

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL MUTAGÉNICO DE MATERIAL PARTICULADO
(MP) PRODUCTO DE LA COMBUSTIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES
ELABORADOS A PARTIR DE EXTRACTOS VEGETALES (JATROPHA Y
ACEITE DE PALMA) Y COMBUSTIBLE FOSIL (DIESEL) POR MEDIO DEL
TEST DE AMES EN LAS CEPAS TA98 Y TA100 DE *Salmonella typhimurium***

**ANGELA PATRICIA COLLAZOS VÉLEZ
DIANA CRISTINA CASTILLO TORRES**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
2016**

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL MUTAGÉNICO DE MATERIAL PARTICULADO
(MP) PRODUCTO DE LA COMBUSTIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES
ELABORADOS A PARTIR DE EXTRACTOS VEGETALES (JATROPHA Y
ACEITE DE PALMA) Y COMBUSTIBLE FOSIL (DIESEL) POR MEDIO DEL
TEST DE AMES EN LAS CEPAS TA98 Y TA100 DE *Salmonella typhimurium***

**ANGELA PATRICIA COLLAZOS VÉLEZ
DIANA CRISTINA CASTILLO TORRES**

**Tesis de Grado presentada como requisito parcial para optar por el Título de
Bióloga**

Director:

NOHELIA CAJAS SALAZAR, Ph.DM

Asesores:

**ISABEL CRISTINA ORTIZ TRUJILLO, Dra.
LUZ YANETH OROZCO, Dra.**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
2016**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Firma de director

Firma de jurado

Firma de jurado

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos de manera especial a cada una de las personas e instituciones que con su apoyo y dedicación permitieron el desarrollo de este trabajo y nos guiaron para culminar esta etapa de nuestras vidas. A la profesora Msc. Luz Yaneth Orozco y a la profesora D.Sc. Isabel Cristina Ortiz, gracias por su disposición, apoyo, asesoría y continua guía en el desarrollo de la investigación. Al grupo del laboratorio de Mutagénesis de la Universidad de Antioquia, en especial a Luisa Londoño, por su orientación y colaboración en el desarrollo experimental. También, a la Universidad de Antioquia y la Universidad Pontificia Bolivariana de Medellín por permitir el desarrollo experimental, en sus instalaciones. Agradecemos de manera especial a la profesora Ph.D Nohelia Cajas, por dirigir esta tesis, por la continua disponibilidad y apoyo durante el desarrollo de nuestro proyecto. A la profesora D.Sc. Luz Stella Hoyos, por su conocimiento, confianza y por orientarnos con la mejor disposición. A la Universidad del Cauca, a los docentes del programa de Biología, al grupo de Toxicología Genética y citogenética porque fueron parte fundamental en nuestra formación como profesionales y porque hicieron que cada semestre nos enamorarnos más de nuestra carrera. A nuestros compañeros de carrera por los momentos compartidos que dejaron una huella imborrable.

A Dios por la vida y por enseñarme que sus planes son los mejores, que todo llega cuando estamos preparados y en el momento preciso. A mis padres Martha y Rodrigo por todos los esfuerzos y sacrificios que hicieron para ayudarme a cumplir mis sueños, por ellos soy quien soy hoy, gracias por ser mi mejor ejemplo de trabajo, perseverancia y por haberme apoyado durante todos estos años con todo su amor. A mi hijo Juan Martin, que basto con verlo para llenarme de fuerzas y seguir adelante en esos momentos que pensé que no iba a ser capaz, gracias hijo por ser mi motivación para ser cada día la mejor. A mi hermana Carolina y mi gran amiga Martha quienes se convirtieron en mi apoyo, en mis cómplices durante todos estos años y con quienes comparto esta pasión por la vida. A mi compañero de viaje

Andrés quien con su amor, comprensión y compañía me animo a dar siempre más de lo que podía dar. A mi familia quienes estuvieron acompañando todo este proceso con esa unión que los caracteriza y con ese cariño sincero. Un agradecimiento especial, sincero y desde el alma a mi gran amiga Angela quien se convirtió en mi compañera de batalla todos estos años, solo las dos sabemos cuántos esfuerzos y sacrificios hicimos para poder culminar este sueño, gracias por todo el ánimo, cariño pero sobre todo por toda la ayuda que me brindaste todo este tiempo. Por todos ustedes fueron cada uno de mis esfuerzos.

Diana Castillo Torres

Gracias a Dios por cada una de las oportunidades y planes que pone en mi camino para ser cada vez mejor. Gracias a mis papás, Patricia y Rodrigo, por su amor, por apoyarme en cada uno de mis proyectos de vida, por sus sacrificios, consejos, por ser mí ejemplo de vida, gracias por enseñarme que siempre hay que volar alto y soñar en grande sin olvidar quienes somos. A mis hermanos Juliana y Jose, por ser mi compañía, mi apoyo, mi motor, por ser mi impulso para seguir siempre adelante, por ser mis cómplices en tantas cosas. A toda mi familia, por su apoyo, porque de una u otra manera son parte de esta meta, una más cumplida. A Martica, por su apoyo, complicidad y por su amistad incondicional a pesar de la distancia. A Diana Castillo, mi amiga y compañera de tesis, gracias por su amistad incondicional durante estos años, por todos los momentos compartidos que quedan para siempre, por todos sus consejos, por su apoyo y complicidad, gracias porque de ti también aprendí. A todos gracias, esto, es el resultado de esfuerzos, sueños y proyectos de los cuales ustedes son cómplices y hacen parte. También gracias al equipo administrativo de Unilingüa porque también fueron parte importante en mi formación como profesional y persona.

Angela Collazos Vélez

CONTENIDO

| | pág. |
|--|-----------|
| INTRODUCCIÓN..... | 11 |
| 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 13 |
| 2. JUSTIFICACIÓN..... | 15 |
| 3. MARCO TEÓRICO | 17 |
| 3.1. BIOCOMBUSTIBLES | 17 |
| 3.1.1. Proceso de obtención de los biocombustibles | 18 |
| 3.2. ACEITE DE PALMA | 19 |
| 3.3. ACEITE DE JATROPHA | 20 |
| 3.4. COMBUSTIBLES FOSILES..... | 21 |
| 3.4.1. Diésel | 22 |
| 3.5. MATERIAL PARTICULADO Y EL EFECTO EN LA SALUD..... | 23 |
| 3.6. BIOTRANSFORMACIÓN DE COMPUESTOS XENOBIÓTICOS..... | 25 |
| 3.7. ACTIVADOR METABOLICO | 26 |
| 3.8. GENOTOXICIDAD Y MUTACIÓN..... | 26 |
| 3.9. TEST DE AMES | 29 |
| 3.10. CARACTERISTICAS DE LAS CEPAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO..... | 31 |
| 4. ANTECEDENTES..... | 33 |
| 5. OBJETIVOS..... | 36 |
| 5.1. OBJETIVO GENERAL..... | 36 |
| 5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 36 |
| 6. MARCO METODOLÓGICO..... | 37 |
| 6.1. CONSERVACIÓN DE CEPAS DE <i>Salmonella typhimurium</i> | 37 |
| 6.2. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN MICROSOMAL S9 | 37 |
| 6.3. OBTENCIÓN DE MATERIAL PARTICULADO (MP)..... | 38 |
| 6.4. CHEQUEO DE MARCAS..... | 39 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 6.5. | DETERMINACIÓN DE LA DOSIS EXPERIMENTAL DE MP DE COMBUSTIBLE FÓSIL (DIÉSEL) Y BIOCOMBUSTIBLES (ACEITE DE PALMA Y ACEITE DE JATROPHA)..... | 41 |
| 6.6. | CONTROLES EMPLEADOS EN LA PRUEBA DE AMES | 42 |
| 6.7. | DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA PRUEBA DE AMES | 42 |
| 6.8. | TRATAMIENTO | 43 |
| 6.9. | INCORPORACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS (BACTERIAS, \pm S9, [] A LAS CAJAS DE PETRI | 43 |
| 6.10. | ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 46 |
| 7. | RESULTADOS | 47 |
| 8. | DISCUSIÓN | 54 |
| 9. | CONCLUSIONES | 59 |
| 10. | RECOMENDACIONES | 60 |
| 11. | BIBLIOGRAFÍA | 61 |

LISTA DE GRAFICOS

| | Pág. |
|---|-------------|
| Gráfica 1. Mapa mundial de exposición a material particulado MP10..... | 25 |
| Gráfica 2. Montaje por ensayo | 44 |
| Gráfica 3. Protocolo de establecimiento de cultivos para la prueba de mutagenicidad de Ames | 45 |
| Gráfica 4. Curva dosis- respuesta de MP de Diésel en la cepa TA98 con y sin S9 | 51 |
| Gráfica 5. Curva dosis- respuesta de MP de aceite de Palma en la cepa TA98 con y sin S9..... | 51 |
| Gráfica 6. Curva dosis-respuesta de MP de aceite de Jatropha en la cepa TA98 con y sin S9..... | 51 |
| Gráfica 7. Curva dosis- respuesta de MP de Diésel en la cepa TA100 con y sin S9 | 52 |
| Gráfica 8. Curva dosis-respuesta de MP de aceite de Palma en la cepa TA100 con y sin S9 | 52 |
| Gráfica 9. Curva dosis- respuesta de MP de aceite de Jatropha en la cepa Ta100 con y sin S9 | 52 |

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

| | Pág. |
|---|------|
| Fotografía 1. Requerimiento de histidina | 39 |
| Fotografía 2. Resultado de la mutación rfa | 40 |
| Fotografía 3. Confirmación de la mutación uvrB | 41 |
| Fotografía 4. Confirmación del factor R | 41 |
| Fotografía 5. Mutagenicidad inducida por MP en <i>Salmonella t.</i> | 49 |

RESUMEN

La contaminación atmosférica causada por fuentes móviles (tráfico rodado) y fuentes fijas de combustión (industrias, usos residenciales, climatización, y procesos de eliminación de residuos) son una de las principales causas de problemas en la salud ambiental y humana. El material particulado es un conjunto de partículas sólidas y líquidas emitidas directamente al aire que ha sido clasificado como un contaminante atmosférico tóxico cuya principal fuente en ciudades son los procesos de combustión y emisiones vehiculares. Por estas razones gobiernos de diferentes países han decidido explorar fuentes alternativas de energía como lo son los biocombustibles, su producción se ha ido incrementado notablemente a nivel mundial y al ser de origen vegetal se espera que disminuya el daño ambiental y los problemas de la salud asociados, debido a que diferentes estudios epidemiológicos sugieren que la polución del aire puede ser responsable del incremento del cáncer pulmonar.

El test de Ames es una prueba mutagénica que utiliza cepas de *Salmonella typhimurium* para de detectar compuestos que causan alteraciones génicas por corrimiento del cuadro de lectura (frameshift) o por sustitución de pares de bases del ADN. Para la detección de sustancias promutagénicas, se usa la fracción microsomal de hígado de rata S9, un sistema de activación metabólica, que permite la evaluación de metabolitos de la muestra problema. En el presente estudio se determinó el potencial mutagénico de material particulado (PM) generado por la combustión de dos biocombustibles elaborados a base de aceite de *Jatropha* y aceite de Palma Africana y del Diésel como combustible fósil. Para ello se evaluaron tres concentraciones diferentes de PM en las cepas TA98 y TA100. Los resultados de la investigación, reflejan una mayor sensibilidad de la cepa TA100 frente a la cepa TA98, demuestran que el PM de los combustibles a base de extractos vegetales como el combustible fósil, presentan toxicidad a diferentes concentraciones en ambas cepas y que el del Diésel y aceite de palma presentan actividad mutagénica significativa, principalmente por frameshift.

INTRODUCCIÓN

Los biocombustibles representan en la actualidad una fuente importante de energía renovable, siendo en teoría una alternativa viable para sustituir los combustibles fósiles y adicionalmente generar nuevos y grandes mercados para los productores agrícolas. En 2011 la producción mundial de biocombustibles llegó a 124.000 millones de litros, con un crecimiento de 130% con respecto a 2005. Los biocombustibles representan el 1.7% del consumo mundial de saldos energéticos, este valor podría incrementarse hasta 20% en el 2020 y aproximadamente el 3% del combustible es destinado para transporte. Colombia es el tercer país con mayor incorporación de biocombustibles para su desarrollo cotidiano después de Brasil y Argentina (García et al., 2012), debido a que posee las características geográficas y climáticas adecuadas para el desarrollo de una amplia variedad de cultivos utilizados como materias primas en la elaboración de biocombustibles (PROEXPORT, 2008; IEA, 2010; Felix, Cardona, & Quintero, 2010). Actualmente en el país se registra la producción de biocombustibles industrialmente en los departamentos del Cesar, Magdalena, Atlántico, Meta y Santander con una producción anual de 480 mil toneladas al año y para el 2016 se proyecta un crecimiento cercano al 5% para superar las 500 mil toneladas. En el país se cultivan unas 470 mil hectáreas de palma de aceite (Producción de biocombustibles en Colombia crecerá en 2014,) y aproximadamente 135,5 hectáreas de *Jatropha curcas L.*, las cuales se encuentran en los departamentos de Vichada, Choco, Santander, Cauca, Antioquia, Cesar y Nariño (Hidalgo et al., 2012).

Varios estudios sostienen que la producción de biocombustibles a partir de materias primas como el aceite de Palma y *Jatropha* garantizan una menor emisión de gases contaminantes al ambiente, sin embargo al igual que los combustibles fósiles, contribuyen de manera importante a la polución ambiental la cual es responsable de siete millones de muertes anuales según reporte de la OMS (Antonio & Arturo, 2007). La combustión incompleta de los biocombustibles al igual que la de los

combustibles fósiles, afecta la calidad de la salud de las personas expuestas crónicamente, depositándose en órganos respiratorios partículas con gran cantidad de compuestos químicos, los cuales son metabolizados y originan daño (Mendoza, Orozco et al. 2013).

Existe poca evidencia científica en cuanto al potencial mutagénico y mecanismo de acción de PM producto de la ignición de biocombustibles. En este estudio se evaluó la capacidad mutagénica de tres concentraciones diferentes (125, 62.5, 31,2ug/eq) del PM de biocombustibles a base de aceite de Palma, Jatropha y de Diésel como combustible fósil. De esta manera nuestro estudio contribuye a proporcionar evidencias científicas para que las entidades ambientales y gubernamentales tomen las medidas de control respectivas hacia el manejo de combustibles y biocombustibles y el establecimiento de los límites permitidos de generación de PM.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad la polución del aire ha despertado una creciente preocupación en la sociedad, debido a que se ve afectada su calidad y la salud humana a nivel mundial. Una de las causas de contaminación ambiental es la generación de material particulado (PM), producto principal de la ignición de combustibles que genera gran cantidad de material tóxico respirable. Adicionalmente, el material particulado (PM) lleva adherido contaminantes orgánicos con conocida actividad muta-carcinogénica como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), benceno, tolueno, sulfatos, nitratos, amonio y metales pesados (Zuluaga et al., 2009). Los efectos por exposición aguda y prolongada a estas sustancias incluyen: envenenamiento por humo, bronquitis, reacciones alérgicas, conjuntivitis, irritación e inflamación del tracto respiratorio, infecciones respiratorias y desarrollo de cáncer de pulmón (Zuluaga et al., 2009). El número de muertes asociadas a la exposición de PM es de 7 millones a nivel mundial, de las cuales el 16% corresponde a cáncer de pulmón, 11% a enfermedad pulmonar obstructiva crónica y más del 20% por cardiopatía isquémica y accidente cerebro vascular (WHO, 2014).

