

DETERMINACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS
(PLOMO, CROMO, CADMIO Y MERCURIO)
EN AGUAS DEL RÍO CAUCA, EN LA ZONA URBANA DE LA CIUDAD DE CALI
Y EVALUACION DE LA MUTAGENICIDAD UTILIZANDO EL TEST DE AMES

RAMIRO SÁNCHEZ CHÁVEZ
TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS QUÍMICAS



UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA ACADÉMICO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS
SANTIAGO DE CALI
2014

DETERMINACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS
(PLOMO, CROMO, CADMIO Y MERCURIO)
EN AGUAS DEL RÍO CAUCA, EN LA ZONA URBANA DE LA CIUDAD DE CALI
Y EVALUACION DE LA MUTAGENICIDAD UTILIZANDO EL TEST DE AMES

RAMIRO SANCHEZ CHAVEZ

Trabajo de Investigación para Optar al Título de
Magíster en Ciencias Química

Director
FERNANDO ENRIQUE LARMAT GONZALEZ, Ph. D.

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA ACADÉMICO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS
SANTIAGO DE CALI
2014

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA ACADÉMICO DE QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI

Nota de Aprobación

El trabajo de investigación titulado “Determinación de la Contaminación por Metales Pesados (Plomo, Cromo, Cadmio Y Mercurio) en Aguas del Río Cauca, en la Zona Urbana de la Ciudad de Cali y Evaluación de la Mutagenicidad utilizando el Test de Ames”, presentado por el estudiante Ramiro Sánchez Chávez para optar al título de Magister en Ciencias Químicas, fue revisado y calificado por el jurado como:

Aprobado

Fernando Larmat González
Director

Jurado

Jurado

Dedicado con amor a mi hijo Kelman Sánchez L.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme terminar esta etapa de mi vida personal.

A mi hijo por sus tiempos robados de su niñez.

Al Doctor Fernando Enrique Larmat González, por su amistad, rigor académico y disciplina.

A los miembros de los grupos liderados por los profesores Nehyla Benítez y el Doctor Enrique Bravo de la Universidad del Valle

Al grupo de estudios ambientales para el desarrollo sostenible (GEADES) de la Universidad Autónoma de Occidente liderado por el profesor Alejandro Soto Duque, Gloria A. Jiménez y Luis Alberto Muñoz Ramírez.

A la memoria de mi madre Nancy, y mi hermano Willman, a mí padre Ramiro, a mis hermanos Jonathan, Carlos Eduardo y Jimmy por sus apoyos morales.

Al colega John Jairo Giraldo por sus importantes aportes y acompañamiento profesional.

A la Universidad del Valle y al actual Comité de Posgrado quienes me brindaron una nueva oportunidad de crecer profesionalmente.

A Colciencias por la financiación de la presente investigación

A los jurados la Dra. Maite del Pilar Rada de la Universidad del Cauca y al Dr. Jaime Restrepo de la Universidad del Valle por sus valiosas sugerencias y aportes.

In memoriam: Químico JUAN CARLOS MACHADO RINCÓN (Q.E.P.D)

CONTENIDO

	pág.
RESUMEN	9
INTRODUCCION	10
1. OBJETIVOS	12
1.1 OBJETIVO GENERAL	12
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	12
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
3. ANTECEDENTES Y MARCO TEORICO	14
3.1 ANÁLISIS DE CONTEXTOS DE LA CONTAMINACIÓN DEL RÍO CAUCA.	14
3.2 ANÁLISIS DEL CONTEXTO DEL TEST DE AMES	18
3.2.1 Características de la Salmonella typhimurium para el test de Ames	19
3.2.1.1 Mutación rfa	20
3.2.1.2 Deleción del gen Δ uvrB	21
3.2.1.3 Presencia del plásmido pKM101	21
3.2.1.4 Extracto Enzimático S9	21
3.2.2 Controles positivos y negativos	21
3.3 MUTAGENICIDAD EN RÍOS	21
3.4 METALES PESADOS Y MUTAGENICIDAD	24
3.5 ANÁLISIS DEL CONTEXTO DE LA CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS Y LA SALUD.	24
3.5.1. Los metales pesados dentro del contexto ambiental y de riesgo para la salud.	24
3.5.1.1 Plomo (Pb)	25
3.5.1.2 Cromo (Cr)	25
3.5.1.3 Cadmio (Cd)	26
3.5.1.4 Mercurio (Hg)	26

	pág.
3.6 ESPECIACIÓN QUÍMICA DE METALES PESADOS	27
3.7 LOS ÁCIDOS HÚMICOS Y FÚLVICOS COMO COMPONENTES DE LAS AGUAS NATURALES Y SU INTERACCIÓN CON LOS IONES METÁLICOS.	27
4. PARTE EXPERIMENTAL	30
4.1 UBICACIÓN DE LOS PUNTOS DE MUESTREO	30
4.2 MUESTREOS	30
4.3 MATERIAL, EQUIPOS Y REACTIVOS	31
4.3.1 Reactivos utilizados para la cuantificación de Cd, Cr y Pb	31
4.3.2 Reactivos utilizados para cuantificar el Hg	32
4.3.3 Preparación del material	32
4.3.4 Equipos	32
4.4 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS METALES PB, CD Y CR POR RESINA.	32
4.4.1 Preparación de la resina XAD16 en la columna.	32
4.4.2 Ensayos preliminares de adaptación de la técnica de especiación	33
4.4.3 Especiación de metales en muestras del río Cauca	34
4.4.3.1 Metales en sólidos suspendidos	34
4.4.3.1.1 Metales asociados a sustancias húmicas	36
4.4.3.1.2 Iones metálicos libres	36
4.4.4 Procedimientos analíticos para la determinación de Cd, Cr y Pb	36
4.4.5 Condiciones instrumentales para la cuantificación de Cd, Cr y Pb	36
4.5 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL MERCURIO	37
4.5.1 Preparación de la muestra.	38
4.5.2 Condiciones instrumentales para la cuantificación de mercurio.	39
4.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD MUTAGÉNICA POR EL TEST DE AMES.	40
4.6.1 Reactivación de las cepas.	40
4.6.2 Revisión de las características genotípicas	41
4.6.2.1 Requerimiento de histidina	42
4.6.2.2 Mutación rfa.	43
4.6.2.3 Mutación uvrB.	43

4.6.2.4 Factor R (Plásmido pKM101)	pág. 43
4.6.3 Preparación de la mezcla del Activador Enzimático S9	43
4.6.4 Controles positivos y negativos	43
4.6.5 Ensayo de Mutagénesis	44
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
5.1 CONDICIONES EXPERIMENTALES DE FLUJO Y PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN.	46
5.2 LÍMITES DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACIÓN.	46
5.3 CURVAS DE CALIBRACIÓN	47
5.4 CONCENTRACIÓN DE LOS METALES PESADOS EN LAS MUESTRAS DEL RÍO CAUCA.	47
5.5 ACTIVIDAD MUTAGÉNICA EN AGUAS DEL RÍO CAUCA APLICANDO EL TEST DE AMES CON LAS CEPAS TA98 Y TA100 DE S. TYPHIMURIUM CON Y SIN ACTIVADOR MUTAGENICO S-9.	49
5.5.1 Comportamiento del índice de mutagenicidad (IM) con respecto al año.	52
5.5.2 Comportamiento de la mutagenicidad con respecto al punto de muestreo.	56
5.5.3 Comportamiento de la mutagenicidad con respecto al mes de muestreo.	58
5.5.4 Tratamiento Estadístico de los datos	
5.6 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	58
6. CONCLUSIONES	63
BIBLIOGRAFIA	65
ANEXOS	73

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Investigaciones por áreas en aplicaciones del Test de Ames	20
Figura 2. Estructura molecular de un ácido húmico	28
Figura 3. Estructura molecular de un ácido fúlvico	28
Figura 4. Mapa de la ciudad de Cali, indicando los puntos de Muestreos en el río Cauca	31
Figura 5. Esquema de la columna de vidrio utilizada en la especiación de plomo, cromo y cadmio.	33
Figura 6. Procedimiento utilizado en ensayos preliminares con agua dopada.	34
Figura 7. Especiación de metales pesados en muestras del río	35
Figura 8. Procedimiento utilizado en preparación de muestras para lectura de mercurio	39
Figura 9. Esquema general del proceso de reanimación, purificación y análisis genético realizado con las cepas TA98 y TA100	42
Figura 10. Método de incorporación de la bacteria en el plato de GM	45
Figura 11. Mutagenicidad año 2008 vs Punto de muestreo	52
Figura 12. Concentración de metales año 2008 vs Punto de muestreo	53
Figura 13. Mutagenicidad año 2009 vs Punto de muestreo	53
Figura 14. Concentración de metales año 2009 vs Punto de muestreo	54
Figura 15. Mutagenicidad año 2013 vs Punto de muestreo	55
Figura 16. Concentración de Metales año 2008 vs Punto de muestreo	55
Figura 17. Índice de mutagenicidad en los diferentes sitios de muestreo	58
Figura 18. Relación IM y el mes de muestreo	59
Figura 19. Diagrama de dispersión IM cepa TA98 sin S9	60
Figura 20. Diagrama de dispersión IM cepa TA98 sin S9	60
Figura 21. Diagrama de dispersión IM cepa TA98 sin S9	60
Figura 22. Diagrama de dispersión IM cepa TA98 sin S9	60
Figura 23. Regresión lineal entre el IM de la cepa TA98 y Concentración total de metales pesados	61

	Pág.
Figura 24. Regresión cuadrática entre el IM de la cepa TA98 y Concentración Total de metales pesados	61
Figura 25. Regresión cúbica entre el IM de la cepa TA98 y Concentración Total de metales pesados	62

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Condiciones instrumentales para la cuantificación de plomo, cromo y cadmio por absorción atómica de horno de grafito.	37
Tabla 2. Rampa de temperatura para la cuantificación de cadmio	37
Tabla 3. Rampa de temperatura para la cuantificación de plomo	38
Tabla 4. Rampa de temperatura para la cuantificación de cromo	38
Tabla 5. Condiciones instrumentales para la cuantificación de mercurio (Hg), por absorción atómica vapor frío	40
Tabla 6. Características genéticas de las cepas utilizadas en el test de Ames.	41
Tabla 7. Marcas genéticas presentes en las cepas TA98 y TA100.	41
Tabla 8. Valores en ensayos preliminares (volumen de 250 ml de agua dopada, 400 mg de Amberlite XAD-16, flujo de salida 2-2.5 ml/min)	46
Tabla 9. Curvas de calibración, límite de detección y límite de cuantificación	47
Tabla 10. Concentración (ppb) de los metales Pb, Cr, Cd y Hg en los cinco puntos de muestreo en los años 2008, 2009 y 2013	48
Tabla 11. Índice de mutagenicidad con la cepa TA98 con y sin S9 Según el año y punto de muestreo	50
Tabla 12. Índice de mutagenicidad con la cepa TA100 con y S9 según el año y punto de muestreo	51
Tabla 13. Correlación de IM con Concentración Totales de Metales (ppb)	66

LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO 1. Curvas de Calibración, para los metales Cd, Cr, Pb, Hg	73
ANEXO 2. Especiación de los metales Pb, Cd y Cr en sólidos suspendidos, sustancias húmicas e iones libres.	74

ACRONIMOS

OMS	Organización Mundial de la Salud
FDA	Food and Drug Administration
MT-Cd	Metalotioneínas-Cadmio
SNC	Sistema nerviosos central
GF-AAS	Absorción atómica por horno de grafito
CMP	Carga Máxima Permisible
NTC	Norma Técnica Colombiana
UE	Unión Europea
OPS	Organización Panamericana de la Salud
ADI	Ingesta diaria aceptable
PTWI	Ingesta semanal tolerable provisional
RfD	Dosis de referencia
C.V.C.	Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca
RSD.	Desviación Estándar Relativa
CV.	Coeficiente de Variación
EAAL.	Espectroscopia de Absorción Atómica de Llama
IM.	Índice de Mutagenicidad
DAGMA.	Departamento Administrativo de Gestión Medio Ambiental
IDEAM.	Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales
GEADES.	Grupo de estudios ambientales para el desarrollo sostenible
MFC	Malformaciones congénitas
LD.	Límite de Detección
LC.	Límite de Cuantificación
S.	Desviación estándar de los blancos
M.	Pendiente de la curva de Calibración
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
CEE	Comunidad económica europea
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cancer
ADN	Ácido desoxirribonucleico

RESUMEN

En esta investigación se evaluó la contaminación por metales pesados (mercurio, cromo, plomo y cadmio), en aguas superficiales del río Cauca a su paso por la ciudad de Santiago de Cali, durante el período 2008, 2009 y 2013, y la mutagenicidad, por medio del bien establecido Test de Ames. Los metales se determinaron por absorción atómica y la mutagenicidad se evaluó con cepas TA98 y TA100 de la bacteria *Salmonella Typhimurium*, donde también se utilizó el extracto enzimático (S9) para simular el posible efecto mutagénico en mamíferos.

La recolección de las muestras de las aguas superficiales del río Cauca se realizó en cinco puntos de muestreo en el perímetro urbano de la ciudad de Santiago de Cali, que van desde el Puente El Hormiguero hasta la desembocadura del río Cali. Las muestras de agua recolectadas fueron procesadas y concentradas con la resina Amberlite XAD-16 con el fin de especiar los metales pesados objeto de estudio y su posterior cuantificación por la técnica de espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito para el caso de los metales cromo, plomo y cadmio, y por generación de vapor frío para el mercurio. Parte de las muestras fueron procesadas hasta completa sequedad, y luego reconstituidas con DMSO para ser utilizadas en el test de Ames. Los resultados de las pruebas de mutagenicidad durante el espacio

de tiempo evaluado demostraron que hay un efecto mutagénico moderado en tres de los cinco puntos estudiados. Se evidenció una tendencia sostenida en los puntos de muestreo del canal colector sur, la bocatoma de la planta de tratamiento de agua potable de Puerto Mallarino y la desembocadura del río Cali, con las dos cepas, con y sin el extracto enzimático S9. El punto que mostró mayor concentración de metales y de mayor IM, fue el Canal Colector Sur con un valor de 7.1, con la cepa TA98 con S9.

Los resultados de la presente investigación indican una alta concentración de los metales pesados en las muestras analizadas en este segmento y en el período de tiempo evaluado no sobrepasan los límites permitidos por la EPA en aguas de consumo humano, se encontró una leve correlación con los índices de mutagenicidad observados, tanto en las temporadas secas especialmente en la temporadas lluviosas, después de la desembocadura del canal colector sur. Este trabajo de investigación hace parte del proyecto interdisciplinario aprobado y financiado por Colciencias, titulado “Evaluación de la actividad mutagenicidad de las aguas del río Cauca en el área urbana de la ciudad de Cali-Colombia, por medio del test de Ames”.

INTRODUCCIÓN

Santiago de Cali, es la capital administrativa y política del departamento de Valle del Cauca y la tercera ciudad más poblada de Colombia (aproximadamente tres millones de habitantes). Por extensión es la segunda ciudad más grande del país al poseer un área de 564 km² y una longitud de 17 km de Sur a Norte y 12 km de Oriente a Occidente (Alcaldía de Santiago de Cali. Departamento Administrativo de Planeación, 1998). La ciudad está ubicada en las coordenadas, 3°27'26" latitud norte, 76°31'42" longitud Oeste, a 1079.2 m sobre el nivel del mar, con una temperatura tropical promedio actual de 26°C y una precipitación pluvial en promedio anual de 900 mm. Geográficamente Santiago de Cali está en el valle del río Cauca, el segundo río en importancia del país, después del río Magdalena. A la altura de Santiago de Cali este valle tiene 35 km de ancho y la zona urbana más poblada está sobre el costado occidental del río.

El río Cuaca presenta una contaminación que ha generado preocupación en entidades ambientales de orden nacional como el IDEAM, de entidades administrativas ambientales regionales públicas como la Corporación Regional del Valle del Cauca (CVC) y de entidades de orden municipal como lo es Departamento Administrativo de Gestión Municipal Ambiental (DAGMA) de la Alcaldía de Santiago de Cali.

Después de su paso por la ciudad de Popayán, siguiendo su curso a través de grandes extensiones de territorio, usadas con fines agrícolas y mineros (extracción a cielo abierto de oro de origen aluvión) continúa la contaminación. También se encuentran diversos asentamientos humanos entre los que se destacan: Piendamó, Santander de Quilichao (la segunda ciudad más grande del departamento del Cauca) y el municipio de Puerto Tejada, cercano a la Ciudad de Santiago de Cali. Es importante mencionar que todas estas poblaciones vierten sus aguas residuales domésticas e industriales (Zona Industrial de la denominada Ley Páez) a ríos y quebradas que luego desembocan tributariamente al río Cauca sin ninguna clase de pre-tratamiento. En la ciudad de Santiago de Cali el río recibe las descargas de las aguas residuales por medio del Canal Colector Sur y posteriormente se encuentra en la bocatoma de la planta de tratamiento de agua potable que abastece al 75% de la población de la ciudad de Cali.

Esta investigación es la primera que se realiza en su clase en el suroccidente Colombiano, en las que se estudian simultáneamente los niveles de contaminación por metales pesados ligados a: metales libres, sustancias húmicas y sólidos suspendidos, con la aplicación de un test biológico para determinar actividad mutagénica sobre un segmento del trayecto del río Cauca, de gran importancia

porque estas aguas son captadas para su potabilización y distribución a más de dos millones de habitantes de la ciudad de Santiago de Cali . (Sierra *et al.*, 2012).

Esta investigación se desarrolló durante el período 2008-2009 y 2013 en las temporadas secas y de lluvias sobre las aguas superficiales del río Cauca. Los procesos y protocolos de recolección, preservación y análisis de las muestras se siguieron de acuerdo con los métodos que están avalados por la comunidad científica nacional e internacional (World Health Organization, 2011) (NTC 5667-1, 1995) (NTC-3650-5, 1998) .

Para la especiación de los metales pesados Cr, Pb y Cd que están ligados a: sustancias húmicas, sólidos suspendidos y iones metálicos libres, fue adoptada la metodología experimental de la investigación realizada por un grupo de científicos turcos en el lago Sultansazhgt en Turquía, donde aplicaron el método de pre-concentración de los metales con la resina polimérica no iónica Amberlite XAD-16 (Tokalioglu, Kartal, & Elci, 2000) para su posterior cuantificación por espectroscopia de absorción atómica. Los extractos obtenidos fueron evaporados y neutralizados antes de ser sometidos a los procesos biológicos para la evaluación de la actividad mutagénica usando el Test de Ames utilizando dos tipos de cepas de la bacteria *Salmonella typhimurium*: la cepa TA98 y la cepa TA100, al igual que el extracto enzimático S9. A los resultados de índice de mutagenicidad y de concentración de los metales se les determinó su correlación multivariial estadística.

