, 1982; Nagao y Sugimura, 1983).

Existe evidencia de que el sulfito puro tiene efectos mutagénicos sobre el DNA *in vivo*, los cuales varían según las condiciones de concentración, pH y temperatura: a pH bajo, 37°C y altas concentraciones, produce deaminación de la citosina; a pH neutro, 30°C y altas concentraciones, produce transaminación de la citosina, lo que puede resultar en ligamientos cruzados; a pH neutro, 37°C y bajas concentraciones, produce radicales libres (Hayatsu, 1976; Shapiro, 1977). Se ha visto también que puede interactuar con el benzo (a) pireno (Laskin *et al.*, 1976; Pauluhn *et al.*, 1985) y el dibenzo (a, h) antraceno (Pott y Stober, 1983) incrementado la incidencia de tumores pulmonares en ratas (Leung *et al.*, 1989). Estos hidrocarburos policíclicos aromáticos ingresan al organismo, junto con los sulfitos, por medio de la inhalación o por la ingestión de alimentos y bebidas expuestos a altas temperaturas (Leung *et al.*, 1989).

Como se sospecha que los mutágenos son carcinógenos y se observa un alto consumo, consciente e inconsciente, de café y sulfitos, es importante conocer si el bisulfito de sodio es mutagénico *in vivo* y descubrir si la interacción que este compuesto presenta con el café, *in vitro*, ocurre también *in vivo*. Con este fin, en el presente trabajo se estudió la influencia *in vivo* de este sulfito en la mutagenicidad del café en *Drosophila melanogaster*.

MATERIALES Y METODOS

Cepas utilizadas

Se utilizaron hembras de la cepa $w^{co} sn^2$; se *h* y machos de la cepa *w*; se *h* de *Drosophila melanogaster* proporcionados por el doctor Ekkehart W. Vogel de la State University of Leiden (The Netherlands). En la tabla 1 se describen las marcas de cada cepa. Las cepas se mantuvieron a 25°C en alimento preparado con harina de maíz y miel de azúcar.

Compuestos químicos

Se utilizó sulfito de sodio en la forma de metabisulfito de sodio obtenido de Carlo Erba, metilglioxal de Sigma, café "instantáneo" de la firma Nestlé (R) y peróxido de hidrógeno (agua oxigenada), adquiridos los dos últimos en un supermercado de Medellín. Se utilizó también tween 80 de Merck y etanol de la Fábrica de Licores de Antioquia. Como control positivo se utilizó dimetil nitrosamina (DMNA) de Merck y como control positivo se utilizó dimetil nitrosamina (DMNA) de Merck y como control negativo agua destilada.

En la evaluación mutagénica se emplearon dosis de café de 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.5, 1 y 2% (p/v) y dosis de bisulfito de sodio de 0.25, 0.5, 1, 5 y 10 mM. La evaluación de las mezclas se hizo con dosis subtóxicas de café de 0.05, 0.1 y 0.5% que corresponden a LD₁₅, LD₂₅ y LD₃₅ respectivamente, y dosis tóxicas de bisulfito de 1 y 5 mM que corresponden a LD₂₅ y LD₅₅, respectivamente.

Prueba de mutagenicidad

En este trabajo se empleó el test de Mutación y Recombinación Somática en *Drosophila melanogaster* de acuerdo con el protocolo de trabajo diseñado por Becker (1966) y validado por Vogel (1985). El test se basa en la determinación de mosaicos observables por manchas gemelas en los ojos de las hembras que han sido tratadas durante el desarrollo larval (Mollet y Wurgler, 1974). Estos clones pueden surgir por varios tipos de alteración genética, como son el entrecruzamiento somático, la no disyunción somática, la pérdida cromosómica, la deleción y la mutación puntual.

Tratamiento

El alimento se suplementó con las sustancias químicas en estudio o el mutágeno y el solvente, utilizados como controles positivo y negativo, respectivamente. Primero los químicos se disolvieron en 3 ml de agua destilada y se adicionaron al alimento caliente a 50°C, agitando rápida-

mente para asegurar la homogeneidad de la mezcla. Se procedió luego a servir el alimento en los frascos de 1/4 de litro, previamente esterilizados y codificados y se dejó reposar por un tiempo máximo de 8 h, cubriendo los frascos con gasa estéril y tapándolos con tapones de gasa y algodón estériles. Por último se introdujeron los cruces (10 machos y 10 hembras vírgenes de tres días de edad, los cuales permanecieron durante 10 h en alimento no tratado). Se permitió que las hembras pusieran sus huevos durante cuatro días en el alimento tratado, al cabo de los cuales se retiraron ambos padres.

Los cultivos se incubaron a $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ durante 10-12 días. A las hembras F_1 con edad entre dos y tres días se les examinó los ojos para buscar la presencia de mosaicos simples (clones blancos) producidos por mutación o delección en el gen w^+ o la presencia de mosaicos mellizos (coral-blanco) w^{co}/w causados por recombinación mitótica en el disco imaginal para ojos. El examen se realizó en una mezcla de etanol (90%), tween 80 (1%) y agua destilada (9%), en un estereomicroscopio con 75X de aumento.

Toxicidad

En el análisis de toxicidad se utilizó el mismo tipo de cruce y procedimiento de tratamiento usado en la prueba de mutagenicidad. Se probaron las siguientes dosis para el sulfito: 0.25, 0.5, 1, 5, 10, 20 y 40 mM; y para el café: 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 3.5 y 5% (p/v).