Por otro lado la producción mundial de biocombustibles se ha venido incrementando en los últimos años, debido al interés de diferentes países para remplazar parte de su demanda de combustibles fósiles por alternativas provenientes de fuentes vegetales. Los biocombustibles representan por un lado beneficios ambientales, ya que su cadena de suministro emite menos CO₂ que los combustibles fósiles y adicionalmente, beneficios sociales ya que el procesamiento de las materias primas favorece la generación de gran cantidad de empleos (Zapata, 2013). Sin embargo, no se cuenta con suficiente evidencia científica acerca de los efectos tóxicos del MP generado por la ignición de biocombustibles y la dimensión de dicha toxicidad, además, si este tipo de MP genera los mismos efectos de los combustibles fósiles como reacciones alérgicas, problemas respiratorios y cardiovasculares (Mills., et al. 2005).

Por lo tanto en la presente investigación se empleó el test de Ames, para resolver la siguiente pregunta: ¿El material particulado procedente de la combustión de biocombustibles elaborados a base de aceite de Jatropha y aceite de Palma presenta igual actividad mutagénica que el combustible fósil?

Los estudios realizados hasta ahora de mutagenicidad de PM indican que las aeropartículas respirables, originadas de la ignición de combustibles fósiles presentan un alto riesgo para la salud y el medio ambiente por los altos niveles de contaminantes químicos, factores a los cuales la población mundial se encuentra expuesta continuamente.

2. JUSTIFICACIÓN

El uso de biocombustibles como fuente alterna de energía en el sector automotor principalmente, se ha incrementado notablemente a nivel mundial, como solución para reducir la emisión de CO₂ y disminuir la contaminación ambiental, así como también ha sido planteado como alternativas para reemplazar los combustibles fósiles. Los biocombustibles hechos a base de *Jatropha* (*Jatropha curcas*) y Palma Africana (*Elaeis guineensis*) están siendo ampliamente utilizados en Colombia por su facilidad de siembra y obtención (Cardona, & Quintero, 2010). Sin embargo la emisión de gases contaminantes y partículas tóxicas generadas por la ignición de combustibles especialmente de origen fósil, contribuyen a la contaminación del aire por partículas aerodinámicas respirables y se han visto relacionadas con un incremento de enfermedades respiratorias, cardiovasculares y cáncer, causa importante de mortalidad en la población humana.

El test de Ames es una prueba confiable, rápida y económica, que permite evaluar el potencial mutagénico de diferentes compuestos bajo iguales condiciones. Con esta prueba se puede identificar el daño causado al material genético por la exposición a compuestos químicos. El indicativo de la mutación en este ensayo, está dado por la reversión his- a his+, empleando cepas de *Salmonella typhimorium*. Adicionalmente, con el uso de la fracción microsomal S9 es posible evaluar el carácter directo o indirecto de cada sustancia y determinar de esta manera el mecanismo de acción del PM.

La identificación del efecto genotóxico ocasionado del PM originado de la ignición de biocombustibles y del combustible fósil, es de suma importancia, no solo porque está contextualizado dentro de las políticas de salud y medio ambiente nacionales e internacionales que motivan la obtención de nuevas y más sanas alternativas de combustión, sino también porque es fundamental el análisis de su calidad.

Los resultados del estudio aportan conocimiento importante en el área de toxicología genética y calidad ambiental acerca de los mecanismos de toxicidad por los que el PM de los biocombustibles causa problemas de salud en la población humana. Además indirectamente se está aportando conocimiento acerca del daño causado por las continuas emisiones de PM al medio ambiente y el deterioro del mismo por las altas concentración de gases tóxicos que genera contaminación atmosférica y afecta la calidad del aire y agua. Este aporte se logró mediante la aplicación del test de Ames para evaluar el potencial mutagénico del PM generado por la combustión de dos biocombustibles, elaborados a base de aceite de Jatropha y aceite de Palma Africana y del Diésel como combustible fósil; el análisis de los datos obtenidos como número de revertantes y el nivel mutagénico presentado en las bacterias por cada uno de los combustibles, son resultados que permiten confirmar el riesgo al cual la población humana se encuentra expuesta continuamente.

Esta investigación cumplió exitosamente con los objetivos de estudio propuestos y los métodos empleados siguieron la rigurosidad científica y calidad exigida que permitieron obtener resultados confiables. Con la socialización de los resultados se espera poder alertar a las autoridades sanitarias públicas y privadas, a las instituciones gubernamentales y no gubernamentales y a la población involucrada sobre los posibles riesgos para la salud y el ambiente. De esta manera implementar métodos de control en el empleo y distribución de biocombustibles. También con la realización de este estudio se generó interacción científica entre las instituciones participantes con el apoyo y colaboración del Grupo de Investigación en Gestión y Modelación Ambiental- GAIA de la Universidad de Antioquia y el Grupo de Investigación de Biología de Sistemas de la Universidad Pontificia Bolivariana de Medellín- Antioquia; Instituciones, donde las estudiantes fueron capacitadas en la conducción de estudios de mutagenicidad y toxicología genética, establecimiento de cultivos bacteriales y control de fenotipos, así como análisis de datos para este tipo de estudios.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Biocombustibles

Los biocombustibles son sustancias principalmente alcoholes, ésteres y otros compuestos químicos, producidos por procesos de fermentación, transesterificación o digestión anaerobia a partir de biomasa, tales como plantas herbáceas y leñosas, residuos de la agricultura y actividad forestal, y una gran cantidad de desechos industriales, como los desperdicios de la industria alimenticia (Stratta, 2000).

Los biocombustibles se pueden clasificar según los niveles de desarrollo tecnológico usado para su obtención y se definen como de primera, segunda y tercera generación (Bomb et al. 2006). Los biocombustibles de primera generación son aquellos producidos a partir de materias primas que son utilizadas también como alimentos y para los que se utiliza tecnología convencional como la fermentación (azúcares y carbohidratos), transesterificación (aceites y grasas) y digestión anaerobia (desperdicios orgánicos). Debido a la competencia que estos generan con el sector alimenticio son considerados como una alternativa energética de transición. Las principales materias primas para la producción de biocombustibles de primera generación son: el aceite de palma, la soya, el sorgo dulce, la caña de azúcar, el maíz, la yuca entre otros (Franco et al., 2008). Los de segunda generación son los producidos a partir de fuentes que no interfieran con la seguridad alimenticia como residuos agrícolas y residuos de madera. Los biocombustibles de tercera generación son producidos a partir de microorganismos como bacterias, hongos y algas con el fin de obtener lípidos con composiciones similares a los aceites vegetales. (Zapata, 2013).

El producto final de los biocombustibles consiste en una mezcla de combustible fósil y aceite vegetal en porcentajes variables. Los biocombustibles se clasifican en B100, B20, B10, B5 según el porcentaje de sus componentes. Por ejemplo, una

mezcla B20 está compuesta de 20% de combustible fósil y 80% de aceite vegetal, y junto con la B100 son las mezclas más empleadas en la industria automotriz, principalmente en Estados Unidos y en gran parte de América Latina (Zapata, 2013).

Entre los biocombustibles podemos incluir al bioetanol, biodiesel, biometanol, entre otros, de los cuales los dos productos más desarrollados y empleados son el bioetanol y el biodiesel (Stratta, 2000).

El bioetanol es un alcohol extraído a partir de materia orgánica, de cultivos ricos en azúcares como la caña de azúcar o la remolacha, también de cereales como el maíz, el trigo, la cebada o el centeno, mediante un proceso de fermentación y posterior destilación que se mezcla con gasolina (Garcia & Triñanes, 2006).

El biodiesel se obtiene a partir de aceites vegetales de cultivos oleaginosos, como la colza, el girasol, la palma o la *Jatropha* y se utiliza en mezclas con el gasóleo, el cual es un aceite obtenido de la destilación del petróleo y está compuesto por una mezcla de hidrocarburos (Arregui et al, 2007). La producción mundial de biodiesel en el 2013 fue de 27.06 millones de toneladas y en 2014 de 29.12 millones de toneladas (Infinita Renovables, 2015).

Uno de los principales países productores de biodiesel es EE.UU con 4.53 millones de toneladas en 2013. Le siguen en el ranquin Indonesia, Brasil, Alemania y Argentina (Infinita Renovables, 2015). En Colombia la producción de biodiesel actualmente es de 41.998.93 toneladas (Federacion Nacional de Biocombustibles de Colombia, 2013)

3.1.1 Proceso de obtención de los biocombustibles

Los biocombustibles son producidos a partir de los aceites vegetales en el que las tres moléculas de ácidos grasos de los triglicéridos reaccionan con un alcohol y se

convierten en ésteres de metilo o etilo, a través de un proceso denominado transesterificación. La separación de las moléculas de glicerina necesita temperatura y un potente catalizador básico, como un hidróxido, para que la reacción sea completa. Finalmente, las cadenas de ésteres se convertirán en biodiesel, reteniendo moléculas de oxígeno en su constitución, lo que le otorgará interesantes propiedades en la combustión disminuyendo el 90% de la cantidad de hidrocarburos totales no quemados, y entre 75% y 90% en los hidrocarburos aromáticos. Además, proporciona significativas reducciones en la emanación de partículas y de monóxido de carbono, y sus bajas emisiones hacen del biodiesel un combustible ideal para el uso en las áreas marinas, parques nacionales, bosques y sobre todo en grandes ciudades (Stratta, 2000).

3.2 Aceite de palma

El aceite de palma es de origen vegetal, obtenido del mesocarpio del fruto de palma, *Elaeis guineensis*, especie originaria de África. Presenta un color rojizo, característico de los aceites vegetales, el cual se encuentra compuesto principalmente por 50% de ácidos grasos saturados, 40% de ácidos grasos monoinsaturados y 10% de ácidos grasos poli-insaturados (Indupalma, 2014).

Los cultivos de palma pueden producir hasta 20 toneladas de racimos por hectárea por año, de los cuales se puede extraer hasta el 25% de aceite de palma y el 5% de aceite palmiste. Esta cantidad es mayor a las producidas por cualquier otra fuente vegetal (Sánchez & Salinas, 2010). Este tipo de extracto hace parte de los biocombustibles de primera generación.

La distribución en Colombia de los cultivos de palma africana en el 2015 fue de 470.000 hectáreas (Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia, 2016), de las cuales casi la mitad fue destinada para la producción de biodiesel el resto para la industria y fines alimenticios; produciendo casi un millón de toneladas de

aceite de palma, que ubicó al país como líder productor entre los países de América (SISPA, 2015).

Estudios realizados con biodiesel a base de aceite de Palma, demuestran la una gran reducción en las emisiones de gases y partículas contaminantes, presentando 53% menos de MP, una disminución del 7% de CO₂ y 20% menos de emisiones de óxidos de nitrógeno (NO_x) con respecto al uso del Diésel (Cuellar y Torres, 2007).

3.3 Aceite de *Jatropha*

Es un aceite vegetal extraído del fruto de la *Jatropha curcas L*, no apto para el consumo humano ya que presenta sustancias tóxicas como ésteres de forbol, curcin, inhibidores de tripsina, lectinas y fitato, que se encuentran en las semillas y en la cascara del fruto (FACT, 2009). A nivel biológico se usa ampliamente en el control de plagas ya que presenta propiedades de insecticida y fungicida. Otras partes de la planta son usadas comúnmente de manera tópica para fines medicinales, en especial para tratar infecciones de la piel, enfermedades de transmisión sexual, ictericia y fiebre. En las hojas se han identificado sustancias como apigenina, vitexina e isovitexina, que pueden ser utilizados contra la malaria, el reumatismo y los dolores musculares (Pabón & Hernández, 2012). El aceite de *Jatropha* es rico en ácidos grasos no-saturados, en mayor proporción linoleico y oleico (Mujumdar & Misar, 2004). El aceite de esta planta posee propiedades únicas que lo hacen ideal para uso industrial, preferiblemente para biodiesel (Sánchez & Salinas, 2010). El aceite de *Jatropha* pertenece a los biocarburantes de primera generación, tiene 3% menos contenido de azufre que otros aceites minerales utilizados como fuentes de energía (Rojas, 2004), causando una reducción del 100% en las emisiones de dióxido de sulfuro, gas asociado a impactos ambientales y relacionados con la lluvia ácida, reducen un 50% las emisiones de óxido de nitrógeno y hasta un 85% los gases de invernadero (Montoya, 2010).

Actualmente, Colombia cuenta con aproximadamente 135,5 hectáreas, de *Jatropha*, distribuidas en los departamentos de Vichada, Choco, Santander, Cauca, Antioquia, Cesar y Nariño (Olea, 2012).

El porcentaje de aceite en la semilla de *Jatropha curcas L* varía entre 21% y 38% dependiendo de las condiciones y de manejo en las que se encuentre el cultivo (Sánchez & Salinas, 2010).

3.4 Combustibles fósiles

Los combustibles fósiles son fuentes de energía no renovable originada de materia orgánica enterrada en estratos internos de la capa terrestre y que se encuentra transformada químicamente bajo condiciones anoxicas (sin oxígeno) en los actuales tipos de combustibles fósiles: carbón, petróleo y gas natural. Los tres tipos de combustibles ocasionan los mismos tipos de contaminantes físicos atmosféricos generados por su uso industrial y urbano como centrales térmicas, líneas de distribución eléctricas, industrias, vehículos de locomoción, etc. Estos combustibles fósiles también generan contaminantes químicos como CO₂, NO_x, SO₂, partículas, CO, sustancias químicas peligrosas, que se originan al momento de generar su combustión (Tortajada, et al, 2001), las cuales se encuentran adheridas y forman el MP que continuamente es respirado tanto por humanos como por animales y plantas, afectando la salud de los organismos, por medio de la alteración de sus órganos y desencadenando enfermedades.

La ignición de combustibles fósiles genera impacto medioambiental negativo en los ecosistemas aéreos, terrestres y acuáticos, afectando directa e indirectamente las poblaciones humanas (Gonzales, 2004). Según el Banco Mundial en 2010, se produjo 7.515.150,3 toneladas de CO₂ y 2.859.833,5 toneladas de Óxido de Nitrógeno (NO_x) en el mundo. Colombia produjo entre 2011 a 2015 cerca de 72.423

toneladas de CO₂ del cual el 85% es originado de la combustión de combustibles fósiles y 25.140 toneladas métricas de NO_x (El Grupo Banco Mundial, 2015).

3.4.1 Diésel

El diésel o gasóleo es una mezcla compleja de hidrocarburos que se derivan de la destilación del petróleo crudo, la mayoría de ellos tienen cadenas entre 10 y 22 carbonos, estos hidrocarburos son de tipo parafinicos, naftálenicos o aromáticos que en su estado inicial contiene aceite, azufre, plomo, ácido sulfúrico. Esta última se elimina en gran parte debido a que la gran cantidad de esta sustancia en el petróleo puede generar daños en el motor, además, es un compuesto que al ser inhalado causa la muerte, debido a que cuando los vapores ingresan al organismo causan irritación en las vías nasales, alteran el pH intracelular, produciendo cambios estructurales en las proteínas, destrucción de las células y aumenta la permeabilidad capilar, también produce inflamación de las vías respiratorias, afectando la respiración, lo cual genera ruptura de la membrana alveolo-pulmonar ocasionando así enema pulmonar e insuficiencia respiratoria aguda y en ocasiones la muerte (Caballero, 2006; Gonzales, 2004). Posteriormente este vuelve a ser refinado para eliminar el plomo, sin que se logre eliminar totalmente, por lo que contribuye al potencial carcinogénico (De Vita et al., 1990), junto con los compuestos tóxicos que se desprenden de la combustión, al ser inhalados se alojan en el tracto respiratorio generando afecciones en la salud de la población (WHO, 2014).