Los resultados encontrados en el desarrollo de esta investigación, indican una moderada correlación entre las concentraciones de los metales pesados con los índices de mutagenicidad (IM). Esta investigación constituye el primer trabajo de evaluación de la carga mutagénica del río Cauca mediante un sistema genético.

Finalmente, es importante resaltar que en Colombia, hasta ahora sólo se han reportado dos trabajos (Meléndez, Zuleta, Calle, & Salazar, 2001; Zuleta M. , 2007). En este sentido se puede asegurar que al menos en el Sur-Occidente Colombiano, no se había realizado ningún trabajo con test biológico de Ames sobre las aguas superficiales del Río Cauca. Es necesario continuar profundizando en estos temas, que son relevantes y de un incalculable impacto social-ambiental sobre la salud de los habitantes de la ciudad de Santiago de Cali.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la concentración de los metales pesados (Cd, Cr, Pb y Hg) y la actividad mutagénica en aguas del río Cauca y evaluar la posible correlación que pueda existir entre estos dos parámetros.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extraer los metales objetos de esta investigación usando la resina Amberlite XAD-16, separándolos en tres especies fisicoquímicas: metales asociados a sustancias húmicas, iones metálicos libres y metales en sólidos suspendidos
- Cuantificar los metales por Absorción Atómica donde el Cd, Cr y Pb se determinarán con la técnica de atomización con horno de grafito, y el Hg con la técnica de generación de vapor frío.
- Determinar el índice de mutagenicidad de las fracciones extraídas con la resina Amberlite XAD-16
- Evaluar la posible correlación estadística que pueda existir entre la presencia de los metales (Cd, Cr, Pb y Hg) y el índice de mutagenicidad.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El agua dulce es el recurso renovable más importante, pero la humanidad está utilizándolo y contaminándolo más rápidamente de lo que necesita para reponerse. Efectivamente, las aglomeraciones en las grandes ciudades, el rápido desarrollo industrial, el incremento del turismo y la agricultura entre otras actividades, hacen que este recurso se vaya reduciendo y que su composición se vea notablemente alterada. Para agravar el problema, el ciclo hidrológico es cada vez menos previsible ya que el cambio climático altera los patrones de temperatura históricos. (UNIVERSIDAD DEL VALLE & Corporación Autónoma Regional del Valle, 2007. El Río Cauca en su valle alto: Un aporte al conocimiento de uno de los ríos más importantes de Colombia. Cali, Colombia: Publicaciones CVC-Universidad del Valle).

El río Cauca se empieza a deteriorar, poco después de su nacimiento en las zonas del Paletará, Coconuco y Puracé en el departamento del Cauca, ya que en sus aguas se vierten miles de toneladas de residuos provenientes en su mayoría de cultivos de papa, ganadería, minería del azufre y gran cantidad de basuras, para luego llegar a la ciudad de Santiago de Cali con un alto grado de contaminación.

En este contexto deja al descubierto una problemática ambiental a corto, mediano y largo plazo, que enmarca la contaminación de los recursos hídricos y de la calidad del agua que dispone la población para su consumo. Son numerosas las sustancias que llegan a contaminar las aguas del río Cauca.

Este trabajo de investigación se centró en la determinación de la concentración de los cuatro metales pesados que son tóxicos tanto para la fauna acuática como para el ser humano. También se evaluó su posible relación con la actividad mutagénica observada.

3. ANTECEDENTES Y MARCO TEORICO

3.1 ANÁLISIS DE CONTEXTOS DE LA CONTAMINACIÓN DEL RÍO CAUCA

Desde los años sesenta se han realizado estudios sobre la contaminación del río Cauca y de las sustancias causantes del fenómeno. El primer estudio de este tipo fue realizado por la Universidad de Tulane (Estados Unidos) y la Universidad del Valle, con el apoyo de la CVC y de las Empresas Municipales de Cali (EMCALI). En este estudio se identificó una alta demanda béntica en el tramo entre el río Cali (norte de la ciudad de Santiago de Cali) y la estación de monitoreo de Mediacanoa en el municipio de Buga. (RODRÍGUEZ PAZ, D., & Velásquez, L. O. Estudio y evaluación del grado de contaminación por plomo en sedimentos del río Cauca por espectrometría de Absorción Atómica con llama. Trabajo de Grado, Universidad del Valle, Facultad de Ciencias. Departamento de Química, 1997).

Actualmente en la cuenca alta del río Cauca se presenta una disminución de 60% en la concentración de Oxígeno Disuelto (OD) desde el Municipio de Yumbo hasta la estación de monitoreo de Yotoco, ocasionado por los vertimientos domésticos e industriales del corredor Cali-Yumbo y de la Ciudad de Cali (Universidad del Valle & Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca, 2001).

La calidad del agua del río Cauca se comienza a afectar desde las zonas de Paletará, Coconuco y Puracé, dado que se le adicionan diariamente miles de toneladas de residuos provenientes de la agricultura, de la ganadería, de la minería del azufre, de los procesos de minería aurífera y una gran cantidad de basuras con sus lixiviados sin ningún tipo de tratamiento.

El Plan de Ordenamiento Territorial (POT 2002) señala la cabecera municipal de la ciudad de Popayán como el mayor consumidor de agua en el Departamento del Cauca, utilizada para uso humano, fines industriales, ganadería y riego de cultivos. Asimismo contribuyen con un aporte importante de aguas residuales que tienen como destino final los ríos y quebradas que atraviesan esta ciudad, las cuales por su poco caudal tienen bajo nivel de disolución, lo que trae como consecuencia la contaminación de los ríos Cauca y sus tributarios: Molino, Saté y Ejido. Después de su paso por la ciudad de Popayán sigue su curso a través de grandes extensiones de territorio, usadas con fines agroindustriales, donde se encuentran diversos asentamientos humanos entre los que se destacan: Piendamó, Santander de Quilichao y la localidad de Puerto Tejada ya cercana a la Ciudad de Cali. Es importante resaltar que todas las poblaciones vierten sus aguas residuales domésticas e industriales a ríos y quebradas que luego desembocan al río Cauca sin ningún tipo de tratamiento. En este contexto las aguas del río Cauca ya evidencian altos niveles de contaminación asociados a las intervenciones

antrópicas en sus ecosistemas antes de entrar a la zona urbana de Santiago de Cali.

En la ciudad de Santiago de Cali el río recibe aguas domésticas residuales del sur de la ciudad a través del Canal Colector Sur, que lleva además los lixiviados del antiguo basurero de Navarro y que funcionó en una excavación ubicada en una madre-vieja del río Cauca por más de cuarenta años (1967 - 2008). El basurero a cielo abierto contaba con una extensión aproximada de más 40 hectáreas, y hoy en día se develan las filtraciones de las lagunas de depósitos de estos lixiviados

Los altos grados de contaminación que ha presentado el río Cauca han generado alarma entre las diferentes entidades nacionales, regionales y municipales de orden administrativo, de control y vigilancia como los son el IDEAM, la CVC y el DAGMA, respectivamente. Igualmente entre instituciones independientes de carácter investigativo como el Cinara (Institución de Investigación y Desarrollo, adscrita a la Facultad de Ingeniería de la Universidad del Valle, reconocida por el Sistema Nacional de Ciencia y Tecnología de Colombia, con una amplia trayectoria de trabajo en el país y América Latina). (Universidad del Valle & Corporación Autónoma Regional del Valle. El Río Cauca en su valle alto: Un aporte al conocimiento de uno de los ríos más importantes de Colombia. Cali, Colombia: Publicaciones CVC-Universidad del Valle, 2007).

En un estudio realizado por la Universidad del Valle y la Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca (CVC), de Modelación Matemática del río Cauca fases I y II (PMC I y II), entre 1993-1997 y 1998-2002, se estableció la condición de calidad del agua del río Cauca en los 447 km de recorrido en el Departamento del Valle que comprende desde el embalse de Salvajina y el municipio de la Virginia. Para estimar el Índice de Calidad de las aguas y el Índice de Calidad de Contaminación se determinaron como parámetros: temperatura, conductividad, pH, alcalinidad, oxígeno disuelto (OD), demanda biológica de oxígeno (DBO), sólidos totales, sólidos suspendidos totales, turbiedad, color, dureza total, nitratos, nitrógeno total, fosfatos, fósforo total, cloruros y coliformes totales y fecales. Con estos parámetros se estableció el ICAUCA o Índice de Calidad del río Cauca (Universidad del Valle & Corporación Autónoma Regional del Valle , 2007).

Los resultados evidenciaron que la calidad del agua del río se califica entre aceptable y regular desde Suárez hasta el Puente de El Hormiguero y pasa a ser inadecuada y de mala Calidad desde el Puente de El Hormiguero hasta Mediacanoa en donde se alcanza el mayor deterioro de la calidad del río. Se observa una mínima recuperación en el último tramo desde Mediacanoa hasta la Virginia pero el agua sigue catalogada como inadecuada y de mala calidad.

A pesar del detallado y meticuloso estudio realizado en el PMC fases I y II, en el cálculo del ICAUCA no se incluyeron pesticidas, metales pesados y demás sustancias tóxicas y éstos pueden ser determinantes en la evaluación de la calidad

del agua para consumo humano y uso agrícola. Por lo tanto, estos resultados carecen de una aproximación al problema de la descarga de compuestos con capacidad mutagénica como los ya demostrados para pesticidas (Fishbein, 1978).

En cuanto a la presencia de pesticidas y metales pesados en aguas del río Cauca, y de acuerdo con Fischer (1990), el profesor Aníbal Patiño sostiene que en el año 1979, un estudio sobre la población acuática del Río Cauca, determinó que entre los agentes contaminantes responsables del mayor deterioro del río Cauca, se encuentran los plaguicidas residuales provenientes de los campos de cultivo, además de otros agentes tales como residuos industriales y aguas residuales domésticas. Barba Ho (1994) y la Contraloría Departamental del Valle del Cauca (1995) en estudios a muestras tomadas de plaguicidas en aguas del Río Cauca, desde Salvajina hasta La Victoria entre 1983 y 1987, reportaron datos que sobrepasan las normas de calidad existentes para pesticidas organoclorados y organofosforados.

Varias investigaciones de carácter ambiental se han llevado a cabo en torno a la contaminación por metales pesados y demás sustancias químicas contaminantes en depósitos de aguas naturales, ríos y afluentes. Cada una de ellas encierra intereses particulares de investigación, tales como la validación de determinado método analítico, valoraciones biológicas (como mutagénesis, impacto sobre la fauna micro y macroscópica), asociación de resultados de técnicas con el estudio de los sedimentos y componentes de los diversos recursos hídricos (ríos, lagunas, mares, aguas subterráneas), entre muchos otros de su categoría. A continuación se enmarcan algunos de estos trabajos.

Estudios de cuantificación de los metales pesados de Pb, Cr, Cd y Hg en las aguas, los sedimentos y algunas especies propias de peces del río Cauca, por parte del Departamento de Química de la Universidad del Valle, en asocio con la Corporación Regional del Valle del Cauca (CVC) en siete estaciones de muestreo: Juanchito, paso del Comercio, Puente Isaacs, paso de la Torre, Vijes, Yotoco y Mediacanoa. Estas estaciones de monitoreo están después del segmento de aguas en que se captan para potabilizarlas y distribuir las a los habitantes de la población caleña. Los análisis se realizaron utilizando la técnica de Absorción Atómica (A.A). Los resultados mostraron que la concentración de cromo total está aproximadamente un 60% por encima del parámetro aceptado, ya que el promedio en los sedimentos es de 16.21 mg/Kg (González, 1997).

En 1999 se evaluó el grado de contaminación del río Cauca, mediante la especiación geoquímica del cromo en sedimentos, encontrando que aproximadamente el 60% del cromo es transportado en el río Cauca dentro de sólidos cristalinos y sólo un 20% al 40% enlazado a materia orgánica. Las estaciones más contaminadas por cromo VI, son Puente Isaac, Paso del Comercio, Vijes y Juanchito. Las cantidades de cromo VI se encontraron en sedimentos enlazadas a materia orgánica y residuales (Restrepo & Velásquez, 1999).

Saavedra, Velásquez, & Jaramillo en el año 2001 evaluaron la contaminación por cromo, encontrándose en mayor concentración en la estación Paso del Comercio.

Los investigadores Rodríguez, Paz & Velásquez (1997) encontraron una baja concentración de plomo; Rada Mendoza en 1998, evaluó el grado de contaminación por metales pesados (cadmio, plomo y mercurio), lo cual permitió determinar concentración de estos metales en la columna de agua del río Cauca, y su bioconcentración en especies de consumo como es el *Pterygoplichtys undecimalis* ("Corroncho"). Artunduaga (2013) encontró acumulación de plomo, cadmio y mercurio en la misma especie donde las concentraciones halladas estuvieron por encima de lo estipulado por legislación alimenticia nacional e internacional, evidenciando un riesgo latente para la salud de los pobladores de estos territorios, ya que los pescados no se encuentra aptos para consumo humano. En aguas próximas a la planta de captación para potabilización en Puerto Mallarino se encontró la presencia de cadmio en un rango entre 0.19 y 4.42 ppb y plomo entre 1.35 y 13.6 ppb (Méndez, Ocampo, & Pradilla, 2008)

Muñoz (1999) en su trabajo de grado, valoró la contaminación por plomo en sedimentos del río Cauca, por espectrometría de absorción atómica con llama. La concentración con plomo total presente en las muestras de sedimentos están en un intervalo de 2.29 a 12.05 mg/kg; estos valores son considerados bajos y se encuentran dentro de los promedios de composición de la corteza terrestre, y de los promedios de sales, granitos, basaltos, sedimentos lacustres y sedimentos recientes de grandes ríos. La concentración de plomo biodisponible, es decir, la que está contaminando el río, se encontró en un intervalo de 1.46 a 4.97 mg/Kg, valores que son considerados bajos.

Vásquez Fory (2001) de la Universidad del Valle en su trabajo de investigación realizó la extracción y cuantificación de mercurio en las aguas del río Cauca utilizando una pre-concentración en fase sólida con cartuchos C-18, la cual contenía como agente acomplejante dietilditiocarbamato de sodio y acetonitrilo como eluyente. Finalmente se cuantificó por espectrometría de absorción atómica por vapores fríos, obteniendo concentraciones altas de mercurio (entre 30 ppb y 50 ppb) en las estaciones de Yotoco, Juanchito y Puente de El Hormiguero.

En el marco de este proyecto, y por primera vez, se está documentando la evolución de la contaminación por los metales Hg, Pb, Cr y Cd, ligados a sustancias húmicas, sólidos suspendidos y metales libres. En trabajos realizados en la Universidad del Valle por Correa, *et al.*, (2009) se evaluó la contaminación a causa de estos metales pesados en el agua del río Cauca. Estos trabajos mostraron, en la mayoría de puntos de estudio, que los metales se encontraban en el orden de partes por billón (ppb) (Sanchez, Soto, Jimenez, & Larmat, 2008).

Esta problemática de contaminación asociada al recurso hídrico se viene presentado en todos los países del mundo, como lo denuncia el mapa de justicia

ambiental (EJOLT) después de su lanzamiento oficial el pasado 19 de marzo de 2014, bajo el liderazgo de investigadores del Instituto de Ciencia y Tecnología Ambiental de la Universidad Autónoma de Barcelona, en su última del 4 de 2013 (ejolt, 2014). Colombia resultó como el segundo país del mundo con más casos reseñados, superado sólo por la India con 112. Otros países de la región documentados son Brasil (58), Ecuador (48), Argentina (32), Perú (31) y Chile (30), donde el agua es el principal motor generador del conflicto en la afectación del medio ambiente.

3.2 ANÁLISIS DEL CONTEXTO DEL TEST DE AMES

Las sustancias genotóxicas y entre ellas las mutagénicas, tienen como receptáculo inicial las cañerías y como intermediarios a los ríos. Debido al aumento de la presión por preservar los recursos hídricos e integrarlos a las diferentes cadenas productivas, existe un número muy extenso de trabajos de los principales ríos del mundo que atraviesan reconocidas ciudades Europeas, Asiáticas y Americanas, que han reportado resultados positivos al someterlos al test mutagénico de Ames. Igualmente se encuentra un considerable número de investigaciones interesadas en saber la calidad del agua de estos ríos, desde el punto de vista fisicoquímico y biológico, antes de entrar y al salir de los procesos de potabilización utilizados en cada ciudad.

Las fuentes de contaminación de las aguas con sustancias mutagénicas son tan variadas, como las comúnmente conocidas descargas de residuos industriales, petroquímicos, de refinerías de aceite y pesticidas provenientes de la agroindustria (Fishbein, 1978; White & Rasmussen, 1998; Siddiqui & Ahmad, 2003 y Ohe, White, & DeMarini, 2003).

También existen fuentes que aportan una sustancial contaminación por las aguas residuales municipales, con residuos ricos en orina, heces, hollín, cenizas y productos de la pirólisis de proteínas (ahumados), que pueden contener gran cantidad de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA), aminas heterocíclicas (AH) y nitrosaminas. Estas diversas fuentes de contaminación forman mezclas complejas que resultan altamente mutagénicas y genotóxicas (White & Rasmussen, 1998; Meléndez *et al.*, 2001; Zuleta, 2006; Ohe, White & DeMarini, 2003; Coss, *et al.*, 2004; Zuleta M., 2007).

Algunos de los agentes químicos encontrados en aguas residuales domésticas o industriales han mostrado diferentes capacidades para generar daño genético, por nombrar sólo unos ejemplos: hidrocarburos policíclicos aromáticos como fluorantraceno y pirenos conteniendo alta genotoxicidad; 24 benzidinas halogenadas han resultado positivas con el test de Ames para mutaciones de corrimiento del marco de lectura (Chung *et al.*, 2006). Con células de linfoma de ratón se ha mostrado la mutagenicidad de compuestos orgánicos e inorgánicos que

contienen arsénico (Soriano *et al.*, 2007) para los cuales no se tiene totalmente claro el mecanismo molecular que origina las mutaciones.

Una vez se conoció que las aguas residuales provenientes de las industrias, la agricultura y centros urbanos tienen mutágenos y carcinógenos con efectos crónicos en la fisiología humana, se generó la aplicación intensiva de la prueba de Ames en investigaciones de los ríos que abastecían las ciudades (Kraybill, 1981 y Cheh *et al.*, 1980).