Para cada dosis se halló el porcentaje de sobrevivencia con base en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de sobrevivencia} = \frac{\text{Promedio de moscas } F_1 \text{ en tratamiento}}{\text{Promedio de moscas } F_1 \text{ en control}} \times 100$$

Análisis estadístico

El compuesto se consideró positivo cuando el total de mosaicos simples más mosaicos mellizos se elevó por encima del 99% de los límites de confianza en relación con los valores acumulados del control. Se consideró no mutagénico después de haber examinado más de 2000 ojos (equivalentes a 40.000-400.000 células pigmentadas primordiales) y que los resultados dieran negativos por lo menos en tres experimentos separados.

Los resultados se catalogaron como mutagénicos débiles cuando se observaron pequeños efectos, pero que fueran reproducibles en por lo menos tres experimentos separados.

Para la evaluación estadística de los datos se aplicó la prueba de Ji-cuadrado, usando tablas de contingencia de 2x2.

RESULTADOS

Toxicidad del café y del bisulfito de sodio

Como puede observarse en las figuras 1 y 2, la sobrevivencia de larvas y moscas adultas disminuye con el aumento de la concentración de los tratamientos, tanto de café como de bisulfito. En la curva A se aprecia que a partir de la concentración de 0.05% de café, se produce una drástica disminución de la sobrevivencia. Por ejemplo, con concentraciones de 2% de café, sólo sobrevive el 15% de individuos, y con concentraciones de 3.5% o mayores, el café es completamente tóxico.

En la curva B puede observarse que con concentraciones tan bajas como 1 mM de bisulfito de sodio, sólo sobrevive el 75%, y con concentraciones de 5 mM se estima una sobrevivencia aproximada al 45%, en tanto que de 20 mM en adelante el bisulfito es completamente tóxico.

Como se observa en la curva A, la toxicidad producida por la mezcla de café y bisulfito de sodio disminuye o aumenta según la concentración de bisulfito utilizada. Por ejemplo, el café solo, en concentraciones de 0.05%, 0.1% y 0.5% produce sobrevivencias de 85%, 75% y 65%, respectivamente; en cambio, cuando estas mismas dosis están mezcladas con 1 mM de bisulfito, se obtienen sobrevivencias mayores, tales como 92%, 85% y 70%, respectivamente. Pero si el café se mezcla con 5 mM de bisulfito, se observa que la toxicidad aumenta en relación con la producida por el café solo, ya que se obtienen sobrevivencias de 76%, 62% y 53%, respectivamente. En la curva B y en la figura 2, se ve claramente que cuando el bisulfito de sodio se mezcla con diferentes concentraciones de café su toxicidad tiende a disminuir a medida que se mezcla con menor concentración de café. Por ejemplo, se observa que la sobrevivencia producida por 1 mM de bisulfito, aumenta en 11% cuando se mezcla con 0.1% de café y en 18% cuando se mezcla con 0.05% de café. Así mismo, la sobrevivencia obtenida con 5 mM de bisulfito aumenta en 18% cuando se mezcla con 0.1% de café y en 32% cuando se mezcla con 0.05% de café.

El efecto tóxico del café y del bisulfito de sodio se manifestó también con una tardanza de cerca de dos días en el desarrollo embrionario, en comparación con el control.

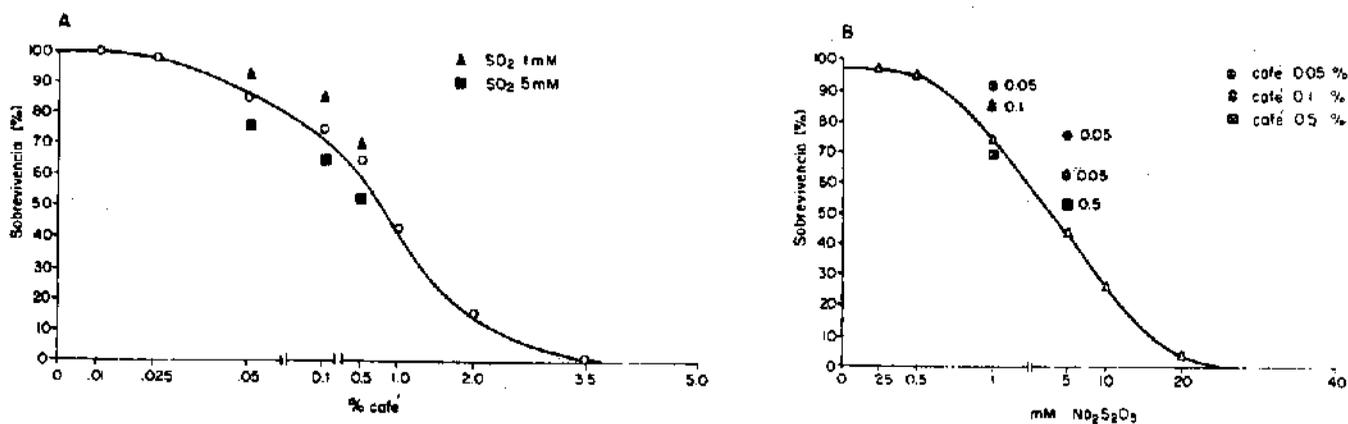


Fig. 1. Porcentaje de sobrevivencia de *Drosophila melanogaster* (hembra w^{ts}/w ; macho w/Y), nutrida desde el estado larval con alimento mezclado con diferentes concentraciones del tratamiento respectivo. En A se utilizó café instantáneo solo (○) y mezclado con bisulfito de sodio. En B se utilizó bisulfito de sodio solo (Δ) y mezclado con café instantáneo.