En Colombia el consumo de Diésel ha aumentado 6,6% anualmente desde el año 2000 alcanzando ventas en el 2009 de 108,357 BDC (Barriles diarios de consumo). El Diésel es empleado con diferentes fines, siendo el 69,7% destinado para el sector del transporte, y el 30,1% destinado a usos comerciales, agroindustriales, residenciales, generación de electricidad, etc. (Biocombustibles en Colombia,

2009). Actualmente, Colombia consume un promedio de 110.000 barriles diarios de Diésel (Vanguardia, 2015).

3.5 Material particulado y el efecto en la salud

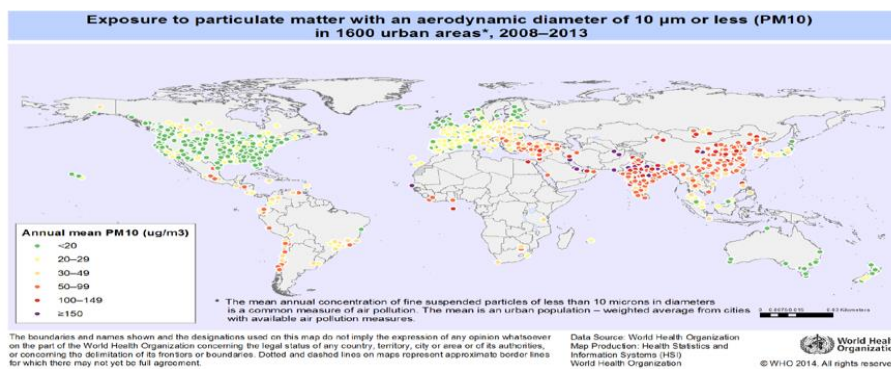
Las partículas atmosféricas, generadas por combustión de carburantes, biocarburantes, biomateria, aerosoles, entre otros, constituyen uno de los contaminantes ambientales más perjudiciales debido a que contienen compuestos con conocida actividad genotóxica, mutagénica y/o carcinogénica, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HPA) y sus derivados, metales pesados, óxidos de azufre y nitrógeno (Guimares et al., 2000). Contienen además compuestos provenientes del combustible como el carbono que no es oxidado en el proceso de combustión, (en forma tanto elemental como orgánica) y sulfatos o ácido sulfúrico provenientes del azufre (Rojas, 2005).

El material particulado respirable, contiene dos tipos de partículas; las primarias que son emitidas directamente al aire, y las partículas secundarias que son las formadas en la atmosfera por transformaciones de emisiones gaseosas como los óxidos de azufre y nitrógeno y los compuestos orgánicos volátiles (Pilinis et al., 1987). El material particulado se clasifica según su tamaño, en PM2.5 con un diámetro menor de 2.5um y PM10 con un diámetro aerodinámico menor de 10um (Ferreyra & Arancibia, 2008). Las partículas de 10um se originan principalmente de procesos mecánicos como resuspensión de polvo de caminos, construcciones, vientos; y las partículas de 2.5um se generan principalmente de la combustión de material orgánico (World Health Organization, 2012). El PM10 se deposita principalmente en la nariz, garganta, tráquea y bronquios; mientras que el PM2.5, conocidas como partículas ultrafinas, logran alcanzar todas las áreas del tejido pulmonar como bronquios y alveolos, así como también en diferentes tejidos epiteliales del cuerpo (American Lung Association, 2011). La mayoría de estos compuestos una vez emitidos al aire se condensan y son absorbidos en la superficie de partículas

respirables de hollín y cenizas que, al ingresar al tejido pulmonar son transformados a metabolitos activos, generando procesos inflamatorios, y a su vez interactúan con macromoléculas celulares como el ADN, causando lesiones en su estructura, generando errores en los procesos de división celular y causando posiblemente la muerte celular (Calderón et al., 2004).

Debido a esto el material particulado respirable es asociado con el desarrollo de enfermedades y aumento de la mortalidad, las cuales son atribuidas a la inhalación crónica de hidrocarburos aromáticos policíclicos que forman parte del material particulado, determinando el aumento de la mortandad por afecciones cardiovasculares y cáncer pulmonar (Brook et al., 2002; Ostro et al., 1996). En la gráfica 1, se observan los niveles de exposición a PM10 a los que se encuentra expuesta la población mundial.

Los valores de referencia de PM2.5 establecidos en la Guías de Calidad de Aire de la OMS son de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ media anual y $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ promedio en 24 horas y los niveles para PM10 son $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ media anual y $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ promedio en 24 horas (OMS, 2005). En Colombia, según lo establecido en la resolución No. 610 del 24 de marzo de 2010 el nivel máximo permisible de PM10 es de $50 \mu\text{g}/\text{m}^3/\text{año}$ y $100 \mu\text{g}/\text{m}^3/24\text{h}$ y para PM2.5 es de $25 \mu\text{g}/\text{m}^3/\text{año}$ y $50 \mu\text{g}/\text{m}^3/24\text{h}$ (Ministerio De Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, 2010).



Gráfica 1. Mapa mundial de exposición a material particulado PM10 entre 2008-2013 (OMS, 2014).

3.6 Biotransformación de compuestos xenobióticos

Algunos compuestos químicos son reactivos y pueden formar lesiones directas en el ADN como aductos, oxidación de bases, rupturas o entre cruzamiento de cromatidas (Quijano et al., 2015). Se trata de compuestos electrofílicos en mayor o menor medida, los cuales reaccionan con los centros nucleofílicos presentes en el ADN, como pueden ser los epóxidos, N-óxidos aromáticos, alquilnitrosoureas, etc; se les considera compuestos genotóxicos directos (Bello et al., 2001).

Los compuestos genotóxicos indirectos por el contrario, necesitan ser activados metabólicamente a metabolitos electrofílicos por la acción de sistemas enzimáticos presentes en las células de mamíferos. Esto ocurre fundamentalmente con las oxigenasas de función mixta o sistema citocromo P450, localizado en la superficie del retículo endoplasmático de células hepáticas principalmente durante la fase I, donde ocurren reacciones oxidativas, reductoras o hidrolíticas, cuyo principal objetivo es identificar el grupo polar de la estructura química primaria del compuesto extraño. Estas enzimas en la fase II añaden un átomo de oxígeno a la molécula y convierten compuestos liposolubles y no polares en otros más polares e hidrosolubles para facilitar su excreción, pero antes pueden presentar reacciones de conjugación con moléculas endógenas (Bello et al., 2001). Esta actividad celular, tiene como principal objetivo facilitar la eliminación de xenobióticos, los cuales son compuestos extraños que ingresan al organismo interactuando con las diferentes moléculas y órganos del cuerpo (Delgado et al., 2003), en especial con el ADN. Estas partículas son resultado de reacciones en cadena y tienen como efecto la producción de pequeñas moléculas que interactúan con el ADN conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales son moléculas con átomos de oxígeno en su estructura como O_2 , HO, NO; que son muy reactivas y tienen un electrón no apareado que les atribuye inestabilidad física. Este tipo de partículas dan lugar a la aparición de moléculas electrofílicas y reactivas con el ADN (Ames et al., 1973).

Dentro de las especies ROS, se incluyen moléculas precursoras de radicales libres como H_2O_2 y $HONO_2$. Estas moléculas participan en procesos fisiológicos del organismo, pero cuando la producción de ROS supera los mecanismos de inactivación, se presenta un estado metabólico conocido como estrés oxidativo, el cual se caracteriza por causar daños moleculares y celulares, estos conducen a predisposición o modificación de padecimientos crónico-degenerativos, entre las que se encuentran enfermedades pulmonares y cardiovasculares (Sierra et al., 2004).

3.7 Activador metabólico

Para evaluar la actividad metabólica y la identificación de compuestos directos e indirectos en sistemas in-vitro es posible obtener preparaciones enzimáticas activas, a partir de tejidos ricos como el hígado para la fracción microsomal S9. El método consiste en obtener una suspensión que contiene sobrenadante con las membranas del retículo endoplasmático, los ribosomas, enzimas solubles y los cofactores endógenos del tejido hepático, esto se conoce como fracción S9. Adicionalmente, se pueden obtener fracciones S9 con actividad metabólica alta tratando animales con compuestos químicos que estimulan la síntesis hepática de monooxigenasas como fenobarbital, 3-metilcolantreno o Aroclor 1254 (mezcla de bifenilos policlorados), inductor más empleado para la elaboración de la fracción S9 utilizado en ensayos de genotoxicidad (Ames et al., 1973).

3.8 Genotoxicidad y mutación

Todas las sustancias con conocida actividad mutagénica son genotóxicas, pero no todas las sustancias genotóxicas son mutagénicas, pues las lesiones primarias causadas por agentes genotóxicos pueden ser reparadas o pueden causar la apoptosis celular, procesos que evitan la formación de mutaciones. Los eventos que

se manifiestan por la acción de este tipo de sustancia causan genotoxicidad y mutagenicidad.

Genotoxicidad, es el proceso mediante el cual agentes naturales y sintéticos son capaces de inducir alteraciones en el ADN, dando lugar a cambios en la estructura y por ende en la información contenida en la molécula, causando una mutación que al acumularse pueden iniciar enfermedades como el cáncer (UNAD, 2015). Dentro de estos agentes capaces de provocar este tipo de daño están las partículas aerodinámicas suspendidas en la atmosfera, tales como HPA con conocida actividad genotóxica, las cuales al ingresar al organismo pueden causar daño directo en el ADN de las células y por procesos de reparación errónea pueden generar mutaciones y transformación celular (Knaapen et al., 2004).

El potencial genotóxico de las partículas respirables está determinado por las características físico-químicas y su capacidad de generar compuestos oxidantes en las células. El grado de lesiones genotóxicas y proliferativas causadas por las partículas respirables serán determinados por las vías de biotransformación, antioxidantes enzimáticos, la eficiencia de los mecanismos de desintoxicación y la capacidad de reparación del material genético (Schins, 2003).

Una mutación, es un cambio hereditario en el material genético, el cual no ha sido reparado o se ha reparado erróneamente antes de la división celular, se presenta de manera espontánea o inducida por agentes físicos, químicos y biológicos, los cuales actúan directa e indirectamente con el ADN por medio de procesos metabólicos (De la Rosa & Ruiz, 1997). Este proceso inicia con la aparición de una lesión primaria, que es un daño en la molécula de ADN por un agente externo, el cual se adhiere causando alteraciones en la estructura, dando origen a una mutación. La mutagénesis permite identificar la interacción y el mecanismo de acción de agentes químicos y físicos (Trossero et al., 2006) conocidas como mutágenos, los cuales son sustancias extrañas al organismo, que por inhalación,

ingestión o penetración cutánea, ingresan al cuerpo afectando órganos, la viabilidad celular y el material genético. Existen diferentes tipos de mutaciones, que se pueden clasificar según su morfología o función (Solari, 2004).

Según su morfología, las mutaciones pueden ser:

- a) Puntuales, consisten en cambios en la estructura química de una base, lo que determina que al replicarse el ADN, incorpore en su estructura una base incorrecta en vez de la correcta. Las mutaciones puntuales son sustituciones de base y a su vez se clasifican en transiciones, y transversiones, (Solari, 2004).
- b) De extensión variable o segmentaria (cuando pueden afectar más de una base). Estas mutaciones pueden ser deleciones, inserciones, o expansiones de repeticiones de tripletes (Solari, 2004).
- c) Cromosómicas, son mutaciones donde se afecta una parte de uno o varios cromosomas, así como también puede ocurrir un reordenamiento o traslocación. Las mutaciones cromosómicas se originan por la recombinación no homóloga entre los cromosomas. Este tipo de mutaciones se clasifica en tres tipos: reordenamientos desequilibrados, reordenamientos equilibrados, y traslocaciones (Oliva, 2004).
- d) Genómicas, son aquellas que implican ganancia o pérdida de un cromosoma o varios cromosomas completos, es decir hay un cambio en el número de cromosomas por célula. Este tipo de mutación puede ser causada por la acción de mutágenos indirectos. Cuando el número de cromosomas es múltiplo exacto del número haploide se denomina con la terminación *ploidia* (triploidia, tetraploidia). Cuando el número de cromosomas no es múltiplo

exacto del número haploide, se denomina *aneuploidias* (trisomía, monosomía) (Oliva, 2004).

Según su función las mutaciones pueden ser:

- a) Silenciosas, este tipo de mutaciones no muestra cambios en el fenotipo. Corresponde a cambios de base en regiones no codificantes (Oliva, 2004).
- b) Cambio de encuadre (por delección o inserción). Son cambios en el “marco” de lectura de los tripletes por la pérdida o adición de una o dos bases (Oliva, 2004).
- c) Sin sentido, son mutaciones que corresponden a cambios de una base que convierte un triplete codificante en uno sin sentido, que al ser reconocido por los factores de terminación produce la interrupción de la cadena polipeptídica (Oliva, 2004).
- d) Cambio de sentido, son los cambios producidos por sustituciones de pares de bases (Oliva, 2004).
- e) Elementos de control, son mutaciones que afectan secuencias tales como un promotor, un intensificador u otras secuencias reguladoras (Oliva, 2004).

3.9 Test de Ames

Es una prueba que se basa en detectar compuestos que pueden causar mutaciones génicas por corrimiento en el marco de lectura (frameshift), o por sustitución en los pares de bases del ADN. Para su evaluación se utilizan cepas de la bacteria *Salmonella typhimurium* (TA97, TA98, TA100, TA102, TA1535, etc.), las cuales han sido genéticamente modificadas (mutadas) en el operón histidina, para

inhibir la capacidad de sintetizar el aminoácido histidina que es esencial para su supervivencia, y de esta manera las sustancias con capacidad mutagénica revierten dicha mutación (Villasana, 2006) y las bacterias proliferan en medio sin histidina.

Para evaluar la capacidad mutagénica de determinadas sustancias, se emplea el test de Ames una prueba descrita por Bruce Ames y su grupo de trabajo de la Universidad de California, a principios de 1970 (Villasana, 2006).

Adicionalmente el método empleado permite que las cepas de *Salmonella typhimurium* puedan ser sometidas a muestras con y sin activación metabólica S9, para detectar compuestos indirectos y directos respectivamente (Villasana, 2006).

Las cepas presentan además, las siguientes mutaciones que les permite tener mayor sensibilidad en la detección de sustancias mutagénicas.

Mutación *uvr-B*: Consiste en la delección en el gen *uvr-B* que elimina el mecanismo de reparación por escisión de bases, permitiendo la inducción de mutaciones en el ADN. La presencia de la mutación *uvr-B* se confirma al demostrar la sensibilidad de las cepas ante la luz U.V. en la cual sólo crecerán colonias revertantes en la zona no irradiada de la placa. Es una modificación presente en todas las cepas excepto en la cepa TA102 (Ames et al, 1973).

Mutación *rfa* o lipopolisacárido modificado (LPS): Esta mutación confiere modificación estructural a la capa de polisacáridos que recubre la superficie bacteriana, haciéndola más permeable y permitiendo así la entrada de sustancias con mayor facilidad; carácter que puede ser evaluado por la sensibilidad de la cepa ante el cristal violeta. Se evalúa como positiva cuando aparece una zona de inhibición de crecimiento alrededor del cristal violeta, cuya aparición indica la presencia de la mutación *rfa*, la cual permite la entrada del cristal violeta a través de la membrana por la muerte de la bacteria (Ames et al, 1973).

Introducción de plásmido *pKM101*: Se presenta en cepas TA1535 y TA1538, y las correspondientes líneas isogénicas TA100, TA98. Contiene un gen para resistencia a la ampicilina. Su presencia confiere a la bacteria mayor sensibilidad a mutágenos, obteniendo resultados más confiables (Ames et al, 1973).