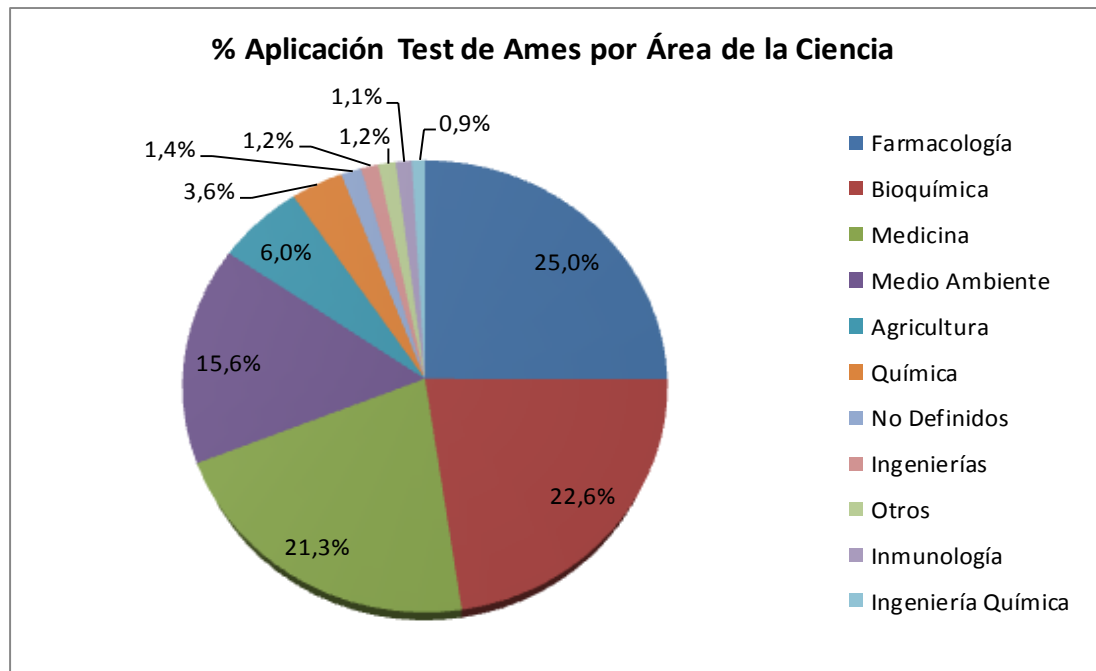
El test de Ames fue investigado, desarrollado y publicado en 1971 por Bruce N. Ames (Marx, 1990). Al poco tiempo se descubrió una alta correlación entre cáncer y los resultados positivos con este ensayo, lo cual lleva un explosivo desarrollo de éste constituyéndose en la prueba más importante para la detección de riesgos de cáncer en mamíferos. De acuerdo con Kier (1986), este experimento se usa rutinariamente en el análisis de muestras medioambientales de aire, agua, alimentos, etc., con el fin de determinar la mutagenicidad.

El ensayo de Ames o de mutación inversa en bacterias, emplea cepas de *Salmonella typhimurium* y se fundamenta en la detección de mutaciones que reversion con las cepas experimentales y restablecen la capacidad funcional de las bacterias al sintetizar el aminoácido esencial. Dado que los nucleótidos son los componentes monómeros de los ácidos nucleicos y que éstos a su vez almacenan y transfieren la información genética de todos los organismos vivos sobre la Tierra, cualquier agente que pueda lesionarlos logra afectar la viabilidad de la célula que sufre la lesión. En el caso de que la célula afectada no logre reparar el daño o iniciar un proceso de apoptosis y se divida, puede afectar la descendencia de un tejido, si es un organismo pluricelular o de un organismo completo si es unicelular (Ames, McCann, & Yamasaki, 1975; Maron & Ames, 1983; EPA 712-C-96-219, 1996; OECD 471, 1997; EPA 712-C-98-247, 1998 y Mortelmans & Zeiger, 2000).

En la figura 1, se puede visualizar el grado de importancia que tiene el Test de Ames para determinar la actividad mutagénica para diversos campos de la ciencia; en ella se observa que las aplicaciones ambientales ocupan un lugar importante con el 15.6% de los registros. De estas investigaciones el 94.4% se encuentra en artículos; en el mismo período de estudio un 1.9% se encuentran en review, y en 3.7 % en conferencias y ponencias orales o escritas. Los países que más han investigado en esta temática son Estados Unidos, China, Brasil, Alemania, Japón, Países bajos y España entre otros. (Ames, B. , 1974).

3.2.1 Características de la *Salmonella typhimurium* para el test de Ames. El ensayo de Ames utiliza bacterias de la cepa *Salmonella typhimurium* que poseen una mutación definitiva en el operón de la histidina, la cual está formada por nueve genes estructurales agrupados, de los cuales cinco son genes reguladores (His R, His U, His S, His T, His W), convirtiéndolas en bacterias auxótrofas (Davinson, 1976; Jenkins, 1985 *et al.*, 2000).

Figura 1. Investigaciones por áreas en aplicaciones del Test de Ames



Existen diversos mecanismos moleculares para que esta mutación revierta, como las transversiones y las transiciones las cuales pueden ser causadas por un amplio rango de agentes mutagénicos, lo que convierte a la cepa portadora en un sistema excelente para la detección de una gran variedad de mutágenos permitiendo encontrar una respuesta positiva de diferentes sustancias químicas sometidas a prueba de mutagenicidad. (Louis, Atherholt, & McGarrit, 1983)

Para detectar esta mutación se preparan platos con histidina donde se observa el crecimiento de las cepas que contienen la mutación en uno de los genes estructurales del operón de la histidina (Maron & Ames, 1983). Además de las mutaciones presentes, las cepas de *Salmonella* deben presentar los siguientes genotipos:

3.2.1.1 Mutación rfa. Consiste en eliminar la membrana externa de la cepa, la cual está formada de proteínas, fosfolípidos y polisacáridos que están estrechamente unidos a la pared externa y a la que se denomina capa de lipopolisacárido o LPS; su principal función es dar soporte estructural a la célula y proteger a la bacteria de sustancias nocivas que se encuentran en el medio externo. Adicionalmente, en algunas bacterias esta capa es tóxica para los animales (Madigan, M.; Martinko, et al. 2004, p. 1011). Al eliminar el LPS por medio de la mutación rfa, las bacterias de *Salmonella* son afectadas por diferentes químicos ya que aumenta la permeabilidad

y así mejora la sensibilidad de la prueba de Ames. La mutación *rfa* se prueba en las bacterias por su sensibilidad ante el cristal violeta (Marouka & Yamanaka, 1983).

3.2.1.2 Deleción del gen Δ uvrB. La delación del gen Δ uvrB permite eliminar el sistema de reparación de daños por químicos o por irradiación en el ADN. La deleción del gen Δ uvrB está dentro de una región que comprende de 14 a 125 kb e involucra genes encargados de la biosíntesis de cofactores de molibdeno, al igual que el operón, galactosa o la biotina y otros genes de función desconocida. La detección de esta mutación se realiza por la irradiación con UV de las cepas por unos segundos; las cepas que no crecen son sensibles a la radiación y presentan la mutación Δ uvrB (Ames B., 1974; Maron & Ames, 1983 y Mortelmans & Zeiger, 2000).

3.2.1.3 Presencia del plásmido pKM101. El plásmido pKM101 que promueve la síntesis de translesión dependiente del sistema SOS por la presencia del operón *mucAB* en las bacterias, desarrolla la sensibilidad de las cepas a compuestos químicos por el aumento del fallo en el sistema de reparación en el ADN. Esta se determina con el crecimiento de la cepa ante la presencia de la ampicilina en los platos de siembra (Ferguson & Denny, 2007).

3.2.1.4 Extracto Enzimático S9. El ensayo de Ames permite simular lo que sucedería en la fisiología de mamíferos, si sustancias que puedan presentar actividad mutagénica como metales pesados, al ser ingeridos; el contaminante que en un principio no era mutagénico, generaría mutaciones en el ADN de la bacteria dando positivo en el ensayo de Ames (Mortelmans & Zeiger, 2000).

3.2.2 Controles positivos y negativos. Para el análisis de los datos obtenidos del ensayo de Ames se utilizan controles positivos y negativos que demuestran que las características de las cepas para detectar compuestos mutagénicos están trabajando bien, al igual que el extracto enzimático que simula la activación enzimática en mamíferos. Asimismo se usa el Índice Mutagénico (IM) que es la razón entre el número de revertantes espontáneos y revertantes inducidos para indicar si existe Actividad Mutagénica de los compuestos evaluados. Cuando el valor del IM es mayor a dos se considera que la prueba es positiva. Además, se presentan gráficas de dosis-respuesta de los resultados con los coeficientes de correlación para apoyar los resultados obtenidos (Albaladejo, et al., 1995)

3.3 MUTAGENICIDAD EN RÍOS

Debido a la confiabilidad del Test de Ames, ha existido un marcado interés por aplicarlo en extracto a las aguas contaminadas de los principales ríos del mundo, para verificar la posible mutagenicidad. En Alemania, Vahl, Karbe, & Westendorf (1997), realizaron la valoración de la genotoxicidad y mutagenicidad de material particulado suspendido en el Río Elbe; en este estudio se evaluó la pertinencia de tres ensayos bacterianos de genotoxicidad de corto plazo (Ames test; Ara test y Umu

test). Se observó que existe correspondencia entre las regiones más contaminadas del río y los resultados de la mutagenicidad. Igualmente, Reifferscheid & Grumm (2003) estudiaron la genotoxicidad en diversos ríos alemanes (Rin, Elbe, Muld, Wupper y la planta potabilizadora Wahnbachbarrage), mediante los test que están ampliamente validados para medir genotoxicidad particularmente en aguas superficiales, encontrando resultados positivos con el test de Ames y el ensayo Cometa en los ríos Elbe y Rin. (Reifferscheid, D. R., & Grumm, T. 2003 p. 67-69).

Mersch-Sundermann et al., (1988) encontraron que la calidad del agua superficial urbana e industrial en muchos sitios de la región del Rin-Neckar era mala desde el punto de vista bacteriológico; por esta razón examinaron 46 muestras de agua del Río Rin y sus afluentes, usando el test de Ames. Adicionalmente se examinaron ocho muestras de la fuente de Mannheim y cuatro muestras de un lago en esta misma área; se usaron las cepas TA97, TA98, TA100 y TA102 con y sin activación metabólica. Se encontró mutagenicidad alta en la Planta de tratamiento de aguas residuales de Mannheim y de Ludwigsghagen. Los resultados mostraron que los recursos hídricos analizados presentaban riesgos ecológicos, lo que indica que se debe prevenir, aumentando el control de los efluentes industriales y urbanos, antes de la descarga al río.

Igualmente, Randow et al, 1995) estudiaron el riesgo del suministro de agua potable del río Warnov a la ciudad de Rostock. Debido a los accidentes en las líneas de gas en la ciudad de Schwann a finales de los años 50, un pequeño pueblo al sur de Rostock, se produjo y aún produce derrame de alquitrán en el río Warnov, del que la Ciudad de Rostock obtiene suministro de agua potable 20 km. aguas abajo.

En Rusia, Chistiakov & Kornilov (1991) estudiaron la mutagenicidad de 14 muestras de agua del Delta del Río Don, con la prueba de Ames; los resultados del experimento revelaron alta mutagenicidad en las aguas del Río Don. Los genotóxicos extraídos se evaluaron y con la prueba de *Salmonella typhimurium* demostraron que los extractos concentrados en las muestras tenían máxima mutagenicidad con la cepa TA98 con y sin activación metabólica. En China, Ma et al. (2001) estudiaron la actividad mutagénica a muestras de agua coleccionadas del embalse Guanting y del Río Yongding, con la cepa TA98 sin activación metabólica; las muestras presentaron actividad mutagénica, los efectos de mutagenicidad desaparecieron después de la adición de (S9), los resultados demuestran que el agua del Río Yongding ha sido contaminada por sustancias mutagénicas.

En Estados Unidos de Norte América, Ohe, et al. (2003), estudiaron las características de la mutagenicidad de los ríos que fluyen a través de grandes áreas metropolitanas de América del Norte-nororiental, hicieron muestreo en 21 sitios: el sistema del Río Providencia (4 sitios); el Río Charles (2 sitios); el Río Potomac (6 sitios); el Río St. Lawrence (5 sitios); el Río Hudson (3 sitios) y el Río Oriental (1 sitio), el ensayo de mutagenicidad se evaluó con las cepas TA98, TA100, YG1024, YG1041, YG1042, con y sin activación metabólica.

Los resultados globales mostraron que los anteriores ríos contienen compuestos aromáticos, responsables de desarrollar actividad mutagénica en las diferentes cepas examinadas en el estudio. En Brasil, Vargas *et al.* (1993) realizaron un estudio en el Río Cai, en área bajo la influencia de un complejo industrial petroquímico, la aplicación del test de Ames, permitió la delimitación de tres áreas de influencia del complejo industrial, y el test demostró ser adecuado para la detección de contaminantes de la industria petroquímica. En Argentina, Lerda & Prosperi, (1996) estudiaron la calidad del Río Tercero durante 14 meses, realizaron análisis bacteriológicos, fisicoquímicos y midieron también la mutagenicidad del agua potable. Como resultado encontraron mutagenicidad y clastogenicidad en muchos sistemas biológicos.

En Colombia, Orozco & Zuleta, (2000) investigadores de la Universidad de Antioquia, trabajaron en la detección del impacto de sustancias mutagénicas vertidas al Río Pantanillo. Obtuvieron alta mutagenicidad del sedimento contenido en las aguas negras con cepas TA100 y TA98 con y sin activación metabólica. Igualmente investigadores de la Universidad de Antioquia e integrantes del Laboratorio de Mutagénesis Ambiental, estudiaron la actividad mutagénica de las aguas de consumo humano antes y después de clorar en la planta de Villa Hermosa, Medellín. En este trabajo encontraron que la contaminación y la cloración influyen en la mutagenicidad de las aguas tratadas en la planta Villa Hermosa. (Meléndez *et al.* 2001).

Desde el 2009 una de las investigaciones realizadas por el grupo de electroquímica de la Universidad del Valle y en asocio con el grupo Gades de la Universidad Autónoma de Occidente (Taques *et al.*, 2009; Godfrey *et al.*, 2008; Sierra *et al.*, 2012 y Sanchez *et al.* 2008) evaluó el efecto mutagénico causado por compuestos contaminantes que se encuentran presentes en el agua del río Cauca a su paso por la ciudad de Cali en temporada seca y húmeda. La mutagenicidad se evaluó por medio del análisis del Test de Ames, en donde se utilizaron las cepas TA98 y TA100 de la bacteria *Salmonella Typhimurium*, sometiendo cada una de las cepas a dos tratamientos: con y sin extracto enzimático (S-9).

Los resultados de las pruebas de mutagenicidad demostraron que hay un efecto mutagénico en tres de los cinco puntos evaluados. En el canal colector sur, en la PTAP y en la desembocadura del río Cali, con las dos cepas, con y sin extracto enzimático. Se evidenciaron Índices Mutagénicos (IM) entre 2 y 8, lo que indica que hay una actividad mutagénica considerable. El mayor IM se encontró en el Canal Colector Sur (7.6), con la cepa TA98 sin S-9.

Las concentraciones obtenidas de metales objeto de estudio en esta investigación no pueden relacionarse directamente con la mutagenicidad en estos puntos de muestreo, teniendo en cuenta la posible presencia de otras sustancias (contaminantes orgánicos) que afectan el crecimiento de la bacteria. Además, las

concentraciones de metales encontradas en el agua del río (< 29,5 ppb) no sobrepasan los límites permitidos por la EPA en aguas de consumo humano (122 ppb en total).

3.4 METALES PESADOS Y MUTAGENICIDAD

Wong, 1988 estudió la mutagenicidad de 10 metales pesados entre ellos cadmio, cromo, mercurio y plomo, con diferentes cepas de *Salmonella Typhimurium*. Estos metales fueron divididos en tres clases, basados en la toxicidad con la cepa. La clase I: cromo y mercurio fueron tóxicos al ensayo con la cepa con concentraciones relativamente bajas (0.2 ppm); la clase II, cadmio, cobalto, manganeso y plomo resultaron con concentraciones un poco más alta (20-40ppm) y la clase III: cobre, hierro, níquel y zinc que estuvieron relativamente no tóxicos al ensayo.

Singh *et al.* (2007) estudiaron muestras de lixiviados provenientes de desechos de industrias metálicas, de curtiembres y de tintes en la india. Los metales presentes en las muestras fueron analizados usando espectrometría de emisión de plasma acoplado por inducción encontrando: Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn en el orden de µg/mL. Los lixiviados de estas industrias fueron mutagénicos en las cuatro cepas estudiadas (TA97A, TA98, TA100 y TA102), las muestras provenientes de la industria de tintes no fueron mutagénicas. Ellos atribuyen los efectos mutagénicos de los lixiviados en estas industrias a la presencia de metales pesados y/o sus complejos, factores ambientales tal como radiación UV y micropolulantes.

En turquía, Kutlu, *et al.* (2004) tomaron muestras de aguas superficiales y sedimentos del río Porsuk. Los metales presentes entre ellos Cu, Pb, Cd, Al y Ni, fueron extraídos con resina Amberlite XAD-4 y XAD-16 y determinados por espectrometría de absorción atómica; los resultados demostraron que en dos de los siete puntos de muestreo se presentó una mutagenicidad directa por corrimiento de base y en términos generales ellos encontraron una actividad mutagénica leve y se le atribuyen principalmente a factores antropogénicos debido a que en las cercanías del río hay una región bastante industrializada.

3.5 ANÁLISIS DEL CONTEXTO DE LA CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS Y LA SALUD.

3.5.1 Los metales pesados dentro del contexto ambiental y de riesgo para la salud. La contaminación por metales pesados de los recursos hídricos viene dada de formas fundamentales:

- La litogénica, que no es más que la parte que se vierte de manera natural al ambiente como resultado de fenómenos geológicos, meteorización de rocas, lixiviación, desgasificación, erupciones volcánicas, etc.

- La antropogénica es el producto de la actividad del hombre sobre el medio ambiente.

Los metales pesados no pueden degradarse ni destruirse, por lo que se consideran contaminantes estables y persistentes del medio ambiente; como consecuencia de ello se hace necesario el estudio y monitoreo de la calidad de los recursos hídricos que acompañan las diferentes zonas o territorios habitados.