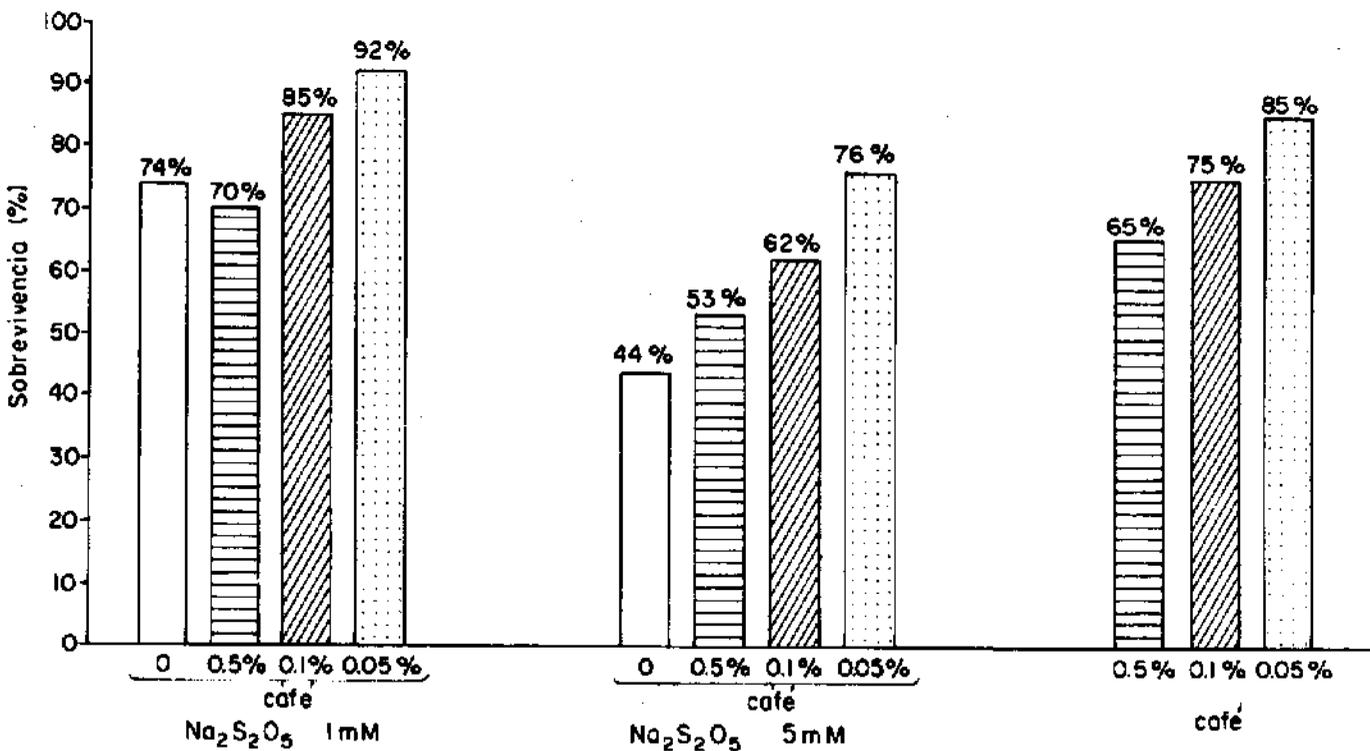


Fig. 2. Histograma de la sobrevivencia de *Drosophila melanogaster* tratada con café, bisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) y distintas mezclas de café y bisulfito de sodio.

Mutagenicidad del café, del bisulfito de sodio y de la mezcla de estos dos compuestos

Es interesante destacar que la frecuencia de mutación espontánea observada en los controles negativos (0.09% de manchas simples y 0.31% de manchas mellizas) es similar a la encontrada por Vogel (1984). Así mismo, los resultados obtenidos con el control positivo (DMNA) concuerdan con los resultados, también positivos, observados por Vogel, aunque no pueden compararse exactamente por haberse utilizado concentraciones mucho más pequeñas que las usadas por dicho autor.

En la figura 3 puede notarse que el café no indujo un aumento significativo de la mutagenicidad somática con ninguna de las concentraciones utilizadas, exceptuando la correspondiente a 2%, la cual aumentó la mutagenicidad a una frecuencia significativa; sin embargo, este dato no es confiable, ya que esta concentración reduce la viabilidad en un 85%, disminuyendo la muestra considerablemente.

En la figura 3 se ve que el bisulfito aumentó la mutagenicidad significativamente con las concentraciones de 1.5 y 10 mM. Esta última concentración posiblemente tenga una mayor potencialidad mutagénica que no puede ser recuperada por su alta toxicidad, que sólo permite una sobrevivencia del 26%.

En las figuras 3 y 4 se ve claramente que las concentraciones de bisulfito de sodio (1 y 5 mM) no aumentan significativamente la mutagenicidad somática en *Drosophila melanogaster* cuando se mezclan con 0.05%, 0.1% y 0.5% de café.

En este trabajo también se observó que el peróxido de hidrógeno, en concentraciones entre 25 mM y 5 mM, es altamente tóxico para las larvas y aún para las moscas adultas de *Drosophila melanogaster*.

El metilglioxal, en concentraciones de 0.5 y 0.25 ug/ml, es moderadamente tóxico; produjo sobrevivencias de 58 y 48%, respectivamente.

La mezcla de bisulfito de sodio 5 mM con 0.25 ug/ml de metilglioxal, no produjo ningún efecto mutagénico ni tóxico.