Cada cepa tiene una frecuencia espontánea de mutaciones conocida como “valores de control histórico”, producto de la estandarización de la prueba en cada laboratorio (Cann et al., 1975).

3.10 Características de las cepas empleadas en el estudio

Las cepas de *Salmonella typhimurium* empleadas en el test de Ames presentan diferentes características genéticas, las cuales determinan el tipo de mecanismo empleado por sustancias mutagénicas, que afectan el material genético. Las cepas empleadas en este estudio fueron:

Cepa TA98

La cepa TA98, contiene el plásmido, *pKM101* con una mutación en el operón *HisD3052* que codifica para la histidina deshidrogenasa. Esta cepa presenta el factor-R que le confiere resistencia a la ampicilina y presentan genes *muc*, los cuales se encuentran en contacto con el medio ambiente externo y actúan frente a sustancias contaminantes y tóxicas, esta característica aumenta la frecuencia de mutación tanto de manera espontánea como inducida al afectar el sistema de reparación que está presente en estos organismos. En esta cepa se produce reversión a *his⁺*, la cual detecta diversos mutágenos que producen corrimiento del marco de lectura (*frameshift*) que implica la inserción o la pérdida de pares de bases (Meléndez et al., 2012; Maron & Ames 1983).

Cepa TA100

La cepa TA100 presenta el plásmido pKM101, que confiere resistencia a la ampicilina y aumenta la probabilidad de duplicación con error en el ADN. Posee una mutación en el codón HisG46, que codifica para la primera enzima de la biosíntesis de la histidina; en esta cepa se detectan múgatenos que generan reversión por sustitución de pares de bases (Meléndez et al., 2012; Ames et al., 1975).

4 ANTECEDENTES

En los últimos años la preocupación por reducir los niveles de contaminación atmosférica, producto de la combustión de combustibles fósiles como el diésel, petróleo y carbón, ha desencadenado la necesidad de elaborar combustibles renovables y más limpios, como los hoy conocidos biocombustibles, elaborados a partir de fuentes naturales de origen vegetal. En el año 2000 Stratta, indicó que el uso de biocombustibles reduce entre un 60-80% las emisiones de gases de invernadero, un 90% la cantidad de hidrocarburos totales no quemados, entre un 75-90% los hidrocarburos aromáticos y la emanación de partículas respirables (Stratta, 2000). Países como, Brasil, China, India, EE.UU y Colombia, se han destacado en la producción continua de biocombustibles a base de extractos vegetales como, soja, caña, maíz, aceite de palma, remolacha, arroz, etc; productos que están siendo empleados como fuentes alternas de energía. En los últimos años el aceite de palma se ha convertido en una de las principales fuentes para la elaboración de biocombustibles como una alternativa a nuevas energías, siendo Colombia el quinto productor mundial de aceite de palma y el primero en América. Los resultados acerca del medio ambiente son inconsistentes en cuanto al beneficio de los biocarburantes, debido a que se afirman que los biocombustibles reducen en un 60% la emisión de gases de invernadero, sin embargo determinaron que algunos tipos de biodiesel a base de soja contribuyen a los gases de invernadero en un 160% más que el petróleo (Gonzales & Horta, 2013).

Adicionalmente otros estudios realizados han revelado que la combustión de diferentes combustibles (fósiles, biocombustibles y gas natural) empleados en el sector automotriz y como fuentes alternativas de energía genera gran cantidad de material particulado respirable PM10 y PM2.5, los cuales afectan la salud; estas partículas que se desprenden tienen gran cantidad de químicos que aportan un alto grado de contaminación atmosférica. El reporte realizado por la OMS en 2014, afirma que cerca de 4,7 millones de muertes están relacionadas con la inhalación

de MP, producto de la contaminación ambiental. García et al (2008), confirmaron el aumento significativo de micronúcleos en linfocitos humanos expuestos al extracto orgánico del material particulado colectado en dos ciudades de la provincia de Córdoba, Argentina (Córdoba y Río Ceballos) los resultados revelaron además, que la concentración de material particulado recolectado en Córdoba fue significativamente mayor a la de Río Ceballos, probablemente debido a diferencias en la intensidad de tránsito vehicular en ambas ciudades. De igual modo el estudio desarrollado por Lingzhi et al (2007), sobre partículas generadas por escape de Diésel (DEP) en células de Hámster (AL) permitió observar la mayor frecuencia de mutación en el locus CD59, directamente proporcional a las dosis evaluadas.

Dentro de los estudios de mutagenicidad de MP de biocombustibles Westphal et al (2013) evaluaron biocombustibles a base de aceite de Colza, aceite de Jatropha y un combustible fósil en este estudio concluyeron que los biocombustibles producen menor cantidad de MP y los resultados del test del Ames demostraron que los biocombustibles presentan respuesta mutagénica causando corrimiento en el marco de lectura por inserción o sustitución de pares de bases, en presencia de S9, al igual que el combustible fósil. Asimismo investigaciones realizadas por Jügen et al., 2009, mediante un estudio comparativo evaluaron las emisiones del aceite vegetal de Colza (*Brassica napus*), planta herbácea perteneciente a la familia de las *Crucíferas*, este biocombustible fue comparado con petrodiesel y gas natural, empleando el Test de Ames en cepas TA98 y TA100, donde observaron que el aceite vegetal presentaba un mayor efecto mutagénico comparado con el gas natural y el petrodiesel.

Así mismo la exposición a MP en Colombia está siendo tema de estudio desde los últimos años, tal como lo demuestra Mendoza et al (2013) quien desarrolló un estudio sobre calidad de aire en tres sitios de la ciudad de Medellín- Antioquia durante tres épocas diferentes del año (lluvia, transición y seca), para determinar la genotoxicidad generada por material particulado PM10 en linfocitos humanos, por

medio del ensayo Cometa; los resultados revelaron que el MP de los tres sitios generan genotoxicidad altamente significativa, presentando un daño mayor durante la época de transición, época que se refiere a la baja frecuencia de lluvias con presencia de días secos; en este período se presentó un incremento de células con daño entre 50 y un 93% mayor con respecto al control negativo. Igualmente, Meléndez et al (2012) realizaron la evaluación mutagénica y genotóxica del MP2.5, colectado en una vía vehicular en Pamplona, Norte de Santander donde empleando el test de Ames obtuvo significativa actividad mutagénica directa en las cepas TA100 y TA98 de *Salmonella typhimurium*, además, presentó significativa genotoxicidad al emplear el ensayo Cometa. Conjuntamente, se han realizado estudios que demuestran el deterioro de la salud al estar continuamente expuestos a micropartículas respirables, tal como lo evidencia el estudio de Estevez, 2010, en el cual se evaluó la exposición a MP10 en policías de tránsito de la ciudad de Bogotá, se tuvo en cuenta síntomas respiratorios, examen clínico toxicológico, espirometría y monitoreo personal al MP10, la investigación reportó mayor frecuencia de afecciones respiratorias en policías expuestos al material particulado.

Este estudio permite ampliar el conocimiento científico sobre los efectos perjudiciales de las micropartículas respirables y su relación con las afecciones de salud en la población humana. El empleo del test de Ames en las cepas TA98 y TA100, permite determinar que los biocombustibles elaborados a base de aceite de Palma y aceite de *Jatropha* a diferentes concentraciones presentan un efecto tóxico y mutagénico al igual que el efecto causado por el MP del Diésel, así mismo este estudio permite confirmar que el MP proveniente de biocombustibles está altamente relacionado con lesiones genéticas y desarrollo de enfermedades, debido a los componentes químicos que conforman en el MP de la ignición de los biocombustibles y combustibles fósiles.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

- Evaluar el potencial mutagénico de material particulado (MP) generado por la combustión de dos biocombustibles elaborados a base de aceite de Jatropha y aceite de palma africana y del diésel como combustible fósil, por medio del test de Ames.

5.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la actividad mutagénica de diferentes concentraciones de MP producido por la ignición de los tres tipos de combustibles (Diésel, biocombustible a base de aceite de Palma y aceite de Jatropha).
- Determinar el carácter directo o indirecto de la mutagenicidad del MP generado por la ignición de los combustibles empleando la fracción microsomal S9.
- Caracterizar el tipo de mutación causada por el MP empleando las cepas TA98 (Mutación por cambio en el marco de lectura: Frameshift) y TA100 (Mutación por sustitución de un par de bases).

6 MARCO METODOLÓGICO

6.1 Conservación de cepas de *Salmonella Typhimurium*

Las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100 se conservaron en forma de cultivo activo en cajas de Petri con agar mínimo histidina/biotina/ampicilina (cajas maestras). Esta forma de conservación consiste en la transferencia de la cepa de la caja maestra a un medio de cultivo nutritivo (caldo nutritivo) y fresco a intervalos de 24 horas y 37°C que aseguren la viabilidad y crecimiento de bacterias. La inoculación se realizó a temperatura ambiente (Arrebola et al., 2003).

6.2 Obtención de la fracción microsomal S9

Este proceso se realizó siguiendo el protocolo establecido por el laboratorio de Mutagénesis de la Universidad de Antioquia, basado en el protocolo original del test de Ames (Ames et al; 1973). Para la obtención de la fracción microsomal S9 se emplearon dos ratas macho de la cepa *Wistar rattus norvegicus*, donadas por el Centro de Investigaciones Biomedicas de la Universidad del Cauca (CIBUC). El peso de los animales fue de 200g cada macho de 3 meses.

Los animales se mantuvieron en cautiverio durante cinco días para posteriormente realizar su sacrificio; el primer día se realizó la dilución de bifenilo policlorado aroclor 1254 a una concentración de 200 mg/ml en aceite de maíz y los animales fueron inyectados intraperitonealmente con 1ml de Aroclor 1254, un inductor enzimático altamente tóxico; al cuarto día se les retiró el alimento más no el agua y al quinto día, las ratas fueron sacrificadas y disectadas para remover el hígado, inmediatamente el peso de cada hígado fue registrado (7,29gr y 5,1gr). Este proceso se realizó a 4°C, en cuarto oscuro y bajo condiciones estériles, cada hígado se colocó en un beaker, donde se les agregó 1mL de KCl frío 0,15M con el cual se realizaron lavados para eliminar la hemoglobina que inactiva los citocromos y evitar

contaminación. Finalmente el hígado fue cortado en trozos de menor tamaño y homogenizado con un pistilo de teflón para ser centrifugado a 9000g durante 10 minutos (8700rpm), en seguida el sobrenadante se almacenó en viales de 1mL a -70°C hasta su uso (Universidad de Antioquia, 2009).

6.3 Obtención de material particulado (MP)

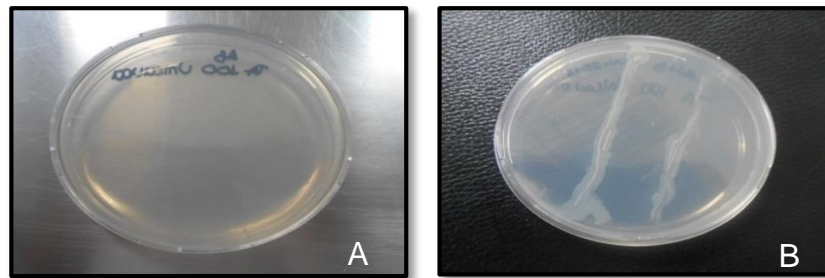
Se evaluaron dos biocombustibles de tipo B100 a base de aceite de Palma y aceite de Jatropha y un combustible fósil Diésel.

Para generar el MP de los tres tipos de combustibles se empleó un motor Diésel con una capacidad de 2.5L turbo alimentado y al cual se le instaló una esponja de acero inoxidable que permitió atrapar mayor cantidad el MP, sugerencia realizada por la Msc. Luz Yaneth Orozco, de la Universidad de Antioquia, modificación que permitió coleccionar cerca de 20g más de MP. Cada uno de los combustibles se sometió a este proceso durante ocho horas continuas y el MP se almacenó en frascos debidamente rotulados. Posteriormente 50g de MP de cada combustible fueron diluidos en 100ml de Diclorometano y llevados a un sonicador sin temperatura durante 90 minutos aproximadamente para separar todas las partículas adheridas al MP y luego se pasaron a través un filtro de celulosa de 0.2µm. Finalmente cada sustancia fue llevada a un rotaevaporador, el cual permitió obtener el material orgánico extraíble de cada uno de los combustibles. El MP de cada combustible se homogenizó con 1ml de buffer fosfato y por medio de una llave de tres vías acoplada a un sistema de dos jeringas y un filtro de 0.2µm, con el fin de obtener una solución estéril para cada uno de los ensayos bacterianos. El homogenizado de cada combustible fue almacenado en viales de 1ml para posteriormente preparar las concentraciones empleadas para los ensayos de Ames ("Obtención de PM", 2013; Mendoza et al. 2013).

6.4 Chequeo de marcas

El objetivo de este proceso fue evaluar las cepas bacterianas para garantizar la presencia de mutaciones, descartar contaminación de la cepa y anomalías en la estructura bacteriana. El chequeo de marcas consta de cuatro marcas características, las cuales fueron evaluadas después de 24 horas de incubación, siguiendo el protocolo Ensayo de mutagenicidad en *Salmonella typhimurium* (Test de Ames) de la Universidad de Antioquia.

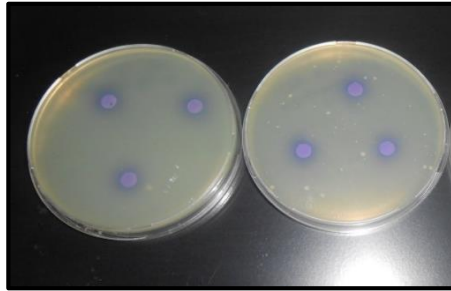
Marca 1. Mutación histidina. La confirmación de esta marca se realizó sembrando bacterias de las cepas (TA98 y TA100) en cajas de Petri con agar mínimo y agar mínimo/histidina/biotina por separado, cajas que se dejaron en incubación durante 48 horas y se pudo observar crecimiento de bacterias en cajas con agar mínimo/histidina/biotina y ausencia de crecimiento en cajas con agar mínimo, lo cual permitió confirmar la mutación en el operón histidina, tal como se evidencia en la fotografía 1.



Fotografía 1. Requerimiento de histidina (A) No hubo crecimiento en agar Mínimo. (B) Hubo crecimiento de ambas cepas en agar mínimo/histidina/biotina

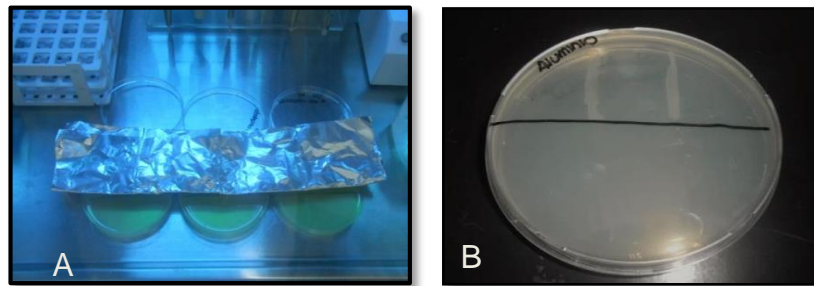
Marca 2. Mutación rfa (mutación en la estructura de polisacáridos de la pared celular). Para confirmar esta marca se realizó la siembra de bacterias de las cepas TA98 y TA100 en cajas de Petri con agar nutritivo, adicionalmente se agregó un disco de papel filtro de 0.6mm impregnados con 10µL de cristal violeta, que produce

un halo de inhibición de crecimiento bacterial alrededor de este, confirmando la presencia de la mutación, debido a que incrementa la permeabilidad de la pared celular de la bacteria, tal como se ve en la fotografía 2 después de incubar durante 24 horas a 37°C.