3.5.1.1 Plomo (Pb). La contaminación de las aguas por plomo se origina principalmente por la acción de sus sales solubles en agua que son generadas durante los procesos químicos en industrias, tales como fábricas de pinturas, foto termografía, pirotecnia, cloración a vidrios y por algunas actividades mineras, entre otras. Las partículas de plomo libres que son emanadas a la atmósfera a partir de dichos procesos, precipitan en los suelos o en las aguas, acumulándose así en los cuerpos de los organismos y seres que allí habitan, afectando su vital funcionamiento y entrando en las cadenas alimenticias.

Todos los compuestos de plomo son tóxicos en diferente grado, dependiendo de su naturaleza química y grado de solubilidad de cada compuesto, los más dañinos son los compuestos orgánicos. Las dos principales vías de acceso de los compuestos de plomo al organismo son el tracto gastrointestinal y los pulmones. Cerca del 10% del plomo ingerido es excretado en la orina y en menor cantidad en el sudor, en el pelo y en las uñas. El 90% del plomo que se encuentra en el cuerpo humano se deposita en el esqueleto óseo y es relativamente inerte, y el que pasa a través del torrente sanguíneo puede depositarse en los tejidos.

El plomo puede causar varios efectos no deseados, como son (García A., 1996): Perturbación de la biosíntesis de hemoglobina y anemia, incremento de la presión sanguínea, daño a los riñones, abortos, perturbación del sistema nervioso, daño al cerebro, disminución de la fertilidad del hombre a través del daño en el esperma, disminución de las habilidades de aprendizaje de los niños, perturbación en el comportamiento de los niños, como es agresión, comportamiento impulsivo e hipersensibilidad.

3.5.1.2 Cromo (Cr). Generalmente no se considera que el cromo metálico y los compuestos de cromo (III) sean un riesgo para la salud; se trata de un elemento esencial para el ser humano, pero en altas concentraciones resulta tóxico. El cromo entra en el aire, agua y suelo en forma de cromo (III) y cromo (VI) a través de procesos naturales y actividades humanas como son: el acero, las peleterías, las industrias textiles, pintura eléctrica y otras aplicaciones industriales. Este metal en estado (VI) es tóxico para los organismos, siendo la dosis letal de unos pocos gramos, causando problemas respiratorios, erupciones cutáneas, daño en riñones e hígado, infertilidad, alteración en el material genético y cáncer (Camean, 1995). No se ha comprobado que el cromo se acumule en los peces, pero altas concentraciones de éste, debido a la disponibilidad de metales en las aguas

superficiales, pueden dañar las agallas de los peces que nadan cerca del punto de vertido (García A., 1996)

3.5.1.3 Cadmio (Cd). El cadmio es tóxico y su envenenamiento se produce al inhalarlo o ingerirlo, tiene gran tendencia a formar compuestos con complejos acuosos en los que se une de uno a cuatro ligandos. Sus compuestos más importantes en la industria son el cianuro, la amina y varios complejos de haluros. De forma natural 25.000 toneladas al año son liberadas al ambiente. (CAMEAN, A. Toxicología Avanzada, 1995).

La mitad de este cadmio es liberado en los ríos a través de la descomposición de rocas y algún cadmio es liberado al aire a través de fuegos forestales, volcanes y por las actividades humanas, como es la manufacturación en la producción de zinc, fertilizantes fosfatados artificiales y las bioindustrias del estiércol. Este metal generalmente llega a las aguas superficiales cuando algunos fertilizantes son aplicados en las granjas y de esta forma son absorbidos por las plantas para quedar finalmente en los alimentos que consumen tanto humanos como animales; es así como se han encontrado grandes cantidades de cadmio en las vacas principalmente en sus riñones.

Los efectos que puede causar el cadmio en la salud son: diarreas, dolor de estómago y vómitos severos, fractura de huesos, fallas en la reproducción y posibilidad incluso de infertilidad, daño en el sistema nervioso central, sistema inmune, desórdenes psicológicos, posible daño en el ADN o precursor de cáncer. (Cai, Yue, & Nordberg, 1998).

3.5.1.4 Mercurio (Hg). El mercurio se ha visto siempre con fascinación y asombro porque es el único metal líquido en condiciones ambientales. Es casi insoluble en agua, por lo que no eran considerados, durante mucho tiempo, como contaminantes. Es un elemento que puede ser encontrado de forma natural en el medio ambiente; en forma de metal, como sales de mercurio o como mercurio orgánico. No es encontrado de forma natural en los alimentos, pero éste puede aparecer en la comida así como ser expandido en las cadenas alimenticias por pequeños organismos que son consumidos por los humanos, por ejemplo a través de los peces. (Fernandes de Sá Ferreira, I. C., & Degrazia P., M. H. (2001). Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mutation Research*, 490, 141-158).

La contaminación del agua por mercurio es originada por industrias químicas que producen cloro, fábricas de fungicidas, pinturas contra hongos, plásticos, minas de cinabrio (sulfuro de mercurio, HgS), en la extracción de oro y de plata y por las refinerías del petróleo. Se considera que la mitad del mercurio extraído es arrojado al medio ambiente, una parte en forma de vapor a la atmósfera y otra en los desechos industriales al suelo y al agua. Cuando el mercurio alcanza las aguas superficiales o suelos, algunos microorganismos pueden biotransformarlo en metil

mercurio, una sustancia que puede ser absorbida rápidamente por la mayoría de los organismos como los peces que metabolizan una gran cantidad de metil mercurio. Como consecuencia, el metil mercurio puede acumularse en peces, encontrándose concentraciones mucho más altas en los lugares donde habitan, y de esta forma entra en la cadena alimenticia a la que pertenecen. Este metal tiene un número de efectos sobre los humanos entre los que se destacan: lesiones renales, daño al sistema nervioso, a las funciones del cerebro, al ADN y cromosomas, reacciones alérgicas, irritación de la piel, cansancio, y dolor de cabeza, efectos negativos en la reproducción, daño en el esperma, defectos de nacimientos y abortos. (Weiner & Nylander, 1993)

3.6 ESPECIACIÓN QUÍMICA DE METALES PESADOS

Tokatlioglu (2000) menciona en su trabajo que las trazas de metales pesados existentes en aguas de río están presentes en varias formas fisicoquímicas, las cuales incluyen hidroxocomplejos, complejos orgánicos e inorgánicos y partículas coloidales. Así pues, la especiación química de metales pesados es un tema de interés en el análisis de agua pues el comportamiento geoquímico y los efectos biológicos de los metales pesados dependen enormemente de sus formas fisicoquímicas. Este ha sido un tema que ha tomado impulso en los estudios del medio ambiente y del tratamiento de aguas residuales. Las cantidades totales de metales presentes constituyen una medida poco representativa de la posible toxicidad de un metal pesado. Resulta fundamental conocer la forma química bajo la que se presenta, es decir la especiación, pues la toxicidad de un elemento es muy distinta dependiendo de su presentación, que va a regular no sólo su disponibilidad (según se encuentre disuelto, adsorbido, ligado o precipitado) sino que también el grado de toxicidad que presente va a depender de la forma química de sí misma. No obstante, por su facilidad de medida y reproducibilidad, en los estudios de contaminación se utilizan muy frecuentemente los valores totales para definir los umbrales de contaminación. El tipo de sustancia contaminante y la forma bajo la que se presente (soluble, cambiante, ligada, adsorbida, ocluida) va a influir decisivamente en el efecto contaminante producido.

3.7 LOS ÁCIDOS HÚMICOS Y FÚLVICOS COMO COMPONENTES DE LAS AGUAS NATURALES Y SU INTERACCIÓN CON LOS IONES METÁLICOS

Los ácidos húmicos se presentan como sólidos amorfos de color marrón oscuro, generalmente insolubles en agua y en casi todos los disolventes no polares, pero fácilmente dispersables en las soluciones acuosas de los hidróxidos y sales básicas de los metales alcalinos, constituyendo un hidrosol que puede experimentar floculación mediante el tratamiento de los ácidos o los demás cationes. Estudios estructurales del Departamento de Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Granada establecen en sus investigaciones que las moléculas parecen estar constituidas por un núcleo de naturalezas aromáticas más o menos condensadas,

y de una región cortical con mayor predominio de radicales alifáticas, presentando en conjunto el carácter de heteropolímeros condensados (Dorronsoro, 2010).

Los ácidos fúlvicos, por su parte, constituyen una serie de compuestos sólidos o semisólidos, amorfos, de color amarillento y naturaleza coloidal, fácilmente dispersables en agua y no precipitables por los ácidos, susceptibles en cambio de experimentar floculación en determinadas condiciones de pH y concentración de las soluciones de cationes no alcalinos. Algunas de las complejas estructuras moleculares de los ácidos húmicos y fúlvicos se muestran en las Figuras 2 y 3, según lo plantea Wandruszka, (2000).

Figura 2. Estructura molecular de un ácido húmico

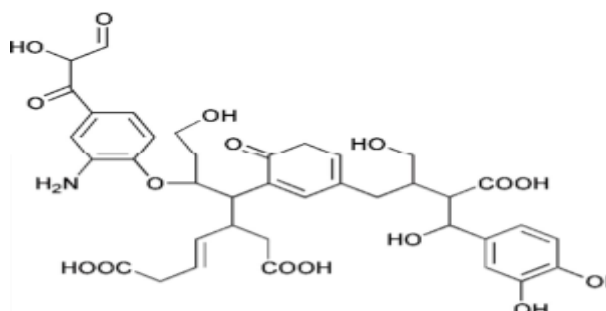
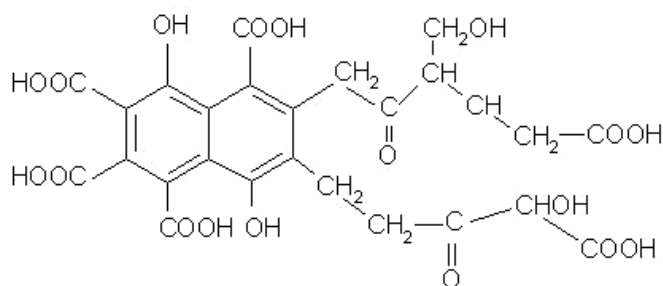


Figura 3. Estructura molecular de un ácido fúlvico



Los ácidos húmicos y fúlvicos son también conocidos por interactuar con varios iones metálicos, óxidos metálicos hidratados, minerales arcillosos y compuestos orgánicos. Las sustancias húmicas, principales constituyentes de las aguas naturales se interaccionan fuertemente con varios metales pesados para formar complejos húmicos y afectar el comportamiento de adsorción-desorción de los metales en técnicas donde se manejen clases de resinas poliméricas adsorbentes. Las formas fisicoquímicas de los complejos metálicos-húmicos,

pueden ser complicadas pues éstos pueden existir libres o permanecer adsorbidos en otras partículas coloidales, según indican (Tokalioğlu *et al.* 2000).

En consecuencia, han surgido métodos tales como la coprecipitación, la adsorción en resinas poliméricas y las separaciones con resinas de intercambio iónico usados para la especiación y determinación de iones metálicos libres y asociados a sustancias húmicas presentes en aguas naturales y servidas o residuales.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 UBICACIÓN DE LOS PUNTOS DE MUESTREO

El muestreo se realizó en aguas superficiales del río Cauca en el municipio de Cali en cinco puntos, abarcando desde el sur de la ciudad en un lugar próximo al puente El Hormiguero, hasta la desembocadura del río Cali, en el norte de la ciudad; estos puntos fueron elegidos teniendo en cuenta la importancia de los mismos, de acuerdo con la utilización de sus aguas y frente al potencial de descargas contaminantes que reciben por ejemplo, la descargas de lixiviados de Navarro en el Canal Colector Sur (Instituto de Hidrología, 2008).

Los puntos de muestreo fueron los siguientes (ver figura 4):

1. Punto de muestreo uno (P1): El Puente de El Hormiguero cuyas coordenadas geográficas son latitud norte N $3^{\circ} 18' 09,2''$, longitud oeste W $76^{\circ} 28' 50,8''$ y altitud 978.3 m.
2. Punto de muestreo dos (P2): Desembocadura del Canal Colector Sur con coordenadas N: $3^{\circ} 22' 40,2''$, W: $76^{\circ} 28' 17,7''$ y altitud 967.1 m.
3. Punto de muestreo tres (P3): Bocatoma de la PTAP de Puerto Mallarino con coordenadas N: $3^{\circ} 26' 45,4''$, W: $76^{\circ} 28' 30,4''$ y altitud 966.6 m.
4. Punto de muestreo cuatro (P4): Puente de Juanchito con coordenadas N: $3^{\circ} 26' 59''$, W: $76^{\circ} 28' 32,1''$ y altitud 963.6 m.
5. Punto de muestreo cinco (P5): Desembocadura del Río Cali con coordenadas N: $3^{\circ} 30' 20,9''$, W: $76^{\circ} 29' 29,8''$ y altitud 965.8 m.

4.2 MUESTREOS

Las muestras fueron tomadas, en jornadas de alta y baja precipitación pluvial, en el periodo 2008-2013. En cada uno de los puntos de muestreo seleccionados se tomaron 3.0 L de muestra de agua superficial (30 a 50 cm de profundidad), las muestras se preservaron con ácido nítrico concentrado hasta tener un pH cercano a 2, condición que favorece la preservación de metales para la especiación y cuantificación (Junk, et al., 1974).

Map of the Cauca River basin in Colombia, showing the river's course and various infrastructure points. The map includes labels for towns like EL SALADITO, LA CASTILLA, MONTEBILLO, LA PAZ, GOLONDRIÑA, LA CAVERALEJO, LA BUITRERA, PANCE BAJO, EL HORMIGUERO, and JAVARRO. It also shows the Cauca River and its tributaries. Five specific points are highlighted with red circles and labeled: P1. Puente de El Hormiguero, P2. Desembocadura del Canal CVC-Sur, P3. Bocatoma de la PTAP de Puerto Mallarino, P4. Puente de Juanchito, and P5. Desembocadura del Río Cali. A red arrow points to the main river, labeled RIO CAUCA.

4.3.1 Reactivos utilizados para la cuantificación de Cd, Cr y Pb

32

4.3.2 Reactivos utilizados para cuantificar el Hg

- Ácido sulfúrico concentrado (Panreac)
- Permanganato de potasio, reactivo sólido (MERCK)
- Persulfato de potasio, reactivo en cristales (MERCK)
- Cloruro de hidroxilamina, reactivo sólido (MERCK)
- Cloruro estañoso, reactivo en cristales (Panreac)
- Ácido clorhídrico concentrado (MERCK)
- Patrón de 1000 ppm de mercurio (JT Baker)

4.3.3 Preparación del material. El material de vidrio utilizado fue AA previamente lavado con detergente no iónico neutro, baño con solución de ácido nítrico al 10% y secado en horno utilizando agua doblemente deionizada para el enrase respectivo de las soluciones.

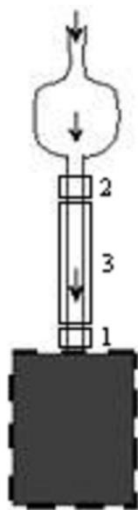
4.3.4 Equipos. Las lecturas de plomo, cromo y cadmio se realizaron mediante espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (FAAS) en un equipo Shimadzu AA-6300 (P/N 206-51800). Para el mercurio se utilizó un sistema analizador de inyección de flujo (FIMS-100) de la marca Perkin-Elmer. Los equipos contaban con lámpara de deuterio para la corrección de ruido de fondo (corrector de fondo-Método de corrección de una fuente continua).

4.4 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS METALES Pb, Cd Y Cr POR RESINA.

4.4.1 Preparación de la resina Amberlite XAD16 en la columna. Una cantidad de 400 mg de la resina Amberlite XAD-16 fue puesta en suspensión de agua deionizada y depositada directamente al interior de una columna de vidrio de 1 cm de diámetro y 3.5 cm de longitud, con una abertura en la parte superior que posee una llave que controla el flujo de salida en su parte inferior. Se instalaron cuatro de estas columnas para los análisis. Previamente a este paso se acondicionó un centímetro de lana de vidrio en el interior de la columna, el cual servirá de soporte para la resina que ha sido introducida adicionando otro centímetro de lana de vidrio en la parte superior para completar la preparación.

La Figura 5 muestra un esquema de la columna utilizada y de la ubicación de la resina Amberlite XAD-16 en su interior. Las flechas indican el sentido de recorrido de la muestra en la columna. Para esto a los 400 mg de resina Amberlite que han sido introducidos en la columna, se lava con 25 ml de soluciones recién preparadas en el siguiente orden: metanol, agua deionizada, HNO_3 1M en acetona, agua deionizada, NaOH 1M y finalmente agua deionizada. Cada una de estas soluciones se hace pasar a través de la columna con un flujo de 2-2.5 ml/min (Tokatlioglu et al., 2000).

Figura 5. Esquema de la columna de vidrio utilizada en la especiación de plomo, cromo y cadmio.

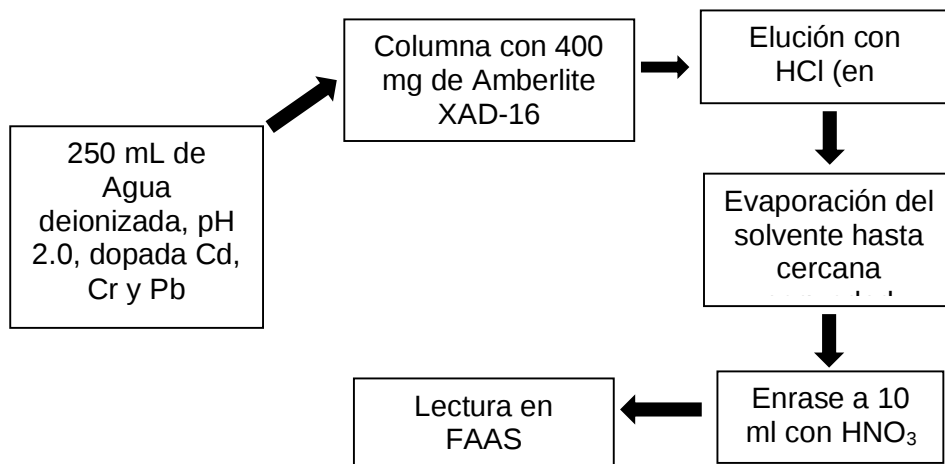


4.4.2 Ensayos preliminares de adaptación de la técnica de especiación. Se procedió a realizar algunos ensayos preliminares de ajuste con el fin de conseguir las condiciones óptimas experimentales mediante la estimación del nivel de adsorción y desorción de iones metálicos libres en la resina polimérica Amberlite XAD-16, con base en la técnica de especiación utilizada por Tokatlioglu en aguas del lago Sultansazhgt.