DISCUSION

Toxicidad del café "instantáneo"

La alta toxicidad en *Drosophila* producida por el café "instantáneo", especialmente en concentraciones mayores de 0.05%, podría atribuirse a la presencia de algunos compuestos dicarbonilos, tales como metilglioxal,

glioxal y diacetil, formados durante el tostamiento del café. La presencia de estos compuestos en el café procesado fue demostrada por Kasai et al. (1982), quienes observaron que el metilglioxal, el glioxal y el diacetil se encontraban tanto en los granos de café tostado como en el café "instantáneo", en concentraciones de 210, 915 y 80 ug/ml respectivamente.

La alta toxicidad del metilglioxal se hizo evidente en el presente trabajo, al tratar las larvas de *Drosophila* con concentraciones de metilglioxal de 0.05 ug por ml de alimento. En este caso la sobrevivencia disminuyó a un 58% y cuando se utilizaron concentraciones de 0.25 ug/ml de alimento, la sobrevivencia fue sólo del 48%.

La toxicidad del café también podría atribuirse a las pequeñas trazas de peróxido de hidrógeno que pueden formarse durante la oxidación del café expuesto a temperaturas mayores de 30°C, aunque en el presente trabajo, posiblemente, no hubo la oportunidad de formarse cantidades significativas de H₂O₂, puesto que los tratamientos se hicieron con soluciones de café "instantáneo" fresco, a temperaturas ambientales.

Mutagenicidad del café "instantáneo"

El café "instantáneo", en dosis subtóxicas o no tóxicas inferiores a 1%, no produjo aumento significativo de la mutación puntual en *Drosophila*. En otras pruebas *in vivo* tampoco se ha encontrado actividad mutagénica del café. Por ejemplo, Aeschbacher y Wurznner (1980), utilizando la prueba del huésped intermediario, con *E. coli* como organismo indicador en ratones tratados oralmente con café, obtuvieron resultados negativos; este mismo autor (Aeschbacher) con Chappus (1981), tampoco encontró actividad mutagénica en la orina de consumidores de café. En cambio, *in vitro*, especialmente en pruebas bacterianas y en células pulmonares de hámster chino, las soluciones de café procesado sí han incluido efecto mutagénico, quizás por la presencia de peróxido de hidrógeno, ácido clorogénico, metilglioxal, glioxal y ácido cafeico, que son mutágenos conocidos (Nair y Sivetz, 1973; Clifford, 1975; Kisai et al., 1982; Nagao et al., 1984; Nakasato et al., 1984; Peinado et al., 1986; Ariza et al., 1988).

Una de las causas por las cuales en el presente trabajo no se observó efecto mutagénico del café, podría atribuirse a que las condiciones de pH y las bajas temperaturas utilizadas en el tratamiento con café, no fueron propicias para la formación de una cantidad suficiente de H₂O₂ capaz de inducir mutagenicidad en *Drosophila*, ya que se ha demostrado que para la formación de peróxido de hidrógeno en el café es necesario que éste sea