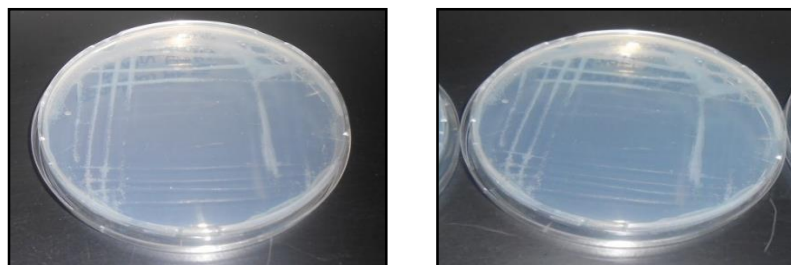
Fotografía 2. Resultado de la mutación *rfa*, se observan halos de inhibición de crecimiento que permiten confirmar la mutación *rfa*.

Marca 3. Mutación *uvrB*, sensibilidad a la luz ultravioleta (UV). Para confirmar esta mutación realizó la siembra de las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium* en cajas de Petri con agar nutritivo, posteriormente la mitad de cada caja de Petri fue cubierta con papel aluminio y expuesta durante 10 minutos a luz ultravioleta (fotografía 3A) y se dejaron en incubación durante 48 horas a 37°C. Como resultado se pudo observar ausencia de crecimiento bacterial en la zona directamente expuesta a la luz uv y la zona que se encontraba cubierta por aluminio durante la exposición a la luz presentó crecimiento bacterial, tal como se muestra en la fotografía 3B. Esto permitió confirmar la mutación *uvrB* en la bacteria, la cual es causada por la delección de genes responsables de la reparación de escisión, que impide a una bacteria reparar algunos tipos de daños causados en el ADN, tornándose más sensible a agentes mutagénicos. La delección del gen *uvrB* afecta gen biotina y, las cepas se tornaron auxótroficas para biotina (bio-) (Sandoval, 2006).



Fotografía 3. Montaje para la confirmación de la mutación *uvrB*. A). Cajas de Petri expuestas a luz uv. B). Resultado de la mutación *uvrB*. Donde se observa crecimiento de la bacteria en la parte cubierta con papel aluminio y ausencia de crecimiento en la parte expuesta a luz ultravioleta.

Marca 4. Mutación factor R, resistencia al antibiótico Ampicilina. Para confirmar esta marca se sembraron bacterias de las cepas TA98 y TA100 en cajas de Petri con agar mínimo histidina/biotina/ampicilina, empleando el método de “siembra francesa” como se muestra en la fotografía 4. Los cultivos fueron incubados durante 48 horas y se evaluó el crecimiento bacterial. Las cajas fueron almacenadas a 4°C y empleadas como cajas maestras (fotografía 4).



Fotografía 4. Confirmación del factor R. Cajas maestras.

6.5 Determinación de la dosis experimental de MP de combustible fósil (Diésel) y biocombustibles (Aceite de Palma y Jatropha).

Se preparó una solución madre de 50mg/equivalentes por mililitro de solución acuosa de cada uno de los homogenizados del MP de cada combustible, de la cual

se preparó una solución de trabajo de 0.5 µg/equivalentes por mililitro, basándose en el protocolo realizado por Mendoza et al, 2013. Posteriormente se hicieron soluciones con un factor de dilución de 2x2 para obtener dosis de: 500, 250, 125, 62.5, 31.2 y 15.6 µg/equivalentes/ml de cada uno de los combustibles (Diésel, aceite de Jatropha y aceite de Palma).

6.6 Controles empleados en la prueba de Ames.

Los controles positivos, permiten evaluar las características específicas de reversión de cada cepa, así como la efectividad del sistema de activación metabólico, para obtener resultados confiables. El control empleado para evaluar la acción de la fracción S9 fue 2- Aminofluoreno y los controles empleados en ausencia de S9 son azida de sodio (AzNa), para la cepa TA100; 4NQO y daunomicina para la cepa TA98.

Los controles negativos, se realizan inoculando la cepa en placas de agar mínimo con histidina con y sin fracción microsomal S9. A través de los controles negativos se verifica la tasa de reversión espontánea. El control negativo empleado durante la prueba fue Buffer fosfato a 0.15M.

6.7 Diseño experimental para la prueba de Ames

Para realizar el estudio, se realizaron dos experimentos:

Experimento # 1: Se realizaron dos ensayos por duplicado con las 6 concentraciones del MP de cada uno de los combustibles más los controles positivos azida de sodio (AzNa), 4NQO y daunomicina y los controles negativos agua estéril y buffer fosfato. Con el conteo del número de revertantes se eligieron tres concentraciones que presentaron actividad mutagénica igual o 50% mayor a

los controles negativos, clasificándolas en alta, media y baja para la selección de las dosis experimentales del MP de cada uno de los combustibles.

Experimento # 2: Para detectar el potencial mutagénico del MP de los tres tipos de combustibles se realizaron tres ensayos por duplicado con las concentraciones seleccionadas en el experimento #1, los controles positivos: 2-aminofluoreno, daunomicina, 4NQO y azida de sodio, los controles negativos: agua estéril y buffer, en presencia y ausencia de la activación metabólica (fracción mricosomal S9).







































6.8 Tratamiento

En un tubo de ensayo se mezcló 100µl de Buffer fosfato, 10µl de tratamiento (control +, control – o [MP]) y 100µl de bacterias (TA98 y TA100). Para los ensayos en los que se empleó S9 como activador enzimático, la mezcla fue: 100µl de fracción S9, 10µl de tratamiento (control +, control – o [MP]) y 100µl de bacterias. Posteriormente los tubos se agitaron en vortex y se sometieron a un periodo de pre-incubación a 37°C por 30 minutos.

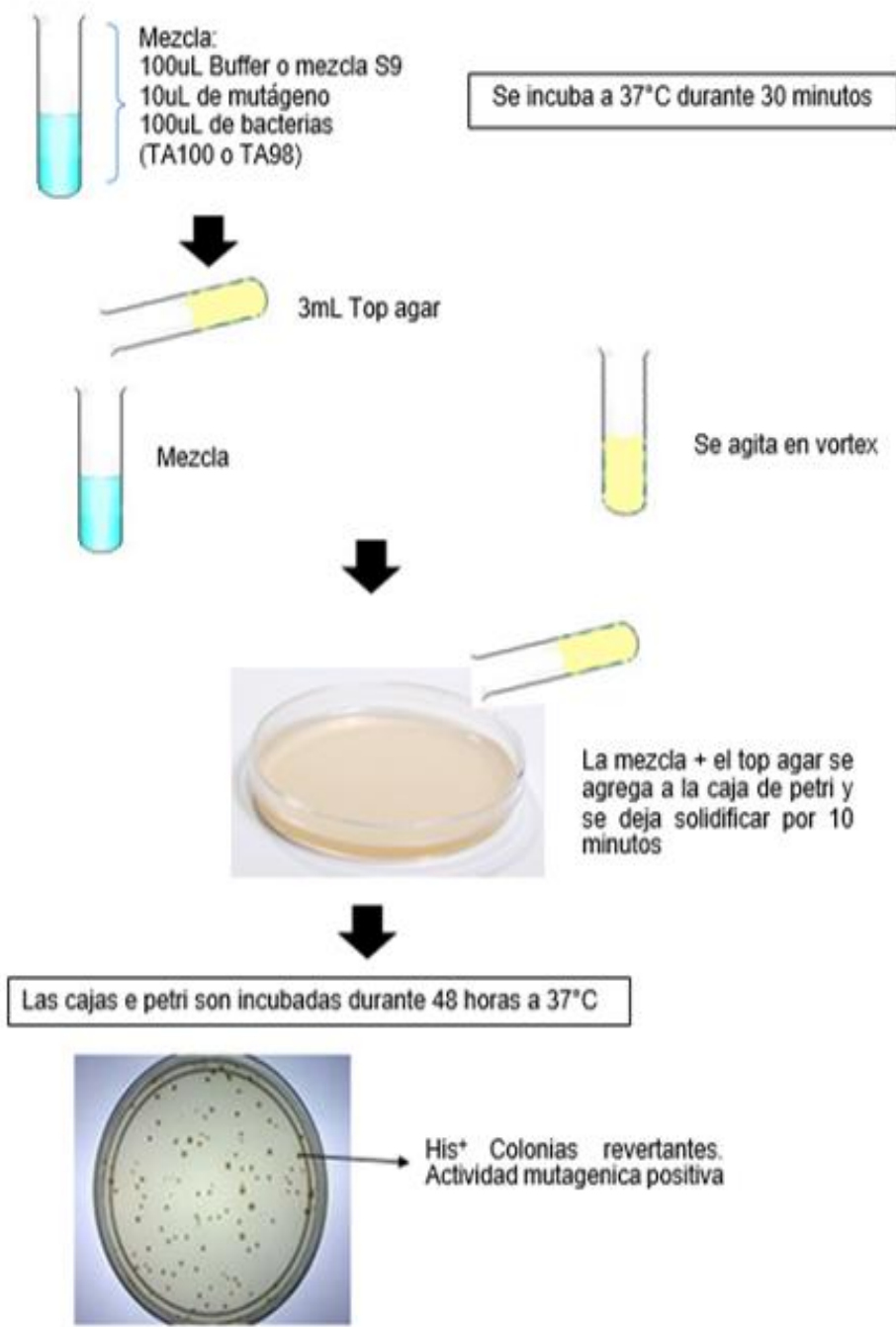
Dentro de los controles positivos empleados para realizar el test de mutagenicidad de Ames estuvieron: azida de sodio (AzNa), 4NQO y daunomicina (sin S9) y 2-Aminofluoreno (con S9). El control negativo usado en cada ensayo fue Buffer fosfato.

6.9 Incorporación de los tratamientos (bacterias, ± S9, []) a las cajas

Al contenido de cada tubo (bacterias, [MP], S9 o buffer) se le agregó 3ml de top agar líquido, se agitó en vortex y se vertió en cajas de Petri con agar mínimo (sin histidina). Finalmente fueron llevados a la incubadora a 37°C durante 72 horas, después de las cuales se realizó el conteo de las colonias revertantes de manera manual empleando un cuenta colonias.

| Cepa | TA 98 | | TA100 | |
|------------------|---|---|---|---|
| Tratamientos | + S9 | -S9 | +S9 | -S9 |
| Control + |  |  |  |  |
| Control - |  |  |  |  |
| Diesel [Baja] |  |  |  |  |
| Diesel [Media] |  |  |  |  |
| Diesel [Alta] |  |  |  |  |
| Palma [Baja] |  |  |  |  |
| Palma [Media] |  |  |  |  |
| Palma [Alta] |  |  |  |  |
| Jatropha [Baja] |  |  |  |  |
| Jatropha [Media] |  |  |  |  |
| Jatropha [Alta] |  |  |  |  |

Grafica 2. Montaje por ensayo. Se realizaron tres ensayos con duplicado.



Grafica 3. Protocolo de establecimiento de cultivos para la prueba de mutagenicidad de Ames (Ames et al. 1973).

6.10 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron sistematizados y analizados con el paquete estadístico SPSS versión 22.0 para Windows (SPSS Inc. Chicago). Se consideraron como variables independientes: las concentraciones del MP de cada uno de los combustibles y la fracción microsomal S9 y como variable dependiente la razón de mutagenicidad (RM).

Los datos se expresaron en IM que corresponde a la proporción del número de colonias revertantes de la placa de prueba (revertantes espontáneos inducidos) y el número de revertantes en la placa control (revertantes espontáneos), según la fórmula:

$$IM = \frac{RI}{RE}$$

Donde:

RM = Razón de mutagenicidad

RI = Revertantes inducidos

RE = Revertantes espontáneas

Los resultados fueron analizados aplicando estadística descriptiva, donde se tuvo en cuenta los valores de la media y desviación estándar de los valores obtenidos de colonias revertantes. Además se realizaron curvas dosis-respuesta para cada uno de los combustibles bajo las diferentes condiciones.

7. RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados de la prueba de mutagenicidad en las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, obtenidos de tres ensayos por duplicado para cada una de las concentraciones de PM de los diferentes combustibles Diésel y biocombustibles a base de aceite de Palma y aceite de *Jatropha*, los cuales fueron evaluados con y sin activación metabólica (S9).

La tabla 1, muestra los datos de mutagenicidad inducidos por cada uno de los combustibles en las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium*, con y sin S9. Los resultados obtenidos permitieron identificar una respuesta positiva por parte de los compuestos estudiados, se pudo evidenciar mayor sensibilidad en la cepa TA100, debido a que presentó mayor número de revertantes; además se logró identificar una respuesta positiva en tratamientos con S9 debido a la presencia de colonias revertantes, pero se presentó mayor actividad mutagénica en los tratamientos sin S9. El Diésel presentó un promedio de revertantes de 52.3 ± 16.5 colonias con S9 a una concentración de 31,2mg/eq y 37 ± 13.2 sin S9 a 125mg/eq en la cepa TA98; para la cepa TA100 se obtuvo una media de 179.7 ± 39.5 revertantes con S9 a 31,2mg/eq y 154.7 ± 13.6 sin S9 a 125mg/eq. Para el MP de aceite de Palma se presentó una media de 51 ± 11.1 colonias revertantes con S9 y 32.3 ± 2.1 revertantes sin S9 a 31,2 mg/eq en la cepa TA98 y para cepa TA100 la media de revertancia fue de 166 ± 7 a 125mg/eq con S9 y 160.7 ± 9.9 a 31,2mg/eq. El promedio de colonias revertantes obtenidas con el aceite de *Jatropha* fue 53.3 ± 14 colonias con S9 y 29.3 ± 8 sin S9 a una concentración de 125mg/eq en la cepa TA98 y para la cepa TA100 tuvo una media de 169.3 ± 42.4 colonias revertantes con S9 y 146.7 ± 2.5 colonias revertantes sin S9 a 31,2mg/eq. Además, en esta tabla, el control positivo 2-Aminofluoreno presentó una revertancia significativa, comparada con el control negativo (Buffer), ya que la media de mutaciones (his+ revertantes) alcanzada por el control positivo fue de 265 ± 27.8 en la cepa TA98 y de 693.3 ± 50.3 en la cepa TA100, permitiendo confirmar la eficiencia de las enzimas activadoras

(P450), presentes en la fracción microsomal S9. Por otro lado, el número de revertantes espontáneas registradas por el control negativo (buffer-P) fue de 53 ± 4.3 con S9 y 31 ± 7.8 sin S9, para la cepa TA98, y de 180.3 ± 36.9 con S9 y 138.7 ± 4.7 sin S9, para la cepa TA100. A partir de estos valores se consideró el potencial mutagénico del PM producto de la ignición de los tres combustibles empleados, resultados que fueron comprobados con la presencia de colonias revertantes, tal como se muestra en la fotografía 5.