El esquema mostrado en la Figura 6 resume el procedimiento experimental llevado a cabo en los ensayos. Estos ensayos fueron realizados usando muestras de agua doblemente deionizada dopada con concentraciones conocidas de metales pesados (plomo, cromo y cadmio) en partes por millón.

Se realizaron dos ensayos, donde variaron las condiciones de flujo de salida de la muestra a través de la columna, así como la cantidad de resina Amberlite utilizada. La solución preparada de agua dopada con metales pesados se hizo pasar a través de la columna que contiene la resina Amberlite XAD-16. Los iones metálicos libres adsorbidos en la columna fueron eluidos con HCl 1M en acetona. A partir de esta elusión se obtuvo un extracto mediante evaporación hasta cercana sequedad y enrase a 10 ml con solución de HNO_3 2 M. La lectura de plomo, cromo y cadmio de este extracto y la del efluente fue realizada mediante FAAS.

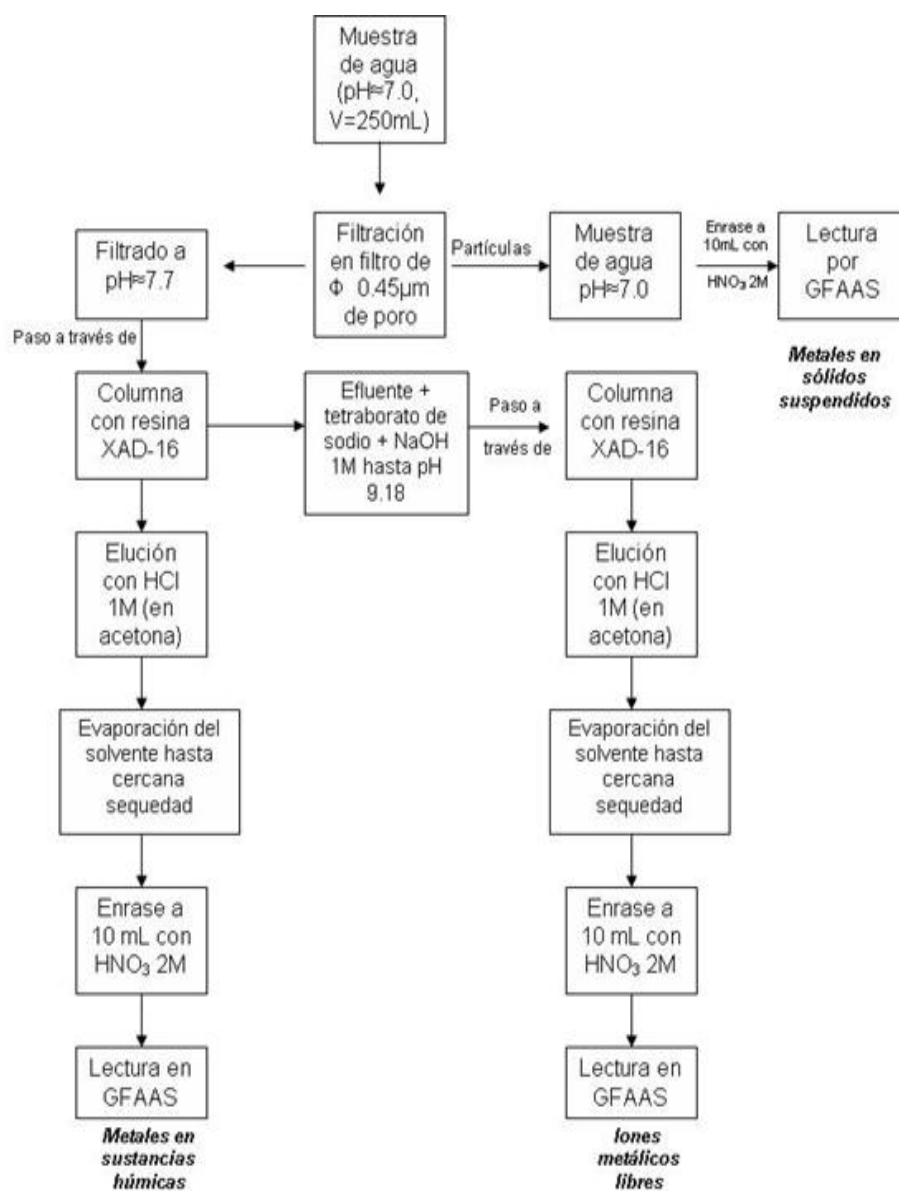
Figura 6. Procedimiento utilizado en ensayos preliminares con agua dopada.



Para dichos ensayos se preparó en un balón aforado una solución de 250 mL de agua deionizada dopada con concentraciones de 4 ppm de plomo, 2 ppm de cromo y 0.5 ppm de cadmio. Mediante el paso de esta muestra por la columna, en los experimentos respectivos, se pudieron determinar las condiciones ideales de trabajo mediante el cálculo de porcentajes de retención/desorción, que de manera simultánea nos ayudarán a determinar el nivel de iones metálicos libres retenidos por la resina o no, en ausencia de sustancias húmicas y fúlvicas.

4.4.3 Especiación de metales en muestras del río Cauca. Se adecuó el procedimiento llevado a cabo para la especiación de metales en aguas de lago empleado por Tokatlioglu, de esta forma las muestras de agua del río Cauca fueron separadas en tres fracciones que corresponden a metales presentes en sólidos suspendidos, asociados a sustancias húmicas y metales iónicos libres como se muestra en la Figura 7.

Figura 7. Especiación de metales pesados en muestras del río



4.4.3.1 Metales en sólidos suspendidos. Cada una de las muestras respectivas de agua del río, fueron filtradas a través de un filtro membrana de 47 mm de diámetro, que posee un diámetro de poro de 0.45 μm . Por cada punto se tomó un volumen de 250 ml de muestra. Los sólidos suspendidos retenidos junto con la membrana, fueron digeridos en 15 ml de HNO_3 concentrado y evaporados hasta cercana sequedad. Finalmente, se enrasó a un volumen de 10 ml con solución de HNO_3 2 M, previamente preparada. El blanco en este procedimiento correspondió a la

digestión en ácido nítrico concentrado de uno de los filtros membrana, con el previo paso de 250 ml de agua deionizada. Este también se enrasó a un volumen de 10 ml con solución de HNO_3 2 M.

4.4.3.1.1 Metales asociados a sustancias húmicas. Una alícuota de 250 mL de la muestra filtrada fue pasada a través de la columna que contiene la resina Amberlite XAD-16 a un flujo entre 2-2.5 ml/min con el fin de adsorber los metales asociados a sustancias húmicas (ácidos húmicos y fúlvicos, por ejemplo). El efluente fue guardado para el análisis posterior. Los metales que fueron sorbidos por la resina fueron eluidos a un flujo de 1 ml/min en un erlenmeyer de 125 ml con 25 mL de solución recién preparada de HCl 1 M en acetona. Esta elución se colocó en plancha calentadora a temperatura moderada hasta cercana evaporación. Finalmente, se enrasó a 10 ml con solución de HNO_3 2 M.

4.4.3.1.2 Iones metálicos libres. En el orden de determinar los iones metálicos libres presentes en las muestras del río, una cantidad de 0.95 g de tetraborato de sodio fue adicionado al efluente (solución a pH 9.18) continuando el proceso anterior éste nuevamente se hace pasar a través de la columna que contiene la resina Amberlite XAD-16. Los metales adsorbidos en la resina fueron desorbidos de nuevo con solución recién preparada de HCl 1 M en acetona. La elución se instaló sobre una plancha de calentamiento a temperatura moderada hasta evaporar. Se dejó enfriar y se enrasó a 10 ml con solución de HNO_3 2 M.

4.4.4 Procedimientos analíticos para la determinación de Cd, Cr y Pb. Se realizaron curvas de calibración respectivas de cinco estándares cuidadosamente preparados y lecturas de absorbancia en el equipo a tres réplicas. Se preparó una muestra blanco, siguiendo el procedimiento llevado a cabo con las muestras del río. Simultáneamente, para las lecturas de las muestras se prepararon patrones de chequeo, es decir soluciones de concentración conocida para el control de la sensibilidad y la reproducibilidad del equipo de absorción atómica. Para la lectura de cadmio se preparó un patrón de chequeo de 1 ppb y para cromo de 10 ppb, al igual que para plomo. Dichos patrones se prepararon enrasando con solución de HNO_3 de concentración 0.01% volumen-volumen.

4.4.5 Condiciones instrumentales para la cuantificación de Cd, Cr y Pb. En cuanto a la programación de la temperatura en cada una de las fases del horno de grafito (secado, carbonización, atomización y limpieza), se tomaron los valores óptimos obtenidos experimentalmente. En la Tabla 1 están consignadas la longitud de onda, corriente (mA) y Slit(nm) para el Cd, Cr y Pb, usadas para estas determinaciones.

Tabla 1. Condiciones instrumentales para la cuantificación de plomo, cromo y cadmio por absorción atómica de horno de grafito obtenidos experimentalmente.

Metal	Longitud de onda (λ)	Corriente (mA)	Slit (nm)
Plomo (Pb)	283.3	10	0.7
Cadmio (Cd)	228,8	8	0.7
Cromo (cr)	278.2	10	0.7

Las rampas de temperaturas utilizadas para la cuantificación de los analitos, se indican en las tablas 2, 3 y 4.

4.5 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL MERCURIO

A diferencia de los otros metales que se cuantifican por el método de atomización, en la determinación del Mercurio (Hg), se utilizó el método de vapor frío, ya que es el único elemento metálico que tiene una presión de vapor apreciable a temperatura ambiente (Kopp, Longbottom, & Lobring, 1972). Todo el mercurio de la muestra se convirtió en Hg (II) y posteriormente se redujo a Hg⁰ por adición de cloruro de estaño (SnCl₂) o borohidruro de sodio (NaBH₄) que actúan como agente reductor. El mercurio volátil se arrastró por un gas inerte (Ar) a una celda de cuarzo interpuesta sobre el paso óptico.

Tabla 2. Rampa de temperatura para la cuantificación de cadmio

Etapas	Tiempo (S)	Temperatura(°C)	Flujo Ar (MI/Min)
Desecación	30	110-250	0.1
Calcinación	23	500	1.0
Atomización	2	2200	0
Limpieza	2	2400	1.0

Tabla 3. Rampa de temperatura para la cuantificación de plomo

Etapa	Tiempo (s)	Temperatura(°C)	Flujo Ar (ml/min)
Desecación	40	80-110	0.1
Calcinación	20	500-800	1.0
Atomización	2	2400	0
Limpieza	2	2500	1.0

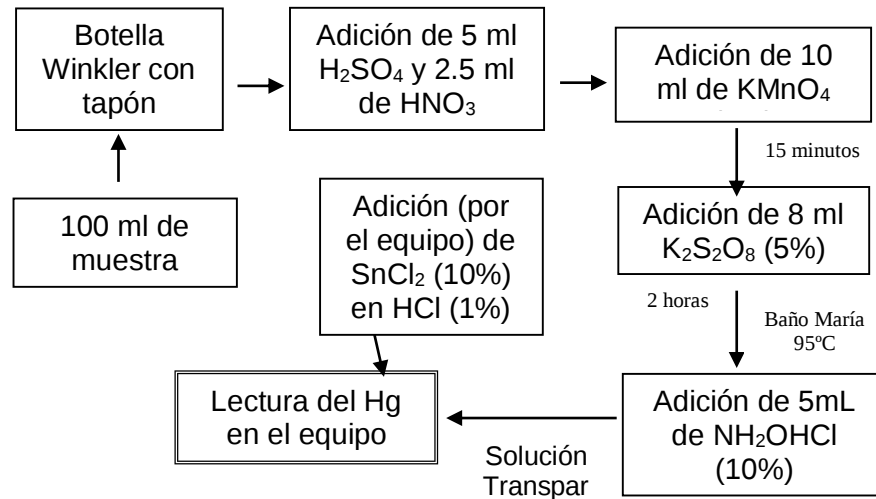
Tabla 4. Rampa de temperatura para la cuantificación de cromo

Etapa	Tiempo (s)	Temperatura(°C)	Flujo Ar (ml/min)
Desecación	40	80-110	0.1
Calcinación	20	500-800	1.0
Atomización	2	2400	0
Limpieza	2	2500	1.0

4.5.1 Preparación de la muestra. El análisis de mercurio tanto para los puntos de la curva de calibración, el blanco y las muestras del río, se llevó a cabo mediante digestión ácida en baño maría, con un proceso simultáneo de oxidación con permanganato de potasio y persulfato de potasio para luego cuantificar por la técnica de vapores fríos usando bromuro de hidroxilamina como eliminador de exceso de oxidante y cloruro estañoso en solución de ácido clorhídrico al 1% como reductor de iones mercúricos a vapores de mercurio.

La Figura 8 muestra los pasos realizados en la preparación de las muestras y la curva de calibración. Dicho proceso es realizado según los procedimientos estándar y las metodologías usuales que se practican para la determinación y cuantificación de mercurio por espectrometría de absorción atómica por vapores fríos en muestras de aguas, según el compilado de Standard Methods for The Examination of Water and Waste Water. Un volumen de muestra de río de 100 ml se introdujo en una botella winkler con tapón esmerilado previamente lavada y completamente seca. A ésta se adicionaron 5 ml de H₂SO₄ concentrado y 2.5 ml de HNO₃ concentrado. A esta muestra acidificada se le agregaron 10 ml de solución al 5% de KMnO₄, un agente oxidante fuerte, dejándolo actuar por 15 minutos; luego se añadieron 8 ml de solución al 5% de otro agente oxidante, K₂S₂O₈.

Figura 8. Procedimiento utilizado en preparación de muestras para lectura de mercurio.



Las botellas winkler con esta solución se taparon y se colocaron en un baño maría a 95 °C por un lapso aproximado de 2 horas. Posteriormente, se adicionó 5 mL de NH_2OHCl como agente reductor eliminador de excesos del oxidante del paso anterior; la solución en este punto, se tornó de color púrpura a transparente y quedó lista para el acondicionamiento en el equipo de vapores fríos y su posterior lectura.

4.5.2 Condiciones instrumentales para la cuantificación de mercurio. De igual forma que con las muestras, se preparan mediante el diagrama de flujo descrito en el esquema de la Figura 8. La curva de calibración, de acuerdo con el rango de linealidad del equipo usado, se realizó con cinco estándares de 5, 10, 20, 30 y 40 ppb preparados a partir de una solución patrón de mercurio de concentración de 1000 ppm. Se preparó un blanco para obtener absorbancias corregidas en los cálculos y los patrones de chequeo de 40 ppb de mercurio para la verificación de la sensibilidad del equipo en el análisis. El equipo de vapores fríos en mención, está provisto de un sistema mecánico capaz de absorber mediante capilares la cantidad justa de muestra, de la solución de SnCl_2 y de un blanco de dilución que consiste en solución de HCl al 1% (v/v). La mezcla la realiza el sistema y los vapores de mercurio son dirigidos hacia la celda para su absorción y lectura. En la tabla 5 se presentan las condiciones instrumentales usadas en el equipo (Corporation S. Analytical & Division M. I., 2006).

Tabla 5. Condiciones instrumentales para la cuantificación de mercurio (Hg), por absorción atómica vapor frío

Condiciones instrumentales	Parámetros
Corriente de la lámpara (mA)	8.00
Longitud de onda (nm)	253.70
Ancho de Abertura (nm)	0.70
Modo de la lámpara	BGC-D2
Tiempo de respuesta (min)	1.00

4.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD MUTAGÉNICA POR EL TEST DE AMES.

La aplicación del test de Ames se hizo en el Laboratorio de Microbiología Industrial y Ambiental (MIA) del Departamento de Biología de la Universidad del Valle. Para el test de Ames se utilizaron dos variedades de cepas modificadas de *S. typhimurium* (Cepa TA98 y Cepa TA100) (Moltox Inc.) que son modificadas en el operón de la histidina y las vuelven histo-dependiente. Además de la mutación en el operón de la histidina, las cepas tienen otro tipo de mutaciones, que permiten manipularlas con mayor facilidad y obtener mejores resultados en la prueba de compuestos que causan mutagénesis. Las cepas TA98 y TA100 se conservaron a -80 °C, por tanto, se realizó un procedimiento para reactivar las cepas y probar que las cualidades genotípicas de interés aún estuvieran activas.

4.6.1 Reactivación de las cepas. Para la reactivación de las cepas, se partió de los liofilizados de cada una de ellas. Primero se prepararon 25 ml de caldo nutritivo (Oxoid N°2), al cual se le adicionó una pastilla del liofilizado de la bacteria. El caldo se incubó durante la noche a 37 °C y se agitó en Vibramax 110 de HEIDOLPH a 120 revoluciones por minuto (rpm). Al día siguiente, de este caldo se extrajo 1 mL y se adiciono a otros 25 ml de caldo nutritivo, al cual se le realizó el mismo proceso de incubación. Al día siguiente, se hizo un conteo de bacterias con ayuda de un microscopio, ya que es necesario que la población de bacterias este entre 1.0 y 2.0 x10⁹ dentro del caldo (Mortelmans & Zeiger, 2000; Ames B. , 1974 y Maron & Ames, 1983). Después de verificar el crecimiento, se sembraron en cajas de Petri con agar mínimo glucosa (Oxoid) (medio Vogel-Bonner 50X, glucosa 0.5% a 2% p/v, agar 1.5% p/v) y exceso de biotina, histidina y ampicilina (Merck). Finalmente, las cajas se guardaron en el congelador a -20°C.

4.6.2 Revisión de las características genotípicas. Las cepas TA98 tienen dos mutaciones y un plásmido que permiten evaluar la actividad mutagénica por su sensibilidad a múgatenos (Tabla 6)

Tabla 6. Características genéticas de las cepas utilizadas en el test de Ames.