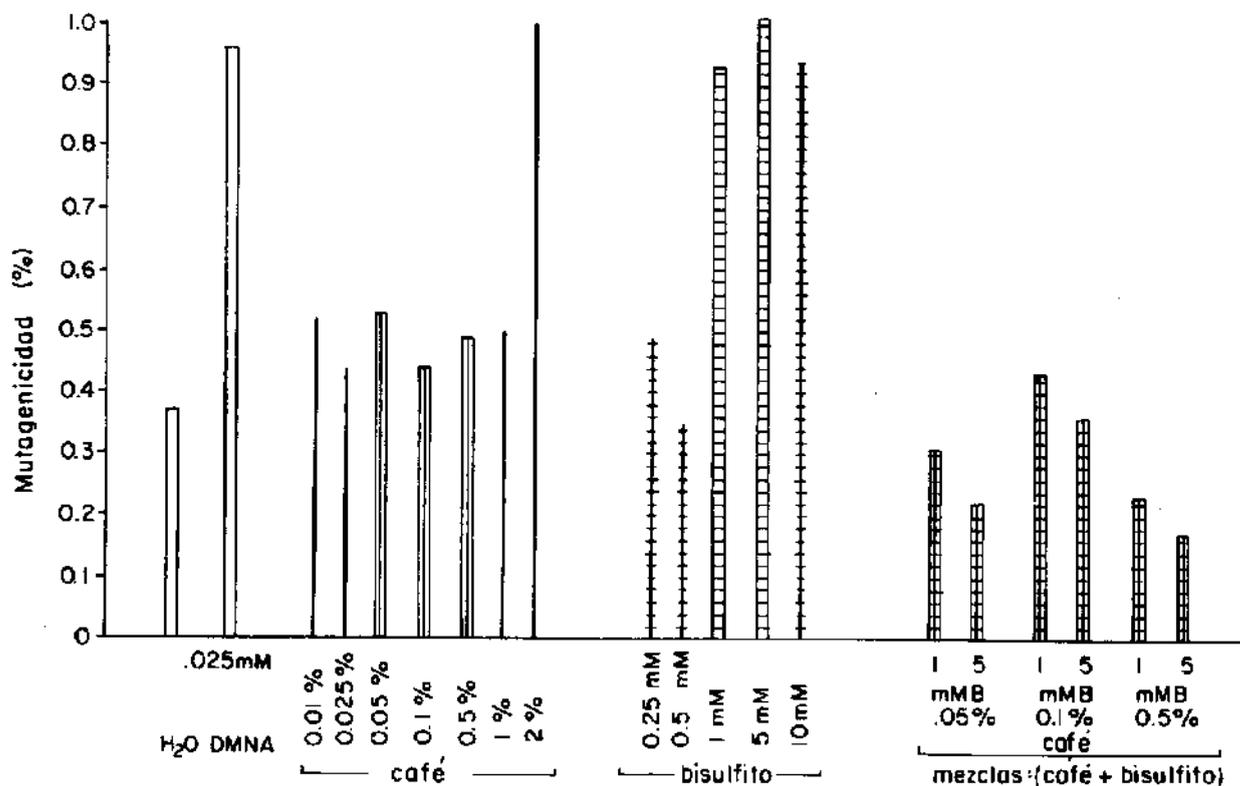


Fig. 3. Histogramas con porcentajes de mutagenicidad somática producida en *Drosophila melanogaster* (w^{co}/w) tratada con diferentes concentraciones de café (■), bisulfito de sodio (▨) y mezclas de tres concentraciones de café (0.05%, 0.10% y 0.50%) con dos concentraciones de bisulfito de sodio (1 mM y 5 mM) (▩).

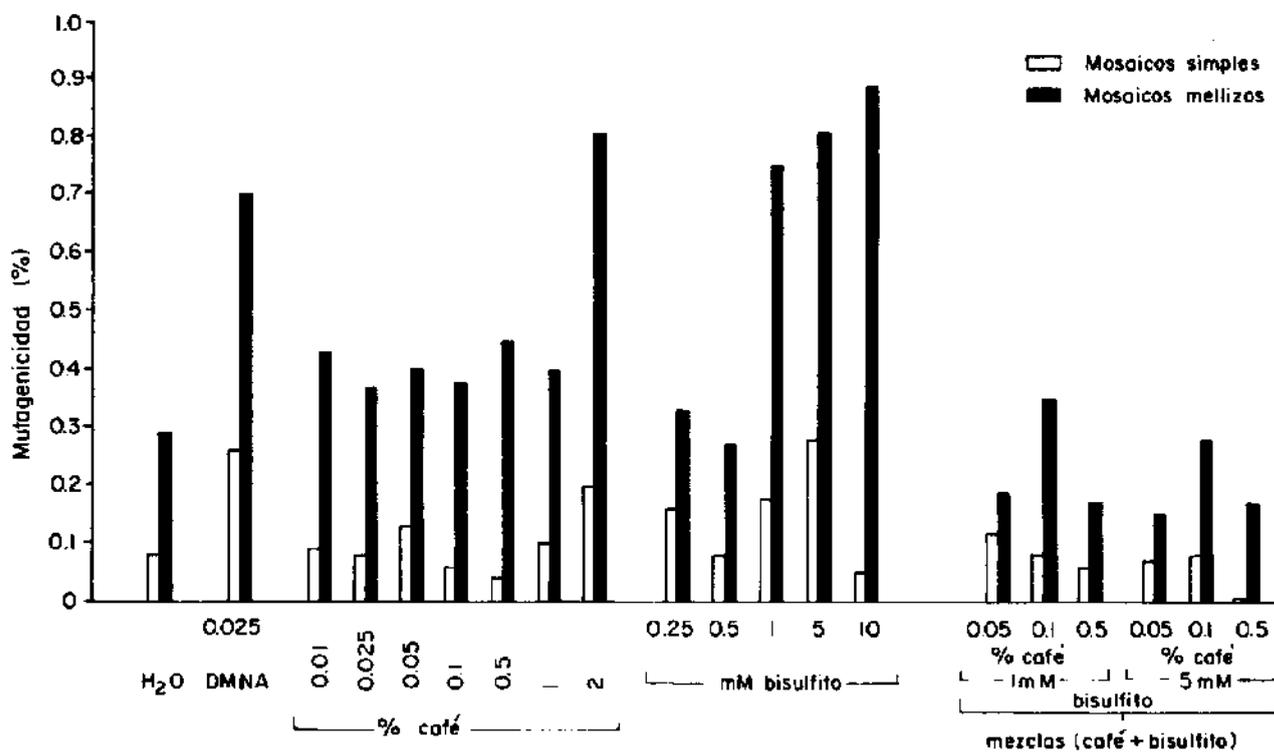


Fig. 4. Histogramas con porcentajes de mutagenicidad (mosaicos) producida en *Drosophila melanogaster* (w^{co}/w^M) tratada con diferentes concentraciones de café, bisulfito de sodio y mezclas de tres concentraciones de café (0.05%, 0.10% y 0.50%) con dos concentraciones de bisulfito de sodio (1 mM y 5 mM).

sometido a temperaturas mayores de 30°C al menos por 8 h, en un medio alcalino que permita la oxidación de polifenoles (como el ácido clorogénico) generalmente presentes en el café (Clifford, 1975; Fujita et al., 1985b, Ariza et al., 1988).

De igual forma, debe tenerse en cuenta que los sistemas enzimáticos como la catalasa, la monooxigenasa y el citocromo P-450, contenidos en los microsomas de *Drosophila* (Zijlstra, 1987), pudieron destruir las trazas de H₂O₂ que se hubiesen alcanzado a formar. Esto fue observado por Nagao et al. (1979), Fujita et al. (1985a) y Ariza et al. (1988), quienes demostraron que la mutagenicidad del café en *Salmonella typhimurium* es suprimida por la catalasa contenida en la fracción S-9 de hígado de rata parcialmente purificado.

Si no se produce H₂O₂, es posible que no se exprese la mutagenicidad de otros compuestos que pueden formarse en el café procesado, como es el metilglioxal, el cual sólo tiene actividad mutagénica significativa cuando está en presencia del H₂O₂ (Nagao et al., 1986b).