Tabla 1. Mutagenicidad del PM en las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium* de Diésel (combustible fósil), aceite de Palma y aceite de Jatropha (biocombustibles), con y sin S9.

| Compuesto | Concentración de MP por plato (ug/eq) | Media His+ revertantes por Tto (\pm DS)* | | | |
|--------------------|---------------------------------------|---|------------------|------------------|------------------|
| | | TA98 | | TA100 | |
| | | +S9 | -S9 | +S9 | -S9 |
| H2O | 0 | $70 \pm 8,7$ | $36 \pm 14,5$ | $168,3 \pm 31,7$ | $114,7 \pm 4,7$ |
| Buffer | 0 | $53 \pm 4,3$ | $31 \pm 7,8$ | $180,3 \pm 36,9$ | $138,7 \pm 4,7$ |
| Diésel | 31,2 | $52,3 \pm 16,5$ | $26,3 \pm 3,1$ | $179,7 \pm 39,5$ | $139,3 \pm 7,4$ |
| | 62,5 | $47,6 \pm 3,8$ | $31,7 \pm 8,9$ | $168 \pm 13,2$ | 132 ± 1 |
| | 125 | 39 ± 8 | $37 \pm 13,2$ | $143,3 \pm 14,5$ | $154,7 \pm 13,6$ |
| Aceite de Palma | 31,2 | $51 \pm 11,1$ | $32,3 \pm 2,1$ | $157,3 \pm 26,7$ | $160,8 \pm 9,9$ |
| | 62,5 | $34 \pm 5,3$ | $30,6 \pm 3,1$ | $163,7 \pm 31,7$ | $147 \pm 1,8$ |
| | 125 | $37,6 \pm 3,5$ | $26 \pm 5,3$ | 166 ± 7 | $151,3 \pm 6,1$ |
| Aceite de Jatropha | 31,2 | $31,3 \pm 5,9$ | $21,3 \pm 0,6$ | $169,3 \pm 42,4$ | $146,7 \pm 2,5$ |
| | 62,5 | $36 \pm 3,6$ | $26,3 \pm 2,5$ | $166,3 \pm 23,0$ | $130,3 \pm 4,2$ |
| | 125 | $53,3 \pm 14,0$ | $29,3 \pm 8,0$ | $156 \pm 17,4$ | 134 ± 12 |
| 4NQO | 0,5 | | $2950 \pm 86,6$ | | |
| Daunomicina | 6 | | $1618 \pm 635,6$ | | |
| AzNa | 0,5 | | | | $966,7 \pm 57,7$ |
| 2AF | 10 | $265 \pm 27,8$ | | $693,3 \pm 50,3$ | |

*Los valores son medidas de tres experimentos realizados, cada uno por duplicado.

Buffer: Control negativo.

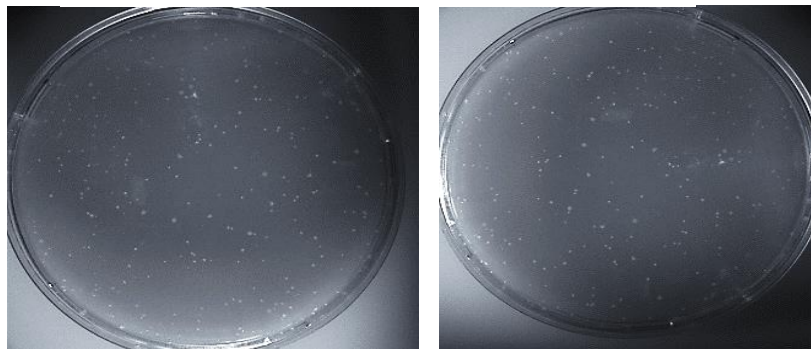
4NQO: 4- Nitroquinolina-oxido, control positivo.

Daunomicina: Control negativo.

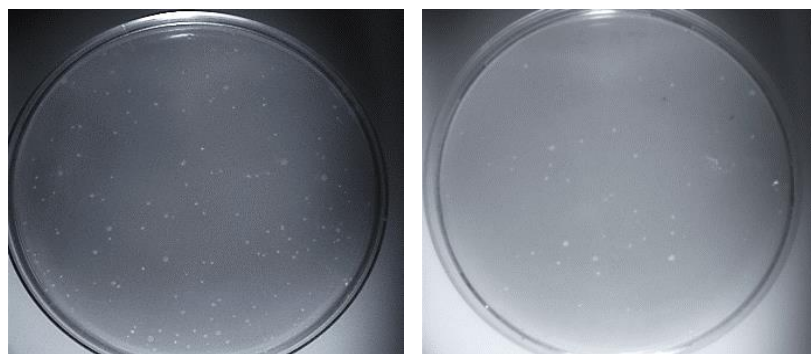
AzNa: Azida de sodio, control positivo.

2AF: 2- aminofloreno, control positivo.

Salmonella typhimurium, cepa TA100



Salmonella typhimurium, cepa TA98



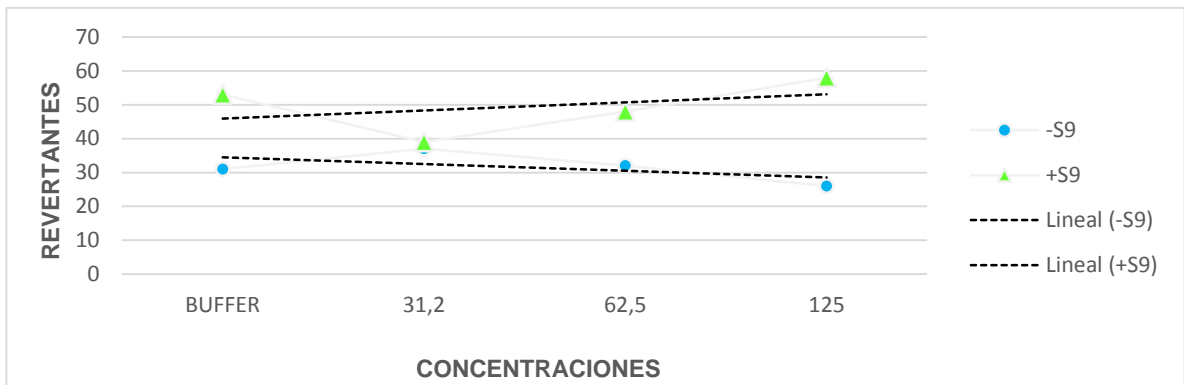
Fotografía 5. Mutagenicidad inducida por MP en *Salmonella typhimurium*.

El análisis de correlación entre la actividad mutagénica y las diferentes dosis evaluadas se muestran en las gráficas de la 4 a la 9, las cuales revelan la actividad mutagénica en cada una de las cepas de *Salmonella typhimurium*. El coeficiente de correlación R^2 , permite observar la curva dosis-respuesta del PM de los combustibles a diferentes concentraciones (buffer, 125ug/eq, 62.5ug/eq, 31,2ug/eq) vs el promedio de revertantes espontaneas en presencia y ausencia de la fracción microsomal S9 para cada una de las cepas TA98 y TA100.

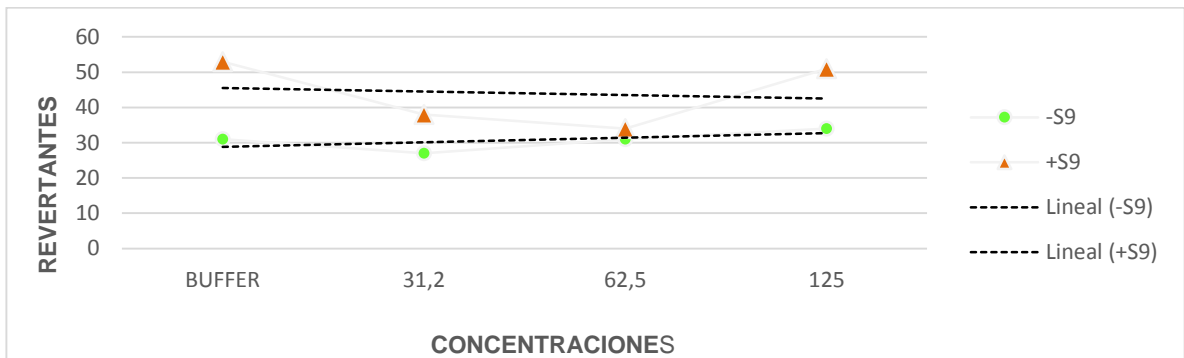
Las gráficas para la cepa TA98 tratadas con PM de Diésel con S9 (grafica 4) y tratadas con PM de aceite de Palma sin S9 (grafica 5), presentaron una curva dosis-respuesta con una pendiente positiva, lo cual indica que la mutagenicidad de estas sustancias es directamente proporcional a las concentraciones usadas, además

presentan un valor $R= 0,3279$ y $R=0,34$ respectivamente, indicando, que el 32% de las colonias revertantes es causada por la acción del MP del Diésel y el 34% de la actividad mutagénica está relacionada con el PM del aceite de palma. Por el contrario, los resultados obtenidos con el PM de aceite de Jatropha con y sin S9 (grafica 6), trazaron una curva dosis-respuesta con una pendiente negativa, la cual permitió determinar la disminución de la mutagenicidad a medida que aumentaba la concentración.

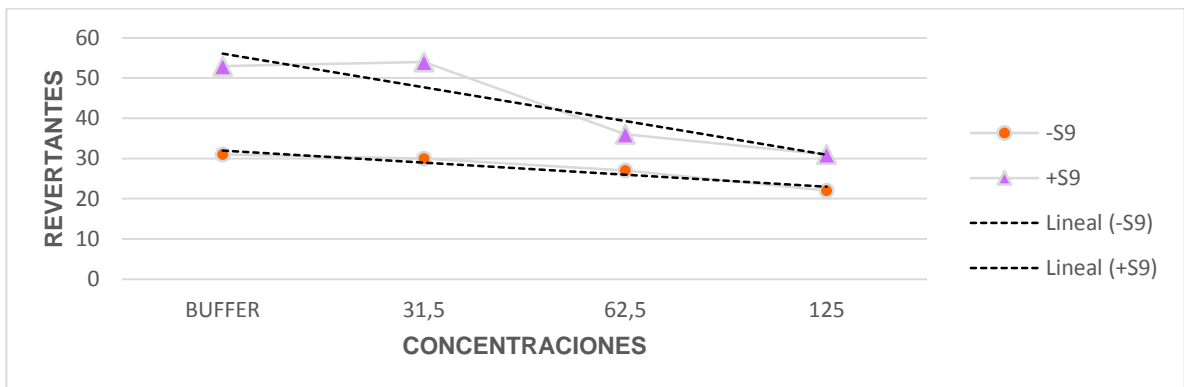
Para las gráficas pertenecientes a la cepa TA100, se pudo identificar que el MP procedente del Diésel en presencia y ausencia de activador metabólico (grafica 7), y el biocombustible elaborado a base de aceite de Palma, tratado sin S9 (grafica 8), así como también el biocombustible a base de aceite de Jatropha tratado con y sin S9 (grafica 9) presentaron una respuesta mutagénica positiva, la cual fue determinada por una curva dosis-respuesta ascendente, que permitió identificar el incremento de colonias revertantes a medida que aumentó la concentración del MP. Estos valores lanzaron un valor R, el cual permitió determinar el porcentaje de relación encontrado entre las colonias revertantes y el MP de los combustibles, presentando el Diésel un $R=0,20$, es decir el 20% de las colonias revertantes se debe a la acción realizada por el PM del Diésel, mientras que el biocombustible a base de aceite de Palma presentó un $R= 0,73$, indicando que el 73% de la respuesta mutagénica está relacionada con el PM del aceite de palma y para el aceite de Jatropha se presentó un $R=0,30$ en presencia de S9 y $R=0,20$ en ausencia de S9, en el cual el 30% y 20% respectivamente de PM se encuentran relacionados con la respuesta mutagénica.



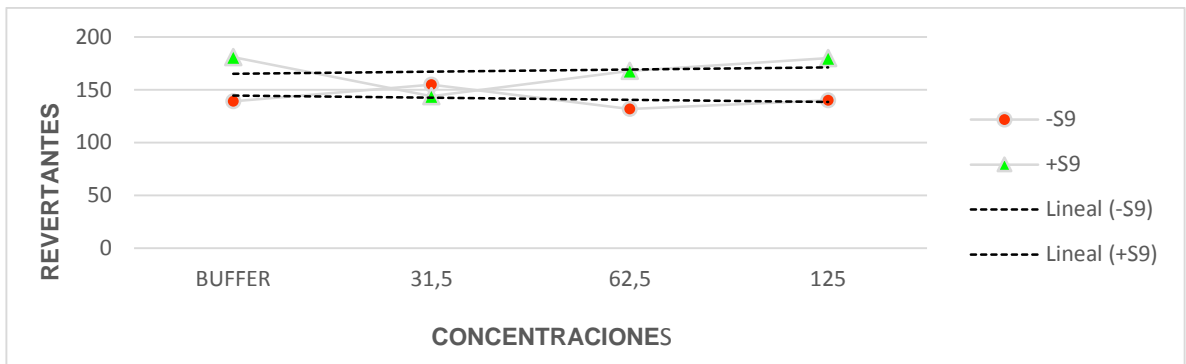
Grafica 4. Curva dosis- respuesta de MP de Diésel en la cepa TA98 con y sin S9



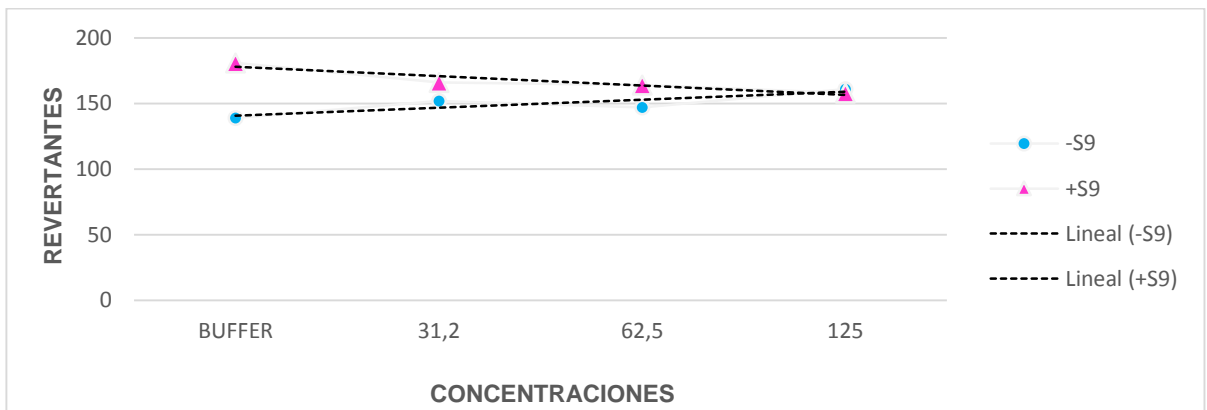
Grafica 5. Curva dosis- respuesta de MP de aceite de Palma en la cepa TA98 con y sin S9



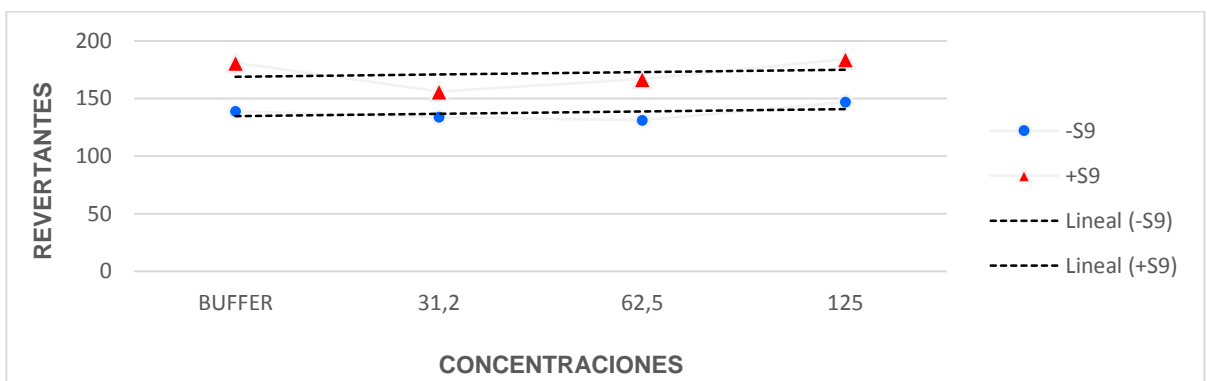
Grafica 6. Curva dosis-respuesta de MP de aceite de Jatropha en la cepa TA98 con y sin S9



Grafica 7. Curva dosis-respuesta de MP de Diésel en la cepa TA100 con y sin S9



Grafica 8. Curva dosis-respuesta de MP de aceite de Palma en la cepa TA100 con y sin S9



Grafica 9. Curva dosis-respuesta de MP de aceite de Jatropha en la cepa TA100 con y sin S9

Adicionalmente se calcularon los valores de índice mutagenicidad (IM) para cada uno de los combustibles evaluados (combustible fósil y biocombustibles) a diferentes concentraciones. Los valores obtenidos se clasificaron según el IM obtenido, si el $IM < 1$ la sustancia de estudio se clasifica como tóxica, pero si por lo contrario la sustancia presenta un $IM > 1$, esta se clasifica como mutagénica.