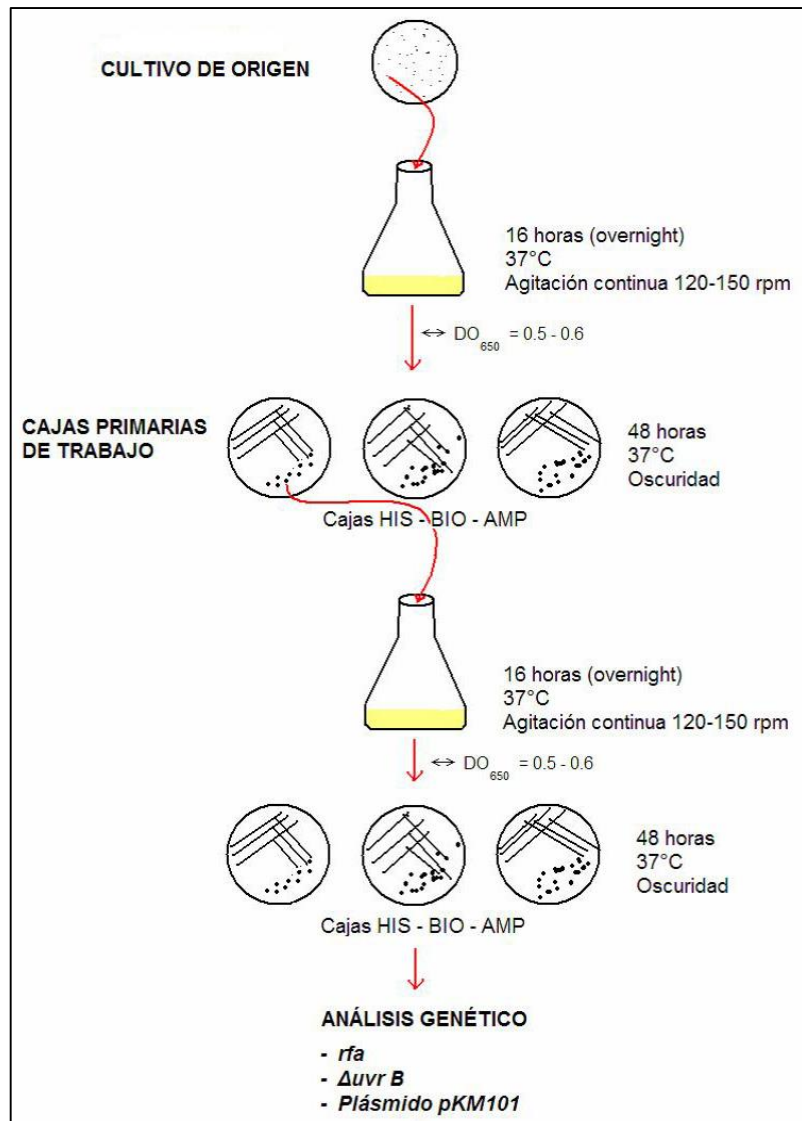
Cepa	Alelo blanco	Mutaciones adicionales			Tipo de mutación
		Lps	Reparación	Factor R	
TA98	hisD3052	rfa	Δ uvrB	+R	Cambio de marco de lectura
TA100	hisG46	rfa	Δ uvrB	+R	Cambio de pares de bases

Estas características genéticas, que son valiosas para evaluar las sustancias que se presumen como mutagénicas, se pierden con facilidad, razón por la cual es necesario realizar de manera constante pruebas para verificar que las cepas aún las conservan. El criterio de decisión para aceptar la cepa TA98 y TA100 fue el número de colonias revertantes espontáneas por cada caja de acuerdo con Maron & Ames (1983) y Mortelmans & Zeiger (2000). Las marcas genotípicas, los cuales se describen en la Tabla 7 y el esquema general de este proceso se muestran en la Figura 9.

Tabla 7. Marcas genéticas presentes en las cepas TA98 y TA100.

Cepa	His ⁻	Δ uvrB	Plásmido pKM101	rfa	Revertantes Aceptable
TA98	+	+	+	+	20-50
TA100	+	+	+	+	75-200

Figura 9. Esquema general del proceso de reanimación, purificación y análisis genético realizado con las cepas TA98 y TA100



4.6.2.1 Requerimiento de histidina. Se mezclaron 0.1 ml de L-histidina 0.1 M y 0.1 ml de biotina 0.5 mm en un plato de GM; la histidina se esparció en la placa antes de adicionar la biotina. Se sembraron placas control de biotina y de histidina-biotina y se incubaron a 37°C; estas no presentaron crecimiento.

4.6.2.2 Mutación rfa. Para esta prueba se adicionaron 0.1 ml del caldo de cultivo en una placa de agar; posteriormente, se vertieron 10 μ l de solución de cristal violeta (1mg/mL) en el centro de un disco de papel filtro Whatmann estéril que se colocó en el plato de agar. Después de 24 horas de incubación a 37°C, se observó una zona de inhibición de aproximadamente 14 mm alrededor del disco, que indicó la presencia de la mutación rfa. La mutación rfa permite que la bacteria no construya la barrera de lipo-polisacárido que la rodea y las hace más permeables a las sustancias a las que son expuestas (Maron & Ames, 1983; Mortelmans & Zeiger, 2000).

4.6.2.3 Mutación uvrB. Para esta prueba, se sembraron alícuotas de las cepas en cajas de Petri con agar, se taparon hasta la mitad con papel aluminio o cartulina negra previamente esterilizada, para después irradiarlas con luz ultravioleta de una lámpara germicida de 15 W y 280 nm de longitud de onda a una distancia de 33 cm por 15 segundos. Después de ser irradiadas, las cajas se incubaron durante 24 horas a 37°C, y luego se observó el lado que no fue irradiado.

4.6.2.4 Factor R (Plásmido pKM101. Las cepas *S. typhimurium* se sembraron durante 12 a 24 horas en un agar con un mínimo de glucosa en 0.1 ml de ampicilina a 0.1 M (10 μ L de 8 mg/ml en 0.02 N NaOH). Solo crecieron las cepas que tuvieron el plásmido pKM101. Es decir, se observó para las dos una mutación y reversión espontánea (Maron & Ames, 1983; Mortelmans & Zeiger, 2000).

4.6.3 Preparación de la mezcla del Activador Enzimático S9. La mezcla del S9 tiene poco tiempo de viabilidad, por tal razón esta mezcla se preparó el mismo día del ensayo de Ames. Para nuestro ensayo se prepararon 2 ml de la mezcla S9 que contenía: 1600 μ L de la fracción, 320 μ L de $MgCl_2$ 0.4 previamente esterilizado en autoclave, 1320 μ L KCl 1.65 M, 200 μ L de Glucosa-6-fosfato 1 M, 160 μ L de NADP 0.1 M (Merck) y 4000 μ L de agua estéril. Las soluciones salinas de $MgCl_2$, KCl y fosfato de sodio de pH 7.4 se prepararon con anterioridad al ensayo, siendo esterilizadas en autoclave y guardadas a 4 °C al contrario de las soluciones de Glucosa-6-fosfato y NADP que no fueron esterilizadas en autoclave pero preparadas con agua estéril antes del ensayo y guardadas a -4 °C. La fracción se preparó con 2 ml de agua estéril agregada a la ampolla con el polvo del extracto enzimático (Maron & Ames, 1983)

4.6.4 Controles positivos y negativos. En los experimentos de los controles positivos y negativos de las cepas se agregó al plato de GM, agar de superficie procurando que se esparciera por todo el plato, teniendo en cuenta que las sustancias químicas añadidas con anterioridad al tubo de ensayo fueron: para la cepa TA100, 50 μ L de 2-aminofluoreno (1 mg/ml) cuando se trabaja sin activador enzimático. Con activador se utiliza Azida de Sodio (iguales cantidades) como control positivo y 50 μ L de DMSO (1 mg/ml) como control negativo. Para la cepa TA98 sin activador enzimático, se utilizaron 50 μ L de 2-aminofluoreno, en cambio con activador se utilizaron 50 μ L de 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO) (1 mg/ml) como control

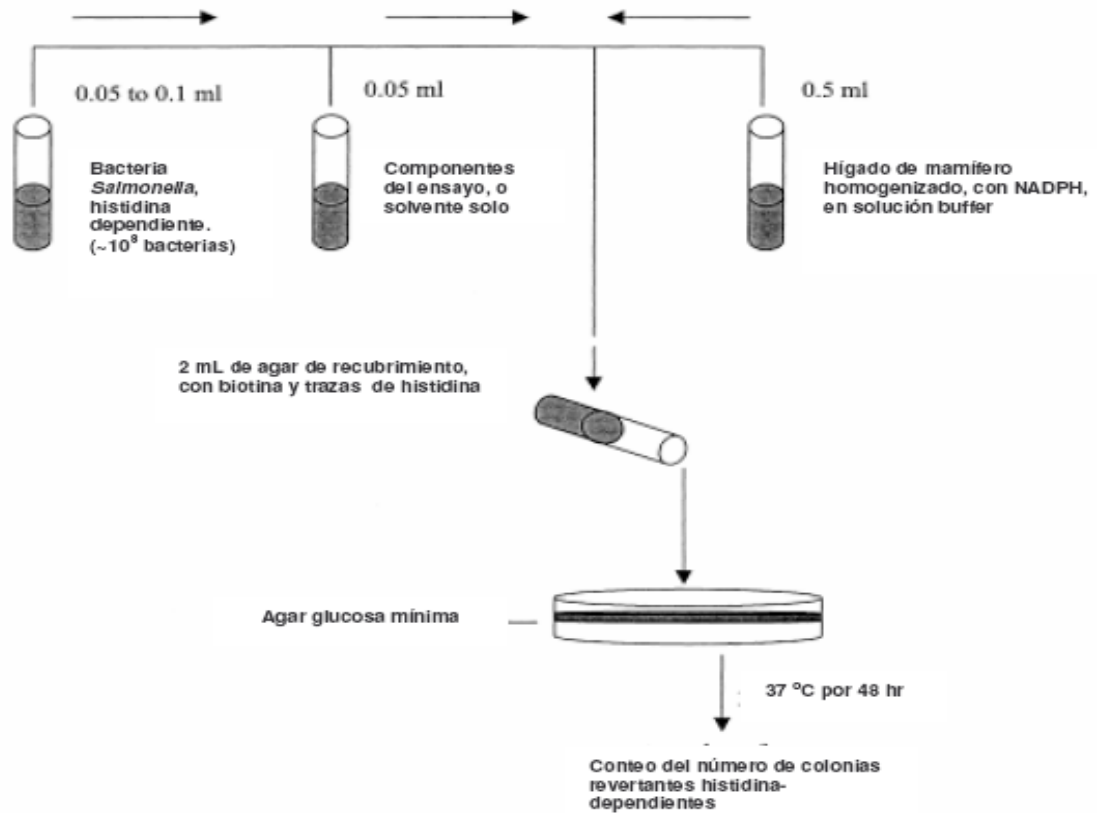
positivo y 50 µL de DMSO (1 mg/ml) como control negativo. Todas las cajas de Petri fueron incubadas a 37 °C por 48 horas. El control positivo se realizó para observar si las cepas aún conservaban las características que son de interés en el ensayo de Ames.

Los resultados de los controles indicaron que la bacteria estaba creciendo de una forma adecuada para el ensayo. Cuando todas las marcas genéticas están presentes, se muestra reversión con mutágeno estándar y en los controles positivos si el número de revertantes espontáneos coincide con los números reportados, entonces la cepa se considera óptima para el test de Ames. (Mortelmans & Zeiger, 2000).

4.6.5 Ensayo de Mutagénesis. Los extractos obtenidos en la especiación, aproximadamente 1 ml (metales en sustancias húmicas, iones metálicos libres y metales en sólidos suspendidos) se recolectaron y se mezclaron en un vial, para luego ser llevadas a rotaevaporación. El residuo seco de los sólidos totales fue reconstituido en dimetilsulfóxido (DMSO) hasta un volumen final de 5 ml, y las pruebas de mutagenicidad se realizaron empleando el método de concentración directa (extracto puro) según Ferrão V. *et al.*, 2001 y luego de ser comprobada la presencia de las marcas genéticas de las bacterias se desarrolló la prueba de mutagenicidad mediante el test de Ames (Maron & Ames, 1983) por triplicado, que consistió en un procedimiento de varios pasos: se agregó 0.1 ml de cultivo de la cepa con la densidad óptima ($1-2 \times 10^9$ cél/ml) a 2 ml de agar de superficie mantenido a 43-45 °C, que contenía 0.2 ml de L-histidina/D-biotina 0.5 mm, 0.5 ml de la mezcla de S9 si era el caso y 0.1 ml de los extractos de las muestras del río Cauca a cada uno de las diferentes concentraciones escogidas después del ensayo de dosis-respuesta. Una vez añadido el inóculo se agitó suavemente la mezcla y se vertió rápidamente sobre cajas con GM y se incubaron por 48 horas a 34 y a 37 °C. Cada vez que se realizó el ensayo de Ames se incubaron controles positivos y negativos por triplicado, que permitieron desarrollar un experimento controlado tal como se presenta en la Figura 10.

El número de revertantes espontáneas (por plato), se consideró normal cuando se encuentra en el rango de crecimiento, mostrado en la tabla 7, esperado para cada cepa dentro del ensayo. El índice mutagénico (IM) se calculó dividiendo el número de revertantes inducidas entre el número de revertantes espontáneas del control negativo. Los valores obtenidos mayores a dos se consideraron mutagénicos (M), los índices entre uno y dos se tomaron como levemente mutagénicos (LM) y los índices menores a uno se consideraron como no mutagénicos (NM) (Albadalejo, 1993 y Mortelmans & Zeiger, 2000). El segundo procedimiento usado para la evaluación de los datos fue el incremento del número de revertantes con el número de la dosis. En esta herramienta de análisis se elaboró una línea de tendencia de la curva de dosis-respuesta de los puntos con IM mayor o igual a dos, si el coeficiente de correlación era mayor al 80% y la pendiente positiva se consideraba a la muestra como positiva en la prueba de Ames (Mortelmans & Zeiger, 2000).

Figura 10. Método de incorporación de la bacteria en el plato de GM



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se realizó un estudio de genotoxicidad en las aguas del río Cauca a su paso por la ciudad de Santiago de Cali por los metales Pb, Cr, Cd y Hg, con el propósito de establecer un método rápido, eficaz y adaptado a las características específicas del río, para determinar la correlación de estos metales como posibles sustancias genotóxicas. Es posible presumir la existencia de compuestos de origen genotóxicos en las aguas del río en esta zona, dada la cantidad de efluentes recogidos por su cauce antes y durante su paso por la ciudad.

En primer lugar se preconcentrarán las muestras en una resina AXD16, a fin de concentrar los posibles compuestos metálicos genotóxicos presentes en las aguas, y posteriormente se realizó el Test de Ames (Ames y cols. 1975). Ensayo “in vitro” rápido, sensible, preciso y poco costoso, homologado por la OCDE y la CEE, y recomendado por numerosos investigadores (Ashby, 1986; Dellarco y col. 1986 y Dearfield y col.1991, etc.) como método inicial de dos baterías de ensayos de genotoxicidad, a ser realizados “in vitro”, con organismos procariotas y eucariotas.

Al desarrollar el Test de Ames sobre los extractos especiados se podría emitir un primer juicio sobre el carácter genotóxico de las sustancias investigadas. Por otro lado, el Test de Ames ha sido propuesto como método de vigilancia de vertidos para su evaluación y caracterización toxicológica previa a su liberación a los ríos, a fin de dar cumplimiento a lo estipulado en el punto 4 de la Lista 1 de La Reglamentación de Vertidos: “no contener productos cancerígenos en más de un 0,0196 de acuerdo con la IARC (International Agency for Research on Cancer). Dada la alta correlación existente en la mayoría de sustancias químicas entre su carácter mutagénico y carcinogénico permite que los resultados de los ensayos de genotoxicidad sirvan en parte para cumplimiento a lo estipulado en el mencionado punto, ya que existe una imposibilidad de realizar los ensayos de experimentación animal con cada compuesto químico, por el tiempo que conlleva, el elevado número de animales que supone y sus elevados costos.

Sin considerar el grave problema que generan las mezclas complejas de compuestos químicos, los cuales necesitan ser evaluados como tales mezclas, y no como sustancias químicas individuales, pues los distintos compuestos pueden potenciar o antagonizar sus acciones tóxicas entre si. La imposibilidad a la hora de poder evaluar todas los compuestos existentes en las aguas de los ríos, y menos aún las posibles mezclas complejas, hace que lo único racionalmente posible para controlar mejor la calidad de las aguas de los ríos, sea exigir a cada responsable del vertido, la caracterización toxicológica del mismo previa a la autorización para ser liberado al río, evitando así daños posteriores (y en ocasiones irreparables) al hombre y al medio ambiente (de la Fuente y Frutos, 1995).

Posteriormente a la evaluación y/o caracterización inicial de una sustancia química o de un vertido mediante el test de Ames, se deben aplicar otros ensayos genotóxicos, ó identificar la sustancia del riesgo en las mezclas complejas, mediante técnicas instrumentales convencionales como la técnica de mitocondrial de ADN.

En el presente estudio, al aplicar el Test de Ames a las muestras obtenidas, se ha detectado que las aguas del río Cauca en el segmento evaluado presentan una correlación de los extractos de los metales pesados con el IM a lo largo de todo el cauce estudiado. La cantidad de muestras con caracter genotóxico puede parecer escasa, sin embargo, el hecho de conocer que el río Cauca lleva en sus aguas componentes metalicos genotóxicos es de vital importancia y proyección en biología, en la consideración del riesgo que puede suponer para el hombre y el medio ambiente, el uso adecuado de sus aguas (consumo, como agua potable, agricultura, pesca, recreo etc.), a corto y/o largo plazo en sus niveles de exposición continuos. Por otro lado, conocer las características genotóxicas metálicas del río permitira a las autoridades competentes ambientales y administrativas diseñar y mantener un control sobre sus aguas y los vertidos que a ellas se emiten, pudiendo tomar las decisiones necesarias y oportunas en cada momento, para impedir el daño o subsanarlo en caso de que éste se produzca.

El caracter genotóxico, la naturaleza y la estabilidad de los compuestos químicos metálicos responsables de este carácter, no es igual en todas las zonas del río, ni en todas las épocas del año. En general, las muestras genotóxicas detectadas en los meses de alta precipitación pluvial son más significativas que en los meses de poca precipitación pluvial. Estos datos parecen indicar que el aumento de genotóxicos en las aguas del río Cauca está ligado a esta condición pluvial. Su cuantía empieza a incrementarse en paralelo se alcanzan los valores máximos en los meses de abril, mayo y septiembre y de nuevo empiezan a disminuir en junio, agosto y enero. Esta referencia ambiental, está en concordancia con las datos obtenidos por otros investigadores (Singer y cols. 1981; Hoehn y cols. 1984; Veensta y Schnoor, 1980 y Wetzel, 1983).