Debe tenerse en cuenta, además, que la cafeína impide que las enzimas microsomales como el citocromo P-450, conviertan en mutágenos activos algunos compuestos de mutagenicidad indirecta, tales como el benzo (a) pireno, el 3-amino-1-metil-5H-pirido (4,3-b) indol (Trp-P-2), el 2-amino-3,4-dimetilimidazo (4,5-f) quinolina (MeIQ) y el 2-amino-3,8-dimetilimidazo (4,5-f) quinoxalina (MeIQx), que se hayan podido formar durante el tostamiento del café (Aldrick y Rowland, 1988).

Es posible que estos mecanismos de protección contra la mutagenicidad del café *in vivo*, también funcionen en humanos. Otra forma de protección por la cual la mutagenicidad del café se puede suprimir *in vivo*, especialmente en mamíferos, se debe a que el café contiene palmitatos de kawool y cafestol que intensifican la actividad de la enzima glutatión transferasa (Lam et al., 1982; Wattenberg y Lam, 1984), aumentando por tanto la conjugación de los mutágenos presentes con el glutatión, lo que impide la expresión de su efecto mutagénico.

Probablemente los sistemas de protección sean la causa para observar tan marcada contradicción entre los resultados positivos *in vitro* y negativos *in vivo* y para no haber encontrado, por medio de estudios epidemiológicos, una relación definitiva entre consumo de café y cáncer (MacMahon et al., 1981; MacMahon y Sugimura, 1984; Woutersen et al., 1989).

Por otra parte, los mutágenos contenidos en el café son sustancias altamente tóxicas *in vivo*, cuyas dosis toleradas

por el organismo se encuentran en el orden de partes por millón (ppm). Cantidades tan pequeñas tienen poca probabilidad de aumentar significativamente la mutación para que sea observable en sistemas de prueba *in vivo*. Quizás esto también contribuya a que la mutagenicidad del café sólo haya sido detectada *in vitro*, con pruebas altamente sensibles, capaces de detectar tan pequeñas cantidades de mutágenos como ppb (partes por billón).

Debe tenerse en cuenta que aunque *in vivo* sea difícil detectar pequeña actividad mutagénica, estas pequeñas dosis pueden ser muy nocivas porque son las más apropiadas para fijar la mutación, ya que dosis muy altas generalmente matan la célula al interferir en sus funciones vitales. Por tanto, no es recomendable hablar de dosis permisibles en relación con el efecto mutagénico a largo plazo.

Toxicidad y efecto mutagénico del bisulfito de sodio y de la mezcla de bisulfito de sodio y café "Instantáneo"

El bisulfito incrementó significativamente la mutación y la recombinación somática a partir de las concentraciones de 1 mM y 5 mM. Quizás dichas concentraciones pueden inducir mayor mutagenicidad que la observada, pero el efecto mutagénico no logra recuperarse totalmente *in vivo*, debido a la toxicidad de estas concentraciones, que sólo permiten una sobrevivencia del 74% y el 44%, respectivamente. En concentraciones menores que 1 mM no se observó mutación, probablemente a causa de su fácil dispersión e incluso a su posibilidad de reaccionar con los diferentes componentes celulares, perdiéndose su actividad mutagénica antes de llegar al DNA.

Hasta el momento, sólo se ha reportado mutagenicidad del bisulfito en células procarióticas, en virus y en levaduras, *in vitro*: Mustafa y Collins (1969) y Mukai et al. (1970) con *E. coli*; Hayatsu y Miura (1970) en el bacteriófago lambda; Summers y Drake (1971) en el fago T₄; y Chambers et al. (1973) en levaduras. En cambio, en células eucarióticas *in vivo*, no se había encontrado ninguna mutagenicidad. Esto puede deberse a que el DNA está muy protegido en dichas células, haciéndose difícil así la interacción directa del bisulfito con el DNA, necesaria para inducir la mutación por deaminación y transaminación de la citosina, lesiones que según Shapiro y Weisgras (1970) y Hayatsu y Miura (1970), ocurren principalmente en condiciones ácidas. Posiblemente este mismo tipo de daño genético ocurrió en *Drosophila melanogaster*, ya que se trabajó en iguales condiciones de pH.

En este trabajo pudo apreciarse claramente que en mezclas de 1 mM y 5 mM de bisulfito de sodio, con concentraciones de café "instantáneo" de 0.05%, 0.1% y 0.5%, el bisulfito pierde su efecto mutagénico y tanto el café como el bisulfito disminuyen su toxicidad, de acuerdo con la cantidad de bisulfito que es agregado al café. De esto puede deducirse que el bisulfito, en concentraciones tan pequeñas como 1 mM, reacciona completamente con algunas de las partículas tóxicas que contiene el café (metilgloxal, glixal y diacetil); en cambio, cuando se utiliza una mayor concentración de bisulfito (5 mM), la cantidad de partículas tóxicas del café no es suficiente para reaccionar con todo el bisulfito y queda por tanto gran parte de éste libre, el cual seguirá ejerciendo su potencialidad tóxica. De allí que la mezcla de café con 5 mM de bisulfito sea más tóxica que con 1 mM de dicho compuesto. Con el fin de demostrar lo anterior se trató la drosófila con mezclas de 0.25 ug/ml de metilgloxal y 5 mM de bisulfito y se encontró que el subproducto formado no presentó actividad mutagénica ni tóxica. Otros investigadores (Suwa *et al.*, 1982 y Nagao *et al.*, 1984) también han demostrado que la actividad genotóxica del glixal, el diacetil y el metilgloxal es suprimida *in vitro* por medio del bisulfito y otros compuestos que contienen grupos SH, como la cisteína.