En la tabla 2 se exponen los valores del IM para cada una de las concentraciones de MP de los combustibles evaluados con la cepa TA98 y TA100 y el uso o no del activador metabólico S9. Dentro de los resultados obtenidos, se puede determinar que el MP del Diésel, aceite de Palma y aceite de Jhatropha presentan una respuesta tóxica a las concentraciones empleadas, ya que mostraron un $IM < 1$. Pero solo se presentó respuesta mutagénica con el MP originado del Diésel y del aceite de Palma, debido a que registraron in $IM > 1$. Los resultados obtenidos de MP de Diésel presentaron respuesta mutagénica en la cepa TA98 con S9 cuando fueron expuestas a una concentración de 125mg/eq y en la cepa TA98 y TA100 para 31,2mg/eq sin S9. Dentro de los biocombustibles empleados fue el MP obtenido de aceite de Palma el único que presentó una respuesta mutagénica, efecto registrado en las cepas TA98 y TA100 a una concentración de 125mg/eq en ausencia del activador metabólico y a 31,2mg/eq en la cepa TA100 con activador metabólico.

Tabla 2. Valor de la razón de mutagenicidad de los diferentes combustibles a diferentes concentraciones.

| | IM COMBUSTIBLE | | | | | | | | | | | |
|---------------|----------------|-----|-------|-----|-----------------|-----|-------|-----|--------------------|-----|-------|-----|
| | DIESEL | | | | ACEITE DE PALMA | | | | ACEITE DE JATROPHA | | | |
| | TA98 | | TA100 | | TA98 | | TA100 | | TA98 | | TA100 | |
| | +S9 | -S9 | +S9 | -S9 | +S9 | -S9 | +S9 | -S9 | +S9 | -S9 | +S9 | -S9 |
| BUFFER | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 125 | 1,1 | 0,8 | 1 | 1 | 1 | 1,1 | 0,8 | 1,6 | 0,6 | 0,8 | 1 | 1 |
| 62,5 | 1 | 1 | 0,9 | 0,9 | 0,6 | 1 | 0,9 | 1 | 0,7 | 0,9 | 0,9 | 0,9 |
| 31,2 | 0,7 | 1,2 | 0,8 | 1,1 | 0,7 | 0,9 | 1,1 | 0,9 | 1 | 1 | 0,9 | 1 |

8. DISCUSIÓN

El aumento de los niveles de polución ambiental a causa de la producción del PM originado de la combustión de diferentes tipos de combustibles, se ha convertido en un problema de salud pública, ya que los diferentes componentes químicos que forman parte de PM reaccionan con el material genético de las células por medio de mecanismos de defensa y reparación, una vez el PM ingresa al cuerpo, se genera el metabolismo de sustancias químicas transformándolas en metabolitos más tóxicos, los cuales reaccionan con el ADN de las células basales cuando se depositan en los diferentes tejidos del cuerpo como la piel y vías respiratorias (American Lung Association, 2011; Brook et al., 2002), daños que afectan la calidad de salud de la población humana desencadenando alergias, enfermedades respiratorias y diferentes tipos de cáncer (Zmirou D., et al. 2000; Mills N., et al. 2005). Además, la mutagenicidad del MP está relacionada con la fuente y concentración de los lípidos que contienen los combustibles fósiles y biocombustibles, que durante la combustión la fracción lipídica varía el nivel de toxicidad generado por las partículas (Hsiao et al., 2000). La presencia de lípidos en el PM es una característica asociada a los combustibles ya que de esta manera se obtuvo el extracto del PM procesado, presentando mayor densidad los extractos del PM de aceite de Palma y aceite de Jatropha.

Esta problemática ha desencadenado el interés de diferentes áreas de investigación con el fin de encontrar soluciones a dicho inconveniente, muchos estudios se han centrado en la evaluación de PM de combustible fósil y otros en evaluar el PM de biocombustibles, además la mayoría de los estudios se han enfocado en el impacto ambiental generado por estas partículas, siendo pocos los relacionados con efectos en la salud principalmente por combustibles fósiles; por esta razón aún son desconocidas los efectos tóxicos y el mecanismo de acción del MP proveniente de biocombustibles.

Actualmente existen gran cantidad de ensayos destinados a predecir el riesgo tóxico, genotóxico y mutagénico de productos químicos a los que se encuentra expuesto continuamente el hombre. La existencia de tantos ensayos dirigidos a identificar la genotoxicidad o mutagenicidad, indica claramente que ninguno de ellos, por sí solo, puede suministrar todos los datos necesarios para establecer dicho riesgo, siendo indispensable el uso de un conjunto de test o pruebas in vivo y/o in vitro (Vicente A, et al. 1995).

El test de Ames, una prueba in vitro, permite determinar mutaciones génicas. En este caso permitió identificar el daño generado por los combustibles, además se pudo reconocer el mecanismo de acción generado por xenobióticos y si su acción es directa o indirecta por medio del uso de la fracción microsomal S9.

En esta investigación se evaluó la capacidad mutagénica del MP de tres combustibles diferentes Diésel, aceite de Palma y aceite de Jatropha, mediante tres ensayos con duplicado, usando tres concentraciones diferentes de cada combustible (31.2, 62.5 y 125 ug/eq). Como referencia para cada ensayo se tomaron los “valores históricos” de colonias revertantes para cada cepa, rangos establecidos por el Laboratorio de Mutagénesis de la Universidad de Antioquia; para la cepa TA98 con y sin S9, las revertantes se encuentran entre 20-35 y para la cepa TA100 con y sin S9, el número de revertantes referencia se encuentra entre 75-90 (Universidad de Antioquia, 2009). Los resultados obtenidos permitieron observar que el número de revertantes varía según el tipo de cepa bacteriana empleada, esto se presenta porque cada una de las cepas usadas se diferencian según el lugar de mutación en el operón histidina, además de esta alteración las cepas también presentan otras modificaciones que generan variabilidad en el número de revertantes espontaneas (Trossero C., et al. 2006). En este caso la cepa TA100 es la que presentó mayor sensibilidad al registrar gran cantidad de colonias revertantes.

Los resultados confirmaron que el PM de Diésel es mutagénico, debido a que presentó un IM mayor a 1, esta sustancia se caracterizó por actuar de manera directa e indirecta con el ADN al encontrarse en presencia o no de un activador metabólico, causando daño en el material genético y produciendo corrimiento en el marco de lectura por la ganancia o sustitución de un par de bases. Este efecto se presentó en concentraciones de 125mg/eq en la cepa TA98 con S9 y en 31,2mg/eq en ambas cepas sin S9, además, el PM perteneciente al Diésel también presentó una respuesta tóxica en todas las concentraciones tratadas; resultados que coincidieron con estudios anteriormente realizados por Zmirou D., et al. 2000 y Mills N., et al. 2005, donde se afirma que el PM originado del Diésel es un contaminante altamente peligroso, debido a sus propiedades cancerígenas y tiene la capacidad de causar problemas respiratorios y cardiovasculares así como reacciones alérgicas. Conjuntamente, la toxicidad de los combustibles fósiles se debe también a que son sustancias que presentan una serie de compuestos altamente tóxicos y peligrosos para la salud entre los que se encuentran transformación de metales e incineración de residuos de Plomo (Pb), Cadmio (Cd), Zinc (Zn), Cobre (Cu), Níquel (Ni), Vanadio (V), Antimonio (Sb) (Gao et al., 2002).

También se puede determinar que entre los biocombustibles el aceite de Palma es el que presentó mayor actividad mutagénica al registrar un IM mayor a 1 en ambas cepas, la respuesta mutagénica se presentó bajo concentraciones de 125mg/eq en ambas cepas sin S9 y a una concentración de 31,2mg/eq en la cepa TA98 con S9, generando corrimiento en el marco de lectura por la inserción de pares de bases, lo cual afecta la molécula de ADN. Pero el PM del biocombustible elaborado a base de aceite de Jatropha no mostró respuesta mutagénica, esta sustancia presentó una respuesta tóxica en todas sus concentraciones, en presencia y ausencia del activador metabólico, al igual que el combustible a base de aceite de Palma. Estos resultados coinciden parcialmente con los realizados por Westphal., et al. 2014, en el cual indica que combustibles a base de aceite de Jatropha y aceite de Colza presentan una alta mutagenicidad en las cepas TA98 y TA100 en presencia de S9,

así como también lo demuestra la investigación realizada por Jügen., et al. 2009, en la cual se demuestra mayor efecto mutagénico del biocombustible a base de aceite de colza y un efecto menor con gas natural y petrodiesel en las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium*, pero resultan contradictorios con investigaciones anteriormente realizadas, por autores como Eckl P., et al. 2012, quienes señalan que los combustibles a base de extractos vegetales disminuyen la mutagenicidad al ser comparados con combustibles fósiles como Diésel en la cepa TA98 y TA100, de igual manera estudios ambientales también afirman que los biocombustibles reducen la producción de material particulado y sus efectos tóxicos en la salud (Rojas N., 2004).

Al mismo tiempo, dentro de los valores registrados para los tratamientos con S9 se pudo observar que en los tres tipos de combustibles el número de colonias revertantes disminuía, esto se presentó posiblemente a que los mutágenos que forman el PM, presentan propiedades electrofílicas, lo cual les permite conjugarse con ciertas proteínas metabólicas presentes en la mezcla S9, causando la pérdida de su actividad mutagénica así como también el citocromo P450 presente en la mezcla S9 puede perder su actividad metabólica y disminuir su efecto tal como se evidencia en estudios ya realizados por Cortes J., et al 2014 y Meléndez I. et al., 2001.

Estudios han demostrado que los combustibles fósiles generan mayor daño tanto al medio ambiente como a la salud y afirman que los biocombustibles son menos perjudiciales, al causar menor cantidad de PM y un menor impacto en el organismo. Pero nuestro estudio permite afirmar que tanto los combustibles fósiles como los biocombustibles son perjudiciales para la salud debido a que las aeropartículas respirables originadas por la combustión de los carburantes evaluados causan daño en el ADN, lo cual se evidenció por la respuesta tóxica y mutagénica obtenida de los tres combustibles evaluados, esta respuesta se generó debido a que el PM de ambos tipos de carburantes (fósiles y biocombustibles) contiene gran cantidad de

compuestos químicos y biológicos como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), óxidos de nitrógeno (NOx), dióxido de azufre (SO₂), monóxido de carbono, benzo(a)pireno, metales pesados, dioxinas, derivados nitro-aromático, nanopartículas de carbono, sales, materiales carbonosos, compuestos orgánicos volátiles (COV) y endotoxinas (Murillo J., 2003); sustancias que permiten al MP tener la habilidad para revertir la mutación histidina en la bacteria, permitiendo evidenciar su toxicidad y mutagenicidad (Billet et al., 2007).

Esta investigación determinó el mecanismo de acción del PM con el ADN, pues el PM evaluado actúa de manera directa e indirecta con el material genético y generan daño en la célula al originar mutaciones por sustitución e inserción de pares de bases, lo cual causa corrimiento del marco de lectura de la cadena de ADN. También, los resultados de esta investigación contribuyen con los objetivos planteados en el área de toxicología genética, debido a que confirman los resultados positivos de estudios anteriormente realizados sobre el daño y la capacidad mutagénica del PM de combustibles, efectos generados por factores ambientales que afectan la calidad de salud humana.

9. CONCLUSIONES

- El MP originado de combustible fósil (Diésel) y los biocombustibles (Aceite de palma y Aceite de Jatropha), causan afecciones en el material genético y por ende en la calidad de la salud humana, debido a que el MP de estos combustibles contienen gran cantidad de sustancias químicas, las cuales afectan y ponen en peligro la calidad de vida de la población.
- Las aeropartículas respirables, originadas de la combustión de carburantes generan en la cadena de ADN adición y pérdida de pares de bases, causando corrimiento en el marco de lectura, lo cual ocasiona posiblemente afecciones en la salud.
- El PM de los diferentes combustibles empleados, son sustancias que interactúan de manera directa sin necesidad de la intervención de un activador metabólico, o pueden ser sustancias de carácter indirecto, las cuales necesitan de un activador metabólico para ser metabolizados e interactuar con el ADN, afectando así su estructura molecular.
- Los compuestos presentes en el MP, producto de la combustión incompleta de diésel, aceite de palma y aceite de Jatropha, generan daños en el material genético afectando su estructura, así mismo afectan la respuesta metabólica de proteínas, al disminuir o anular su efecto.
- El incremento en el uso de combustibles alternos ha incrementado los casos de enfermedades respiratorias crónicas y aparición de cáncer de pulmón, debido a la continua combustión de los carburantes.

10. RECOMENDACIONES

- Hacer un estudio empleando cepas diferentes como TA102, TA97, las cuales permitirán obtener resultados más detallados acerca del mecanismo de acción generado por el MP de los combustibles.
- Realizar la evaluación del MP de los combustibles (fósiles y biocombustibles), empleando diferentes biomarcadores como la técnica de micronúcleos, cometa, aberraciones cromosómicas, etc. Este tipo de técnicas permitirán tener un conocimiento más cercano al efecto generado por el material particulado en el ADN.
- Evaluar el efecto generado por el MP originado por otros tipos de biocombustibles y biomasa, tanto por medio del test de Ames como empleando diferentes técnicas.
- Realizar monitoreo de calidad de aire y salud humana, como consecuencia de la continua producción y altas concentraciones de MP generado por la combustión de diferentes tipos de combustibles.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Ames, B., Durston, W., Yamasaki, E., & Lee, F. (1973). "Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70(8): 281-285.
- Ames, B., Lee, F., & Durston, E. (1973). "An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70(3): 782–786.
- Arciniegas, C. (2012). "Diagnóstico y control de material particulado: partículas suspendidas totales y fracción respirable PM10". *Luna Azul*. 34 1909-2474
- Arias, A., & Rangel, F. (2012). "Bioenergía y ecológico no son sinonimos." *Revista Elementos* 90(20): 14-16.
- Arrebola, D., & Fernández, L. (2003). "Métodos de conservación de cepas de *Salmonella typhimurium* utilizadas en el ensayo de Ames." *Revista de toxicología en línea* 1(12): 14-16
- Arregui, A., Laborda Ezquerria, K., & Conget López, F. (2007I). Neumonía lipoidea en relación con una aspiración accidental de gasóleo. In *Anales de medicina interna* 24(4): 187-189.
- Bello, J., & Lopez, A., (2001). "Fundamentos de Ciencia Toxicologica". Ediciones Diaz de Santos. Paginas: 75-95.