Además, Singer y cols. (1981) apuntan que la elevación de los valores de contaminación en ésta época del año son debidos al aumento de la descomposición de la materia orgánica, ya que al aumentar la productividad biológica primaria (algas, macrofitos, bacterias), se incrementa el número de sustancias a reaccionar. En nuestro caso, a este hecho se suman la existencia de lluvia que se concentran en las muestras, y la recepción de vertimientos muy diversos, lo que aumenta considerablemente las reacciones químicas no deseables.

En cuanto al segmento del río estudiado, se observó la presencia de sustancias genotóxicas metálicas en todos los puntos de muestreo, si bien existen puntos donde se detectan un mayor número de muestras mensuales con carácter genotoxico, siendo algunas de gran potencia. Los puntos P1, P2 y P3 son los más contaminados seguido por el P5. El hecho de que P2 sea el más contaminado

concuenda con lo esperado dada su ubicación. En esta zona del río afluyen, uno de los mayores vertidos de la ciudad de Cali y su proximidad al antiguo basurero de Navarro. Por otra parte, la mayoría de estos vertidos (como los del resto del área de estudio) se liberan directamente al río, sin sufrir ningún tipo de tratamiento medianamente específico para la naturaleza de cada tipo de vertido. No hay una sola planta de tratamiento de aguas residuales industriales de origen farmacéutico, con vertidos de aguas residuales urbanas, o domésticas.

5.1 CONDICIONES EXPERIMENTALES DE FLUJO Y PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN.

Los resultados experimentales óptimos utilizados para el flujo con una matriz agua de río dopada y cantidad de resina en la especiación de los metales cromo, cadmio y plomo, son los reportados por Correa, (2009 2-2.5 ml/min y 400 mg de resina Amberlite XAD-16. Los porcentajes de recuperación para cada uno de los metales, se obtuvieron haciendo un enriquecimiento de la muestra con soluciones estándar. Previamente se hizo una cuantificación por triplicado de las muestras sin doparlas con el analito. Conociendo el valor promedio de analito aportado por la muestra, se realizó el enriquecimiento con el estándar a una concentración conocida y se hicieron las respectivas mediciones para evaluar si hay pérdidas representativas. Los valores encontrados para los porcentajes de recobro se observan en la Tabla 8.

Tabla 8. Valores en ensayos preliminares (volumen de 250 ml de agua dopada, 400 mg de Amberlite XAD-16, flujo de salida 2-2.5 ml/min).

Metal	Cantidad adicionada (ppm)	Conc. Adsorción-desorción	Conc. Efluente (ppm)	Total (ppm)	Porcentaje (%)
Cd	5.00×10^{-1}	2.88×10^{-3}	0.440	0.443	88.6
Pb	4.00	1.93×10^{-2}	3.75	3.76	94.1
Cr	2.00	1.13×10^{-2}	1.75	1.79	89.5

La activación de la resina, debe realizarse el mismo día en que se va a utilizar por la columna y con soluciones recién preparadas.

5.2 LÍMITES DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACIÓN.

Para la determinación del límite de detección (LD) y de cuantificación (LC) se determinaron 10 blancos, utilizando el blanco de agua desionizada acidulada al 0.1 % con ácido nítrico, y se analizó Pb y Cd y Cr, para Hg se adicionó 8 ml de HNO₃ concentrado, 5 ml de H₂O₂ se sometió a reflujo por 40 min, luego se aforó a 50 ml. Se procedió a realizar las respectivas lecturas en el equipo de absorción atómica y

finalmente aplicando las ecuaciones 1 y 2 para la obtención de los resultados. Los límites de cuantificación y detección para los metales estudiados están reportados en la tabla 9.

$$LD = \frac{3.3 * S}{m}$$

Ecuación 1. Límite de detección

$$LC = \frac{10 * S}{m}$$

Ecuación 2. Límite de cuantificación

Dónde:

LD: Límite de Detección

LC: Límite de Cuantificación

S: Desviación estándar de los blancos

M: Pendiente curva de calibración

5.3 CURVAS DE CALIBRACIÓN

Se tomaron 5 niveles para determinar la linealidad en la curva de calibración, el rango que se consideró para cada analito fue: Cd (0.5-2.0 ppb), Cr (1-10 ppb), Pb (2-20 ppb), Hg (4-20 ppb).

En la tabla 9 se presentan los coeficientes de correlación y la ecuación de la línea para cada metal. El desarrollo de los métodos analíticos empleados en las muestras analizadas presentan una buena sensibilidad, se eligieron las curvas que presentaban los mejores coeficientes de correlación y se tomó la pendiente como la sensibilidad para cada metal.

Para la linealidad se leyeron patrones a diferentes concentraciones con el fin de examinar la correlación entre ellos (coeficiente de correlación) y observar la linealidad que presentaban. Los límites de detección y cuantificación garantizan que el analito presente en las muestras fue cuantificado correctamente (ver Anexo1) con un coeficiente de variación (%CV) menor al 3% para todos los metales estudiados.

Tabla 9. Curvas de calibración, límite de detección y límite de cuantificación

Metal	Coef. Correlación R²	Ecuación Recta	LD (ppb)	LC (ppb)
Cadmio (Cd)	0,999	y = 0.1162x + 0.037	0,02	0,061
Cromo (Cr)	0,999	y = 0.1618x + 0.0165	0,04	0,12
Plomo (Pb)	0,999	y = 0.0143x + 0.0141	0,28	0,84
Mercurio (Hg)	0,996	y = 0.0048x - 0.0017	0,96	2,92

5.4 CONCENTRACIÓN DE LOS METALES PESADOS EN LAS MUESTRAS DEL RÍO CAUCA.

Las concentraciones encontradas de los metales totales cromo, cadmio, plomo y mercurio en los cinco puntos de muestreo del río Cauca en el municipio de Cali, durante las temporadas de alta y baja pluviosidad de los años 2008-2009 y 2013, se reportan en la Tabla 10 (ver Anexo 2).

Tabla 10. Concentración (ppb) de los metales Pb, Cr, Cd y Hg en los cinco puntos de muestreo en los años 2008, 2009 y 2013.

Año	Punto	Mes	Pb (ppb)	Cr (ppb)	Cd (ppb)	Hg (ppb)	Total (ppb)
2008	Hormiguero	Enero	0,16	0,18	0,45	6,51	7,30
2008	Hormiguero	Abril	32,05	9,33	0,06	29,6	71,04
2008	Canal Colector Sur	Enero	0,04	0,21	0,02	6,6	6,87
2008	Canal Colector Sur	Abril	37,67	12,43	0,07	7,91	58,08
2008	PTAP	Enero	0,01	0,17	0,03	6,01	6,22
2008	PTAP	Abril	47,68	5,91	0,01	25,28	78,88
2008	Juanchito	Enero	0,03	0,27	0,02	23,07	23,39
2008	Juanchito	Abril	3,76	7,76	0,01	5,74	17,27
2008	Delta río Cali	Enero	0,04	0,31	0,03	6,5	6,88
2008	Delta río Cali	Abril	27,65	36,58	0,01	3,57	67,81
2009	Hormiguero	Abril	0,91	4,75	0,09	17,5	23,25
2009	Hormiguero	Junio	1,2	5,81	0,11	0	7,12
2009	Canal Colector Sur	Abril	0,77	3,11	0,03	21,3	25,21
2009	Canal Colector Sur	Junio	0,95	4,03	0,09	0	5,07
2009	PTAP	Abril	0,38	3,26	0,06	19,41	23,11
2009	PTAP	Junio	0,6	4,27	0,08	0	4,95
2009	Juanchito	Abril	1,3	5,9	0,96	20,72	28,88
2009	Juanchito	Junio	1,59	6,16	1,08	0	8,83
2009	Delta río Cali	Abril	0,29	3,8	0,06	16,81	20,96
2009	Delta río Cali	Junio	0,28	3,91	0,05	0	4,24
2013	Hormiguero	Mayo	72,71	65,29	59,94	7,18	205,12
2013	Hormiguero	Agosto	27,93	17,04	19,24	7,19	71,40
2013	Hormiguero	Septiembre	66,86	17,98	41,82	3	129,66
2013	Canal Colector Sur	Mayo	23,74	62,84	84,66	11,52	182,76
2013	Canal Colector Sur	Agosto	48,61	20,97	24,66	23,47	117,71
2013	Canal Colector Sur	Septiembre	73,15	25,59	25,95	5,71	130,40
2013	PTAP	Mayo	39,79	43,27	84,47	5,9	173,43
2013	PTAP	Agosto	14,13	25,62	24,45	9,72	73,92
2013	PTAP	Septiembre	61,94	20,9	32,32	4,34	119,50
2013	Juanchito	Mayo	60,11	43,27	95,98	8,12	207,48
2013	Juanchito	Agosto	22,9	22,84	35,36	8,27	89,37
2013	Juanchito	Septiembre	42,96	14,9	40,71	7,1	105,67
2013	Delta río Cali	Mayo	42,26	51,81	75,18	8,54	177,79
2013	Delta río Cali	Agosto	24,98	23,99	25,18	6,84	80,99
2013	Delta río Cali	Septiembre	87,44	26,47	38,57	6,62	159,10
Limite de detección EPA			15	100	5	2	

Al revisar las concentraciones de los metales (Tabla 10) y sus límites permisibles por la EPA, podemos observar que los metales Cd, Pb, Cr y Hg no superan los valores permitidos, se mantuvieron por debajo de los 100 ppb permitidos.

Para el caso del Pb se evidencia una alta concentración en el mes de abril del 2008 y en todos los análisis para los metales pesados de los muestreos del 2013. Cabe destacar, las preocupantes concentraciones del mercurio muy superiores a los valores permitidos de 2 ppb de acuerdo a las normas técnicas para la calidad del agua, decreto 475 de 1998 artículo 37 (Criterios de calidad del agua segura) en los cinco puntos de muestreo en los tres años en que se realizó el estudio, ya que éste es el metal pesado con la más potente toxicidad y presenta a su vez, una concentración mínima inhibitoria de 0.01 mM (Nies, 1999).

5.5 ACTIVIDAD MUTAGÉNICA EN AGUAS DEL RÍO CAUCA APLICANDO EL TEST DE AMES CON LAS CEPAS TA98 Y TA100 DE *S. TYPHIMURIUM* CON Y SIN ACTIVADOR MUTAGENICO S-9

Al realizar el proceso de dilución, según como lo especifica el test de Ames, las concentraciones finales con las cuales se trabajaron para el ensayo fueron de 0.2, 0.8, 2.5 y 8 µg/L, debido a que en estas concentraciones se presentaba un crecimiento adecuado de colonias revertantes en los ensayos experimentales preliminares. Posteriormente se realizó el cálculo de µg de extracto en cada uno de los platos utilizados, teniendo en cuenta la cantidad que es agregada a cada caja durante los ensayos que fue de 50 µL de extracto. Los IM se reportan en las Tablas 11 y 12.

Tabla 11. Índice de mutagenicidad con la cepa TA98 con y sin S9 según el año y punto de muestreo.

Año	Punto	Sitio	Mes	TA98-IM-SIN S-9	TA98IM-CON S-9
2008	P1	Hormiguero	Enero	1	0
2008	P1	Hormiguero	Abril	0,7	0
2008	P2	Canal Colector Sur	Enero	0,6	1,1
2008	P2	Canal Colector Sur	Abril	1,6	2,5
2008	P3	PTAP	Enero	0,7	0
2008	P3	PTAP	Abril	0,7	0
2008	P4	Juanchito	Enero	0,8	0,7
2008	P4	Juanchito	Abril	0,8	2,2
2008	P5	Delta río Cali	Enero	1,2	0,6
2008	P5	Delta río Cali	Abril	0,9	0,5
2009	P1	Hormiguero	Abril	0,7	0,8
2009	P1	Hormiguero	Junio	0,6	0
2009	P2	Canal Colector Sur	Abril	3,2	2,8
2009	P2	Canal Colector Sur	Junio	3,7	7,1
2009	P3	PTAP	Abril	0,7	0
2009	P3	PTAP	Junio	1,2	0
2009	P4	Juanchito	Abril	0,8	0,8
2009	P4	Juanchito	Junio	0,8	0,6
2009	P5	Delta río Cali	Abril	0,7	0,9
2009	P5	Delta río Cali	Junio	1,3	2,6
2013	P1	Hormiguero	Mayo	3,59	1,79
2013	P1	Hormiguero	Agosto	0,99	1,71
2013	P1	Hormiguero	Septiembre	1,31	1,12
2013	P2	Canal Colector Sur	Mayo	2,91	1,63
2013	P2	Canal Colector Sur	Agosto	1,13	1,23
2013	P2	Canal Colector Sur	Septiembre	1,24	1,21
2013	P3	PTAP	Mayo	1,83	1,83
2013	P3	PTAP	Agosto	0,92	1,37
2013	P3	PTAP	Septiembre	1,24	1,39
2013	P4	Juanchito	Mayo	1,74	1,56
2013	P4	Juanchito	Agosto	1,36	1,44
2013	P4	Juanchito	Septiembre	1,45	1,07
2013	P5	Delta río Cali	Mayo	3,59	1,57
2013	P5	Delta río Cali	Agosto	1,13	1,23
2013	P5	Delta río Cali	Septiembre	1,45	1,07

Tabla 12. Índice de mutagenicidad con la cepa TA100 con y S9 según el año y punto de muestreo.

Año	Punto	Sitio	Mes	TA100-IM sin S9	TA100 IM con S9
2008	P1	Hormiguero	Enero	1,1	0
2008	P1	Hormiguero	Abril	0,8	0
2008	P2	Canal Colector Sur	Enero	1,7	1
2008	P2	Canal Colector Sur	Abril	2	1,4
2008	P3	PTAP	Enero	1,3	0
2008	P3	PTAP	Abril	1,3	0
2008	P4	Juanchito	Enero	1,1	1,3
2008	P4	Juanchito	Abril	1,2	1,5
2008	P5	Delta río Cali	Enero	0,6	1
2008	P5	Delta río Cali	Abril	0,6	0,5
2009	P1	Hormiguero	Abril	1,1	1,3
2009	P1	Hormiguero	Junio	0,8	0
2009	P2	Canal Colector Sur	Abril	1,3	1,8
2009	P2	Canal Colector Sur	Junio	0	1,2
2009	P3	PTAP	Abril	1,2	0
2009	P3	PTAP	Junio	1,7	0
2009	P4	Juanchito	Abril	0,9	1,3
2009	P4	Juanchito	Junio	1,1	0,7
2009	P5	Delta río Cali	Abril	0,8	1,2
2009	P5	Delta río Cali	Junio	0,6	1
2013	P1	Hormiguero	Mayo	1,02	1,45
2013	P1	Hormiguero	Agosto	0,85	1,16
2013	P1	Hormiguero	Septiembre	1,24	1,33
2013	P2	Canal Colector Sur	Mayo	1,04	1,09
2013	P2	Canal Colector Sur	Agosto	1,29	0,67
2013	P2	Canal Colector Sur	Septiembre	1,36	1,26
2013	P3	PTAP	Mayo	1,42	0,95
2013	P3	PTAP	Agosto	0,76	1,13
2013	P3	PTAP	Septiembre	1,33	1,29
2013	P4	Juanchito	Mayo	1,39	1,1
2013	P4	Juanchito	Agosto	0,67	1,38
2013	P4	Juanchito	Septiembre	1,67	1,34
2013	P5	Delta río Cali	Mayo	1,06	1,31
2013	P5	Delta río Cali	Agosto	1,33	0,79
2013	P5	Delta río Cali	Septiembre	1,67	1,34

5.5.1 Análisis del comportamiento del índice de mutagenicidad (IM) con respecto al año de muestreo.

Las Figuras 11, 12, 13 representan los índices de mutagenicidad con las cepas TA98 y TA 100 con y sin activación enzimática de las muestras de agua superficial del río Cauca con respecto a cada punto de muestreo para las anualidades de 2008, 2009 y 2013 con sus fechas respectivamente.

En los muestreos del año 2008 se encontraron dos puntos que presentaron actividad mutagénica ($IM > 2$) que fueron el canal colector del sur con $IM = 2.5$ y el puente de Juanchito con $IM = 2.2$ ambos con la cepa TA98 con activador enzimático S9 durante el mes de abril. La cepa TA100 sin activador enzimático mostró leve mutagenicidad en los puntos P1, P2, P3 y P4, tanto en los meses de enero y abril y con activador enzimático en el P4 en el mes de abril, al ser evaluada la cepa TA98 sin activador mostró una actividad mutagénica leve (Figura 11).

En los muestreos del año 2009 de época donde presento una alta precipitación pluvial, se encontró que el punto que presenta una actividad mutagénica ($IM > 2$) fue el canal colector del sur con $IM = 7.1$ y el delta del río Cali con un $IM = 2.8$, ambos con la cepa TA98 con activador enzimático S9 durante los meses de junio y abril. La cepa TA100 sin activador enzimático mostró leve mutagenicidad en los puntos P1, P2, P3 y P4, tanto en los meses de enero y abril y con activador enzimático en el P4 en el mes de abril, al ser evaluada la cepa TA98 sin activador mostró una actividad mutagénica leve (Figura 12). También se evidenció actividad mutagénica en la desembocadura del río Cali (P5) en el mes de junio ($IM = 2.6$) con la cepa TA98 con activador enzimático.

De igual manera se observa que para este año 2009 las concentraciones de los metales pesados bajaron considerablemente, siendo el mes de abril el de más alta concentración (Figura 15). Durante este año 2009 el test de Ames mostró mutagenicidad en el punto del Canal Colector Sur (P2) en los meses de abril y junio (figura 12).

De esta forma con la cepa TA98 sin activador enzimático se evidenció un índice de mutagenicidad de 3.2 y 3.7 para los meses de abril y junio respectivamente mientras que la cepa TA98 con activador enzimático mostró un índice de mutagenicidad de 2.8 y 7.1 para los meses de abril y junio respectivamente.

Para el resto de los muestreos correspondientes al año 2009, en términos generales, se observa un índice de mutagenicidad muy bajo que se puede considerar como no mutagénico. En este año durante el mes de junio se presenta un valor en el índice de mutagenicidad bastante atípico ya que es el más elevado ($IM = 7.1$) para todas las lecturas realizadas en esta investigación y al ser comparado con la concentración total de metales pesados en este mismo mes no se puede observar una correlación entre estas dos variables ya que la concentración fue muy

baja (5.0 ppb) comparado con su índice alto de mutagenicidad. Esto puede ser debido a la presencia de otros tipos de sustancias posiblemente de carácter orgánico producto de los lixiviados del botadero de basuras de Navarro y/o de los residuos que llegan a este punto, el Canal Colector del Sur proveniente de toda la población de esta ciudad.