Por otro lado, aunque las mezclas de bisulfito con café presentan menor toxicidad que la producida por los dos compuestos separadamente, no la anulan completamente, lo que puede deberse a que no todos los tóxicos del café son neutralizados por el bisulfito.

CONCLUSIONES

Según lo anteriormente expuesto, nos aventuramos a concluir que aunque el café sea mutagénico *in vitro* y tóxico *in vivo*, al consumirlo en alto grado el organismo cuenta, en condiciones fisiológicas normales, con los mecanismos de protección necesarios para reducir y aun anular dichos efectos nocivos. Sin embargo, es de gran importancia estudiar con mayor profundidad el verdadero riesgo que representan los mutágenos formados durante el procesamiento del café; y aunque es conocido el efecto individual de algunos de ellos como sustancia pura, no se conoce su mecanismo de acción al actuar como integrantes de una mezcla compleja, que es la forma real como llegan al organismo. Además, debe tenerse en cuenta que el bisulfito de sodio, a pesar de su reconocida potencialidad mutagénica, al llegar al organismo mezclado con café, podría disminuir el efecto genotóxico de ambos compuestos.

LITERATURA CITADA

- Aeschbacher, H. U. and H. P. Wurzner. 1980. An evaluation of instant and regular coffee in the Ames mutagenicity test. *Toxicol. Lett.* 5:139-145.
- Aeschbacher, H. U. and C. Chappus. 1981. Nonmutagenicity of urine from coffee drinkers compared with that from cigarette smokers. *Mutat. Res.* 89:161-177.
- Aldrick, A. J. and I. R. Rowland. 1988. Caffeine inhibits hepatic microsomal activation of some dietary genotoxins. *Mutagenesis* 3(5):423-427.
- Ariza, R. R., G. Dorado, M. Barbancho and C. Pueyo. 1988. Study of the causes of direct-acting mutagenicity in coffee and tea using the Ara Test in *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.* 207:89-96.
- Becker, H. J. 1966. Genetic and variegation mosaics in the eye of *Drosophila*. *Curr. Topics Develop. Biol.* 7:155-171.
- Blair, C. A. and T. Shibamoto. 1984. Ames mutagenicity test of overheated brewed coffee. *Food Chem. Toxicol.* 22(12):971-975.
- Chambers, R. W., S. Y. Aguyagi, Y. Furukama, H. Zawadska and O. S. Bhanet. 1973. Inactivation of valine acceptor activity by acytosine into uracil missense change in the anticodon of yeast valine transfer RNA. *J. Biol. Chem.* 248: 5549-5551.
- Clifford, M. N. 1975. The composition of green and roasted coffee beans. *Process Biochem.* 10:13-16,19.
- Friederich, U., D. Hann, S. Albertini, Ch. Schlatter and F. E. Wurgler. 1985. Mutagenicity studies on coffee; the influence of different factors on the mutagenic activity in the *Salmonella/mammalian* microsome assay. *Mutat. Res.* 156: 39-52.
- Fujita, Y., K. Wakabayashi, M. Nagao and T. Sugimura. 1985a. Characteristics of mayor mutagenicity of instant coffee. *Mutat. Res.* 142:145-148.
- Fujita, Y., K. Wakabayashi, M. Nagao and T. Sugimura. 1985b. Implications of hydrogen peroxide in the mutagenicity of coffee. *Mutat. Res.* 144:227-230.
- Hayatsu, H. and A. Miura. 1970. The mutagenic action of sodium bisulfite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39(1):156-160.
- Hayatsu, H. 1976. Bisulfite modifications of nucleic acids and their constituents. *In: Cohn, W. E. (eds). Progress in nucleic acid research and molecular biology.* Academic Press, New York, Vol. 16, 75-124.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 1973. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* 48:637-643.
- Kasai, H., K. Kumeno, Z. Yamaizumi, S. Nishimura, M. Nagao, Y. Fujita, T. Sugimura, H. Nukaya and T. Kosuge. 1982. Mutagenicity of methylglyoxal in coffee. *Gann* 73:681-683.
- Kosugi, A., M. Nagao, Y. Suwa, K. Wakabayashi and T. Sugimura. 1983. Roasting coffee beans produces compounds that induce prophage in *E. coli* and *S.typhimurium*. *Mutat. Res.* 116:179-184.
- Lam, L. K. T., V. L. Sporn and L.W. Wattenberg. 1982. Isolation and identification of kahweol palmitate and cafestol palmitate as active constituents of green coffee beans that enhance glutathione S-transferase activity in the mouse. *Cancer Res.* 42:1193-1198.