- Billet, S., Garc-on, G., Dagher, Z., Verdin, A., Ledoux, F., Cazier, F., Courcot, D. Aboukais, A., y Pirouz, S.P. (2007). Ambient Particulate Matter (PM2.5): Physicochemical characterization and metabolic activation of the organic fraction in human lung epithelial cells (A549). *Environmental Research*, 105, 212-223.
- Biocombustibles en Colombia. (2009) (1st ed., pp. 5, 6, 7, 8, 9, 11, 22). Bogotá. Retrieved http://www.upme.gov.co/Docs/Biocombustibles_Colombia.pdf
- Bomb, C., McCormick, K., Deurwaarder, E., & Kåberger, T. (2006). "Biofuels for transport in Europe: Lessons from Germany and the UK." *Energy Policy* 35(4): 256-267.
- Brook, R., Brook, J., Urch, B., Vincent, R., Rajagopalan, S., & Silverman, F. (2002). "Inhalation of fine particulate air pollution and ozone causes acute arterial vasoconstriction in healthy adults". *Circulation* 105(13) 534-536.
- Caballero, A., & de Neumologia, J. D. S (2006). "Inhalacion de gases toxicos". *Barcelona: Servicio de Neumología de la Clínica San Pedro Claver*.
- Calderon, M., Gómez, A., Royo, S., Villalobos, Piektrini, R., Butterworth, F., & Amador, O. (2004). "The effects of seasonal weather on the genotoxicity and organochemical content of extracts of airborne particulates in Mexico City". *Elsevier* 558(1-2): 7-17
- Calidad del aire ambiente (exterior) y salud. (2015). Organización Mundial de la Salud. Retrieved 29 September 2015, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs313/es/>

- Cann, J., Choi, E., Yamasaki, E., & Ames, B. (1975). "Detection of carcinogens as mutagens in the salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals." *Medical Sciences* 72(12): 135-139.
- Cortes, J., Gomez, S., Teloxa, H., Gomez, B., & Villalobos, R. (2014) "Efecto del insecticida gusación en *Salmonella typhimurium* cepas TA98 y TA100 transformado por el metabolismo vegetal y animal" *Revista internacional de contaminacion ambiental*. 30, 37-44.
- Cuellar, M. C., & Torres, J. A. (2007). "Posibilidades del Biodeiesel de palma y sus mezclas con diesel en Colombia". *Revista Palmas* 28 (especial), 63-72.
- Delgado, A., & Táquez, M. (2012). "Evaluación de la mutagenicidad en aguas del Río Cauca en la ciudad de Cali utilizando el test de Ames". <http://bibliotecadigital.univalle.edu.co/bitstream/10893/3923/4/CB-0439280.pdf> Teis Doctoral: 17-20.
- Delgado, A., Minguillon, C., & Joglar, J. (2003). "Introduccion a la quimica terapeutica". Ediciones Diaz de Santos. Pag. 67-95.
- De Vita, V., Hellman, S., & Rosenberg, S. (1990). "Cáncer, principios y práctica oncológica". Salvat Editores. 143, 399.
- Eckl P., Leikermoser P., Wörgetter M., & Wurst F. (2012). "The mutagenic potential of Diesel and Biodiesel exhausts". *Plant Oils as Fuels: Present State of Science and Future Developments*.
- *El Grupo del Banco Mundial*. (2015). *El Grupo del Banco Mundial*. Retrieved 15 March 2015, from <http://www.bancomundial.org/>
- Estévez García, J.A. (2010). "Exposición laboral a contaminación atmosférica: material particulado y efectos respiratorios en la salud de

policías de tránsito de Bogotá, 2008-2009/Occupational exposure to atmospheric contamination: particulate matter and respiratory health effects on traffic police officers in Bogotá, Colombia 2008-2009". Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Colombia.

- Exposición a PM10 en áreas urbanas 2008-2013. (2014). Retrieved from http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_pm10_countries.png
- Franco, C., Flórez, A., & Ochoa, M. (2008). "Análisis de la cadena de Suministro de Biocombustibles en Colombia". *Revista de Dinamicade Sistemas* 4(2): 109-133.
- Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia. (2013). [fedebiocombustibles.com](http://www.fedebiocombustibles.com). Retrieved 3 January 2015, from <http://www.fedebiocombustibles.com/nota-web-id-1347.htm>
- Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia. (2016). [fedebiocombustibles.com](http://www.fedebiocombustibles.com). Retrieved 9 October 2016, from http://fedebiocombustibles.com/v3/estadistica-mostrar_info-titulo-Biodiesel.htm
- Fernández, C., Ponce, A., Andrade, M., Ramírez, L., & Vecchyo, C. (2003). "Evaluación de la mucosa bucal en sujetos sometidos a contacto crónico con diesel (tragafuego)." *Cirugia Plastica* 13(3):115-118.
- Ferreyra, M., & Arancibia, H. (2008). "Análisis de la genotoxicidad de material particulado recolectado en dos ciudades de la Provincia de Córdoba, Argentina, mediante el ensayo de micronúcleos." *Theoria* 17(1): 33-40.

- Fubini, B., & Hubbard, A. (2008). "Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis". *Free Radical Biology and Medicine* 34(12):15-16.
- García, M. J. N., & Triñanes, P. G. (2006). BIOCOMBUSTIBLES: Bioetanol y Biodiesel. *Boletín das ciencias*, 19(61), 179-180
- Garcia, H. & Calderon, L. (2012). Retrieved 19 October 2014, from <http://www.fedesarrollo.org.co/wp-content/uploads/2011/08/Evaluaci%C3%B3n-de-la-pol%C3%ADtica-de-Biocombustibles-en-Colombia.pdf>
- García Ruíz, R., León, M. D., González, P., Insua, F., & Alcántara, A. (1978). La colza oleaginosa. *Hojas*, 17, 1-20
- Gao, Y., Nelson, E.D., Field, M.P., Ding, Q., Li, H., Sherrell, R.M., Gigliotti, C.L., Van Ry, D.A., Glenn, T.R., y Eisenreich, S.J. (2002). Characterization of atmospheric trace elements on PM2.5 particulate matter over the New York–New Jersey harbor estuary. *Atmospheric Environment*, 36, 1077-1086.
- Gonzales, H. (2004). "Estudio básico del uso de la tecnología de destilación reactiva en la hidrodesulfuración profunda del diesel".* <http://148.206.53.84/tesiuami/UAMI11651.pdf> Tesis de Mestria.
- Granados, B., Albaladejo, R., Villanueva, R., Anadón, MJ., & Domínguez, V. (2004). "Mutagenicidad en aguas de consumo mediante el test de reversión trp- en *Escherichia coli*". *Revista Toxicol* 21: 87-91
- Guimaraes, T., Domingos, M., Alves, S., Caldini, R., Lobo, A., Lichtenfels, A., & Saldiva, P. (2000). "Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of Sao Paulo (Brazil) with the Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) assay". *Environmental and Experimental Botany* 44(1): 1-8.

- Hernandez, M., & Hernandez, J. (2007). "Verdades y Mitos". *Elementos: ciencia y cultura* (071): 15-16.
- Indupalma. (2014). indupalma. Retrieved November 2014, <http://www.indupalma.com/aceite-de-palm>
- Infinita Renovables, Informe Sectorial Biodiesel, 2015.
- Knaapen, A., Borm, P., Albrecht, C., & Schins, R. (2004). "Inhaled particles and lung cancer". *Mechanisms. International Journal of Cancer*, 109(6): 799-809.
- Maron D.M. y Ames B.N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113, 173-215.
- McCann, J., E. Choi, E. Yamasaki and B. N. Ames (1975). "Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **72**(12): 5135-5139.
- Meléndez, I., Martínez, M., & Quijano, A. (2012). "Actividad mutagénica y genotóxica en el material particulado fracción respirable MP2, 5 en Pamplona, Norte de Santander, Colombia." *Iatreia*, 25(4): 347-356.
- Melendez, I., Zuleta, M., Marin, I., Calle, J., & Salazar, D. (2001). "Actividad mutagénica de aguas de consumo humano antes y despues de clorar en la planta de Villa Hermosa, Medellin" *IATREIA* 14(3).

- Mendoza, L., Orozco, L., Zapata, L., & Palacio, A. (2013). "Genotoxicidad sobre linfocitos humanos expuestos a PM". *Revista de Salud Pública*, 15(2): 294-306.
- Mills NL, Törnqvist H, Robinson SD, Gonzalez M, Darnley K, MacNee W, et al. Diesel exhaust inhalation causes vascular dysfunction and impaired endogenous fibrinolysis. *Circulation*. 2005 Dec 20;112(25):3930–6.
- Ministerio de minas y energia. (2010). "Proyección de Demanda de Combustibles Líquidos y GNV en Colombia, Revisión Octubre de 2010 upme"
- Montoya, J. M. (2010). "Potencial y riesgo ambiental de los bioenergéticos en México". *Ra Ximhai*, 6(1), 57-62.
- Moreno, A., & Carrillo, E. (2002). "Técnicas de estudio de la mutagenicidad." *Revista de higiene y sanidad ambiental*, 2: 26-32.
- Mujumdar, A., & Misar, A. (2004). "Anti-inflammatory activity of *Jatropha curcas* roots in mice and rats". *Journal of Ethnopharmacology*, 90(1): 11-15.
- Murillo J. (2003). "Producción de biodiesel a partir de aceite de Palma". <http://www.bdigital.unal.edu.co/1191/1/jorgeeduardomurillovaldes.2003.pdf>
Tesis.
- N.Y. Rojas, editor. *Material particulado atmosférico y salud*. Ediciones Uniandes. Facultad de ingeniería. Universidad de los Andes, Bogotá D.C., 2005.
- Obtención de PM. (2013). Universidad de Antioquia.

- Olea. (2012) (1st ed., pp. 14, 15, 16, 18, 21, 34, 35). Santiago de Cali. Retrieved from http://bibliotecadigital.icesi.edu.co/biblioteca_digital/bitstream/10906/68596/1/olea_optimizacion_proceso.pdf
- Oliva, R. (2004). *Genética médica* (3rd ed., pp. 58,59,60). España: i Edicions. Retrieved https://books.google.com.co/books?id=9sCJ80bEsRsC&pg=PA52&dq=tipos+de+mutaciones&hl=es-419&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=tipos%20de%20mutaciones&f=false
- Ostro B., Sanchez, J., Aranda, C., & Eskerland, G. (1996). "Air pollution and mortality: results from a study of Santiago, Chile". *Environmental Health Perspectives*, 107(1): 97-114.
- Pilinis, C., Seinfeld, J. (1987). "Continued development of a general equilibrium model for inorganic multicomponent atmospheric aerosols. Atmos". *Environment*, 21(11): 453-466.
- Producción de biocombustibles en Colombia crecerá en 2014. (2014). Retrieved from <http://www.elpais.com.co/elpais/economia/noticias/produccion-biocombustibles-colombia-crecera-2014>
- Universidad de Antioquia,. (2009). *Protocolo ENSAYO DE MUTAGENICIDAD EN Salmonella typhimurium (Test de Ames)*.. Medellín.
- Quijano, A., Castillo, C., Melendez, I. (2015). "Potencial mutagénico y genotóxico de aguas residuales de la curtiembre tasajero en la ciudad de

cúcuta, Norte de Santander, Colombia". Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica 18 (1): 13 - 20.

- Rivara, M., & Corey, G. (1995). "Tendencia del riesgo de morir por cánceres asociados a la exposición crónica al arsénico". International Congress, 39-51.
- Rojas, N. Y. (2004). "Revisión de las emisiones de material particulado por la combustión de diesel y biodiesel". Revista de Ingeniería, (20): 56-66.
- Romana, V., Villanueva, R., Ortega, P., Astasio, P., Gil, A., Granados, B., Calle, M., & Dominguez, V. (1995). "Evaluación de la actividad mutagénica de aguas de consumo público por medio del test de Ames". Revista Española Salud Publica. 5(69): 393-408.
- Sierra, M., Guzman, A., Olivares, I., Torres, Y., & Hicks, J. (2004). "Participación de las especies reactivas del oxígeno en las enfermedades pulmonares". Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, 17(2), 135-148.
- Solari, A. J. (2004). "Genética Humana: fundamentos y aplicaciones en medicina". edición Médica Panamericana. pag. 143-146.
- Stratta, J. (2000). Biocombustibles: los aceites vegetales como constituyentes principales del biodiesel.
- Sánchez, E., & Salinas, D. (2010). "Caracterización morfofisiológica de *Jatropha curcas* L. variedad Brasil cultivada en dos zonas de Colombia". Acta Agronómica, 59(1): 30-36.

- Sandoval, A. (2006). "Ensayo de mutagenicidad con la bacteria *Salmonella typhimurim*". *Prueba de Ames*.
- Schins, R., (2002). "Mechanisms of genotoxicity of particles and fibres. *Inhalation toxicology*, 14(1): 66-80.
- Tchernitchin, A. (2011). "Análisis crítico de la nueva Norma Primaria de Calidad Ambiental para Material Particulado Fino Respirable MP2". *Cuad Méd Soc (Chile)*, 51(1): 24-28.
- Tortajada, J., Castell, J., Andreu, J., Domínguez, F., García, J., Tornero, O., & Conesa, A. (2001). "Enfermedades asociadas a la polución atmosférica por combustibles fósiles". *Rev Esp Pediatr*, 57(3): 213-225.
- Trossero, C., Cafferna, E., & Rizzotto, M. (2006). "Detección de Mutagenicidad en Compuestos N-Nitroso con el Test de Ames." *Acta farmacéutica bonaerense*, 25(1): 139.
- UNAD. (2015). Retrieved 14 March 2015, http://datateca.unad.edu.co/contenidos/358027/358027/leccin_7_genotoxicidad_mutagenesis_y_carcinogenesis
- Vicente, R. A., Orbaiz, R. V., Molina, P. O., & Arbiza, P. A. (1995). Evaluación de la actividad mutagénica de aguas de consumo público por medio del test de Ames. *Rev Esp Salud Pública*, 69(5), 393-408.
- Waters MD, Stack HF, Jackson MA, Brockman HE. (1996) Interpretation of short-term test data: implications for assessment of chemopreventive activity. *IARC 139*: 313-332.

- Wendy-Hsiao WL, Zi-Yao M, Ming F, Xin-mei S, Fu W. Cytotoxicity of PM2.5 and PM2.5–10 ambient air pollutants assessed by the MTT and the Comet assays. *Mutation Research*. 2000; 471:45–55.
- Westphal, G. A., Krahl, J., Munack, A., Rosenkranz, N., Schröder, O., Schaak, J., ... & Bünger, J. (2013). Combustion of hydrotreated vegetable oil and jatropha methyl ester in a heavy duty engine: emissions and bacterial mutagenicity. *Environmental science & technology*, 47(11), 6038-6046.
- Wilkinson, P., Smith, K.R., Davies, M., Adair, H., Armstrong, B. G., Barrett, M., & Chalabi, Z. (2009). "the Co-Benefits a Cookstove Intervention in India". *The lancet*; 374(9705), 1917-1929.
- WHO,. (2014). Exposion de PM2,5 en areas urbanas 2008-2013. Retrieved http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_pm25_countries.png
- World Health Organization. (2006). Guías de calidad del aire de la OMS relativas al material particulado, el ozono, el dióxido de nitrógeno y el dióxido de azufre. *Actualización mundial 2005*.
- World Health Organization. (2012). Guías de calidad del aire de la OMS relativas al material particulado.
- Zapata, S. (2013). "Una Aproximación a la liberación del mercado de los biocombustibles en Colombia". (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia)
- Zmirou D, Masclat P, Boudet C, Dor F, Déchenaux J. Personal exposure to atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in a general adult population

and lung cancer risk assessment. *J Occup Environ Med.* 2000 Feb;42(2):121–6

- Zuluaga, Q., Valencia, R., & Ortiz, T. (2009). "Efecto mutagénico y genotóxico de contaminantes atmosféricos". *Medicina UPB.* 28(1):32-41.