- Laskin, S., M. Kuschner, A. Sellakumar, A. and G. V. Káts.: 1976. Combines carcinogen-irritant animal inhalation studies. In: Aharonson, E. F., A. Ben-David and M. A. Klingberg (eds). Air pollution and the lung. John Wiley and sons, New York, 190-213.
- Leung, K. H., D. A. Keller and D. B. Menzel. 1989. Effect of sulfite on the covalent reaction of benzo (a) pyrene metabolites with DNA. *Carcinogenesis* 10(2):259-264.
- Levin, D. E., M. Holstein, M. F. Christman, E. A. Schwiers, and B. N. Ames. 1982. A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A-T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc. Natl. Acad. USA.* 79:7445-7449.
- MacMahon, B., S. J. Yen, D. Trichopoulos, K. Warren and G. Nardi. 1981. Coffee and cancer of the pancreas. *N. Engl. J. Med.* 304:630-633.
- MacMahon, S. and T. Sugimura. 1984. Coffee and Health. Banbury Report No. 17. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 241-245.
- Mollet, P. and F. E. Wurgler. 1974. Detection of somatic recombination in *Drosophila*. A method for testing genetic activity of chemical compounds. *Mutat. Res.* 25:421-424.
- Mustafa, H. H. and E. Collins. 1969. Effects of selected food additives on growth of *Pseudomonas fragi*. *J. Dairy Sci.* 52(3):335-340.
- Mukai, F., I. Hawryluk and R. Shapiro. 1970. The mutagenic specificity of sodium bisulfite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39(5):983-988.
- Nagao, M., Y. Takahashi, H. Yamanaka and T. Sugimura. 1979. Mutagens in coffee and tea. *Mutat. Res.* 68:101-106.
- Nagao, M., and T. Sugimura. 1983. Suppression and enhancement of the mutagenicity of coffee. In: Stüch, H. F. (ed.). CRC Press. Carcinogens and mutagens in the environment. Vol. II. 101-106.
- Nagao, M., Y. Suwa, H. Yoshizumi and T. Sugimura. 1984. Mutagens in coffee. In: MacMahon, B. and T. Sugimura (eds). Coffee and Health. Banbury Report No. 17. Cold Spring Harbor Laboratory, 69-77.
- Nagao, M., Y. Fujita, K. Wakabayashi, H. Nukaya, T. Kosuge and T. Sugimura. 1986a. Mutagens in coffee and other beverages. *Environm. Health Perspect.* 67:89-91.
- Nagao, M., Y. Fujita and T. Sugimura. 1986b. Methylglyoxal in beverages and foods: Its mutagenicity and carcinogenicity. IARC Scientific Publication 70:283-291.
- Nagao, M., K. Wakabayashi, Y. Suwa and T. Kobayashi. 1986. Alteration of mutagenic potentials by peroxidase, catalase and superoxide dismutase. In: Delbert, M., P. E. Shankel, E. Hartman, K. Tsuneo and H. Alexander (eds).
- Nakasato, F., M. Nakayasu, Y. Fujita, M. Nagao, M. Terada and T. Sugimura. 1984. Mutagenicity of instant coffee to cultured chinese hamster lung cells. *Mutat. Res. Lett.* 141: 109-112.
- Nair, J. H. and M. Sivetz. 1983. Coffee and tea. In: Vann Arsdel W. B., M. J. Copley and A. I. Morgan Jr. (eds). Food Dehydration. 2nd ed. Vol. 2: Practices and applications, Avi, CT. 384-436.
- Pauluhn, J., J. Thyssen, J. Althoff, G. Kimmerle and U. Mohr. 1985. Long-term inhalation study with benzo (a) pyrene and SO₂ in Syrian golden hamsters. *Exp. Patol.* 28: 31.
- Peinado, J., F. Toribio and D. Pérez-Bendito. 1986. Fluorometric reaction rate method for determination of hydrogen peroxide at the nanomolar level. *Anal. Chem.* 58: 1752-1729.
- Pott, F. and W. Stober. 1983. Carcinogenicity of airborne combustion products observed in subcutaneous tissue and lungs of laboratory rodents. *Environm. Health Perspect.* 47:293-303.
- Shapiro, R. and J. M. Weisgras. 1970. Bisulfite-catalyzed transamination of cytosine and cytidine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40(4):839-843.
- Shapiro, R. 1977. Genetic effects of bisulfite (sulfur dioxide). *Mutat. Res.* 39:149-176.
- Sugimura, T. 1982. Mutagens in cooked food. In: Fleck, R.A. and A. Hollander (eds). Genetic toxicology: an agricultural perspective. Plenum Publishing Corp. New York. 243-269.
- Sugimura, T. and S. Sato. 1983. Mutagens-carcinogens in foods. *Cancer Res. (suppl).* 43:2415-2421.
- Sugimura, T., S. Sato, H. Ohgaki, S. Takayama, M. Nagao and K. Wakabayashi. 1989. Mutagens and carcinogens in cooked foods. In: Knudsen, I. (ed.). Alan R. Liss, Inc. Genetic toxicology of the diet, 85-107.
- Summers, C. A. and J. W. Drake. 1971. Bisulfite mutagenesis in bacteriophage T4. *Genetics* 63:603-609.
- Suma, Y., M. Nagao, A. Kosugi and T. Sugimura. 1982. Sulfite suppresses the mutagenic property of coffee. *Mutat. Res.* 102:383-391.
- Vogel, E. W. 1984. A comparison of genotoxic activity in somatic tissue and in germ cells of *Drosophila melanogaster*. In: Chu, E. Y. and C. C. Tan (eds). International workshop of the principles of mutagenesis, carcinogenesis and teratogenesis, 233-255.
- Vogel, E. W. 1985. The *Drosophila* Somatic Recombination and Mutation Assay (SRM) using the white-coral somatic eye color system. In: Ashby J. and F. J. de Serres (eds). *Progr. Mutat. Res.* Vol. 5.
- Watterberg, L. W. and L. K. T. Lam. 1984. Protective effects of coffee constituents on carcinogenesis in experimental animals. In: MacMahon, B. and T. Sugimura (eds). Coffee and Health, Banbury Report, No. 17, Cold Spring Harbor Laboratory, 137-145.
- Woutersen, R. A., A. Van Garceren-Hoetmer, J. Bax and E. Scherer. 1989. Modulation of dietary fat-promoted pancreatic carcinogenesis in rats and hamsters by chronic coffee ingestion. *Carcinogenesis* 10(2):311-316.
- Zijlstra, J. A. 1987. Pharmacological and mechanistic aspect of chemically induced mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. Thesis, State University of Leiden, The Netherlands.