Para el año 2013, se observa que las concentraciones de metales pesados fueron mucho más elevadas que en años anteriores, teniendo los meses de mayo como los de más alta concentración (Figura 16). Este año se presentaron tres puntos con mutagenicidad positiva que fueron Puente El Hormiguero (IM=3.5), Canal Colector del Sur (IM=2.9) y la desembocadura del río Cali (IM=3.5), todos con la cepa TA98 sin activador enzimático e igualmente en el mes de mayo, también se puede observar que aunque en los otros meses y en el resto de los puntos de muestreos no hay actividad mutagénica positiva (IM>2.0) si se evidencia una actividad mutagénica leve. (IM entre 1 y 2) a diferencia de los años anteriores que la tendencia era a no presentar mutagenicidad.

Al observar con detenimiento los resultados de la cepa TA98 con y sin activador enzimático éstas presentan actividad mutagénica que a diferencia de la cepa TA100 no mostró mutagenicidad (ver Tabla 12). Estos resultados que evidencian las más altas concentraciones totales de metales pesados en este estudio desencadenaron mutaciones de cambio de lectura, un hecho que concuerda con la mayoría de los estudios de aguas superficiales alrededor del mundo, en los cuales hay una predominancia de mutágenos de cambio de lectura (detectados por la TA98), en lugar de mutágenos de sustitución de pares de bases detectados por la TA100. (Mortelmans & Zeiger, 2000).

Las figuras 14, 15 y 16 representan las concentraciones totales (ppb) de los metales pesados: Cd, Cr, Pb y Hg con respecto al punto de muestreo para las anualidades de 2008, 2009 y 2013 con sus fechas respectivamente donde la concentración total de los metales pesados en los diferentes sitios son muy similares; sin embargo; el punto denominado Junachito (P4) es donde se encuentra la menor concentración total de metales (el valor de la mediana está por debajo de los demás sitios de muestreo). Y la figura 17 representa a la concentración total de metales en los diferentes puntos de muestreo durante los años estudiados encontrándose que Juanchito (P4) presenta la menos concentración de metales totales (El valor de la media está por debajo de los demás sitios de muestreo)

Figura 11. Mutagenicidad año 2008 vs Sitio de muestreo

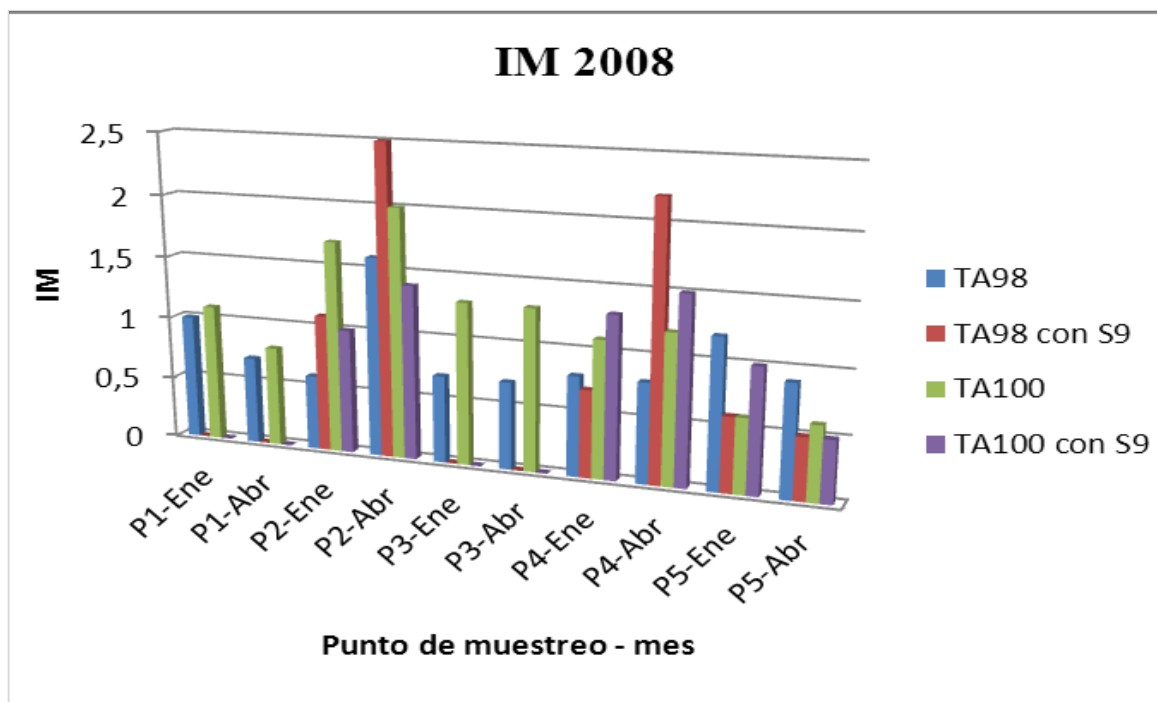


Figura 12. Mutagenicidad año 2009 vs Sitio de muestreo

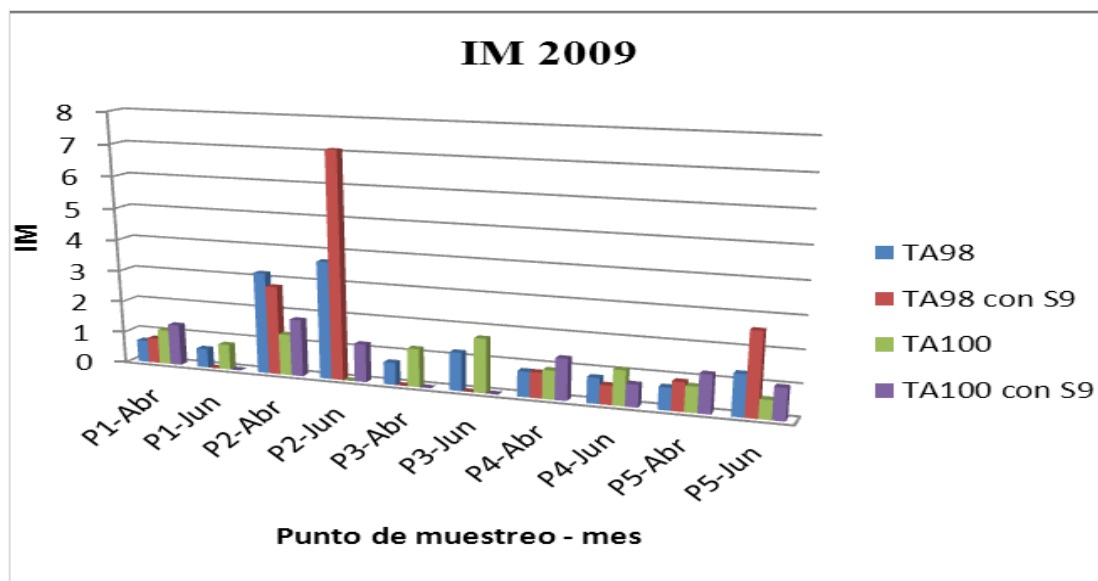


Figura 13. Mutagenicidad año 2009 vs Punto de muestreo

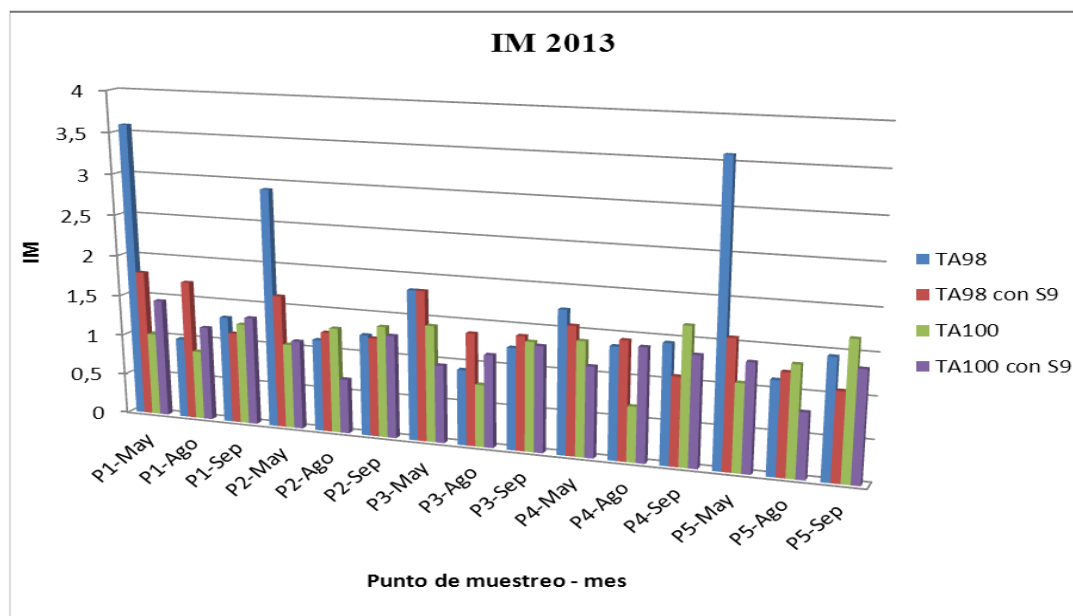


Figura 14. Concentración de metales totales del año 2008 vs Punto de muestreo

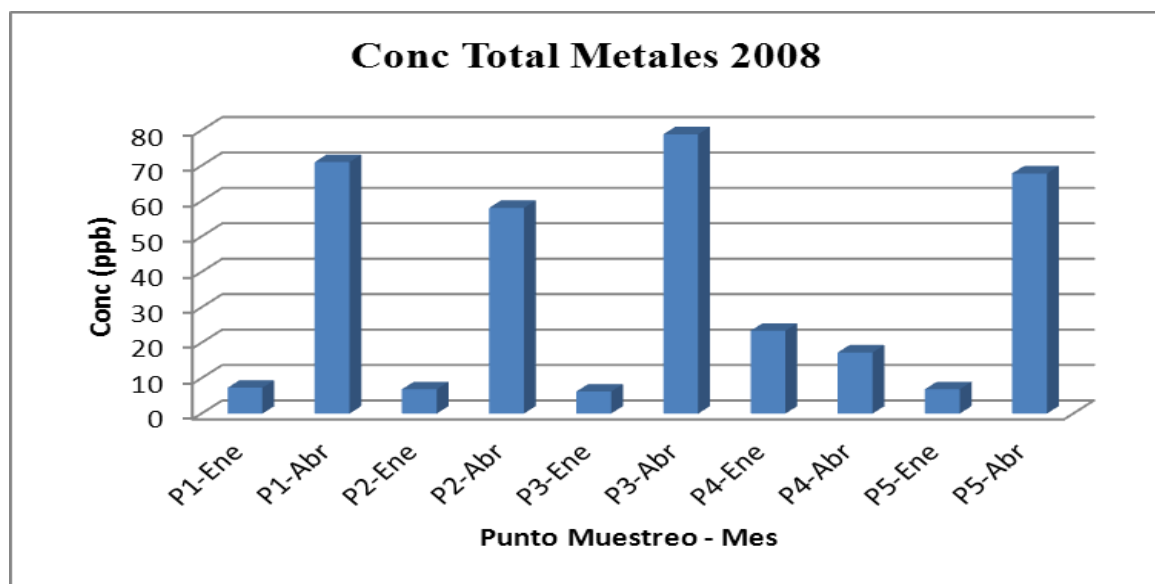


Figura 15. Concentración de metales totales del año 2009 vs Punto de muestreo

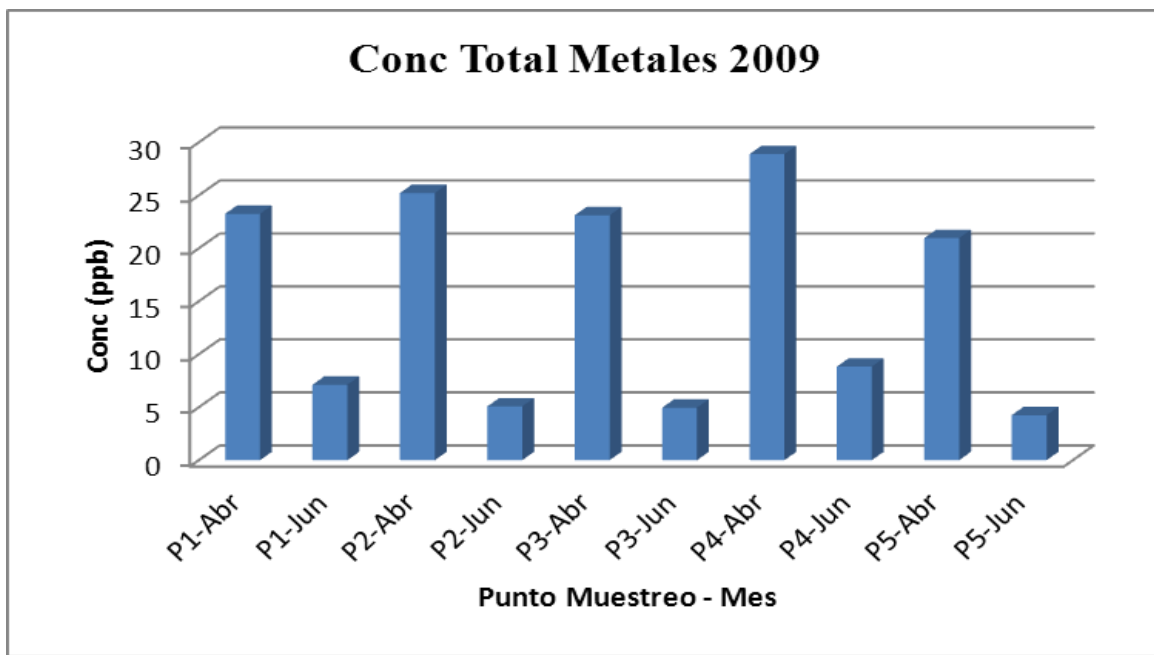


Figura 14. Concentración de Metales totales del año 2013 vs Punto de muestreo

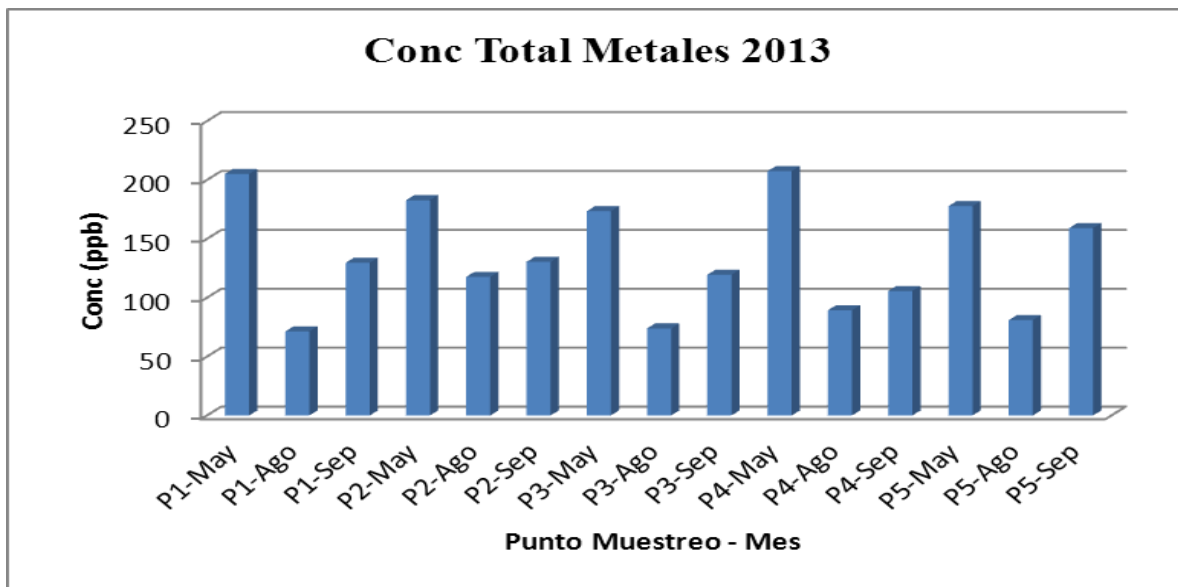
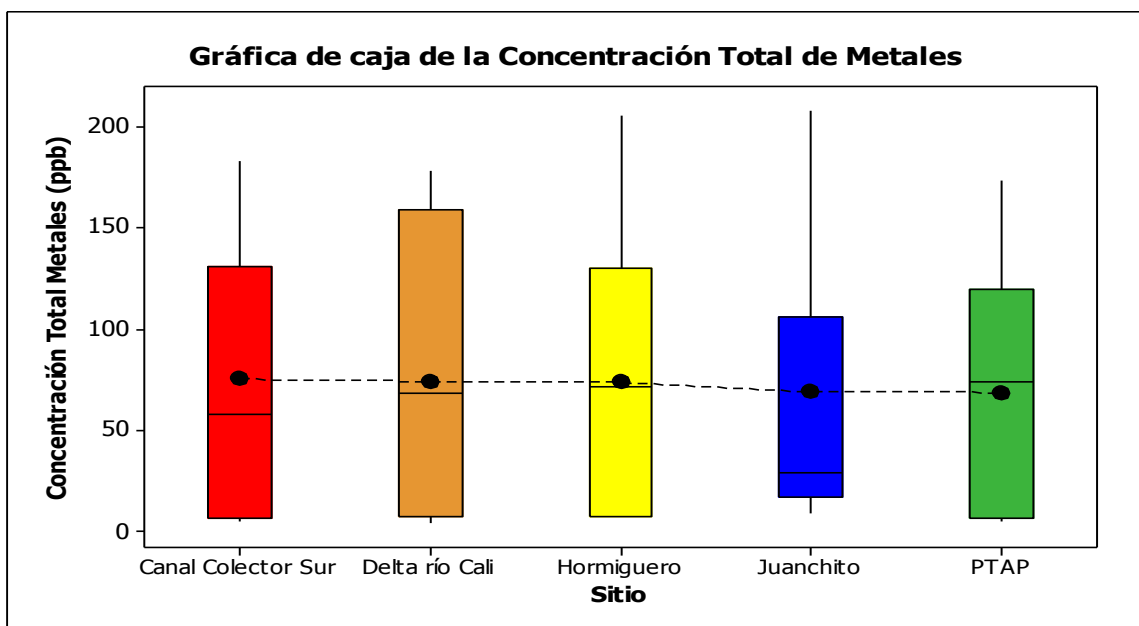


Figura 17. Gráfica de caja de la concentración total de metales y su comportamiento en los puntos de muestreo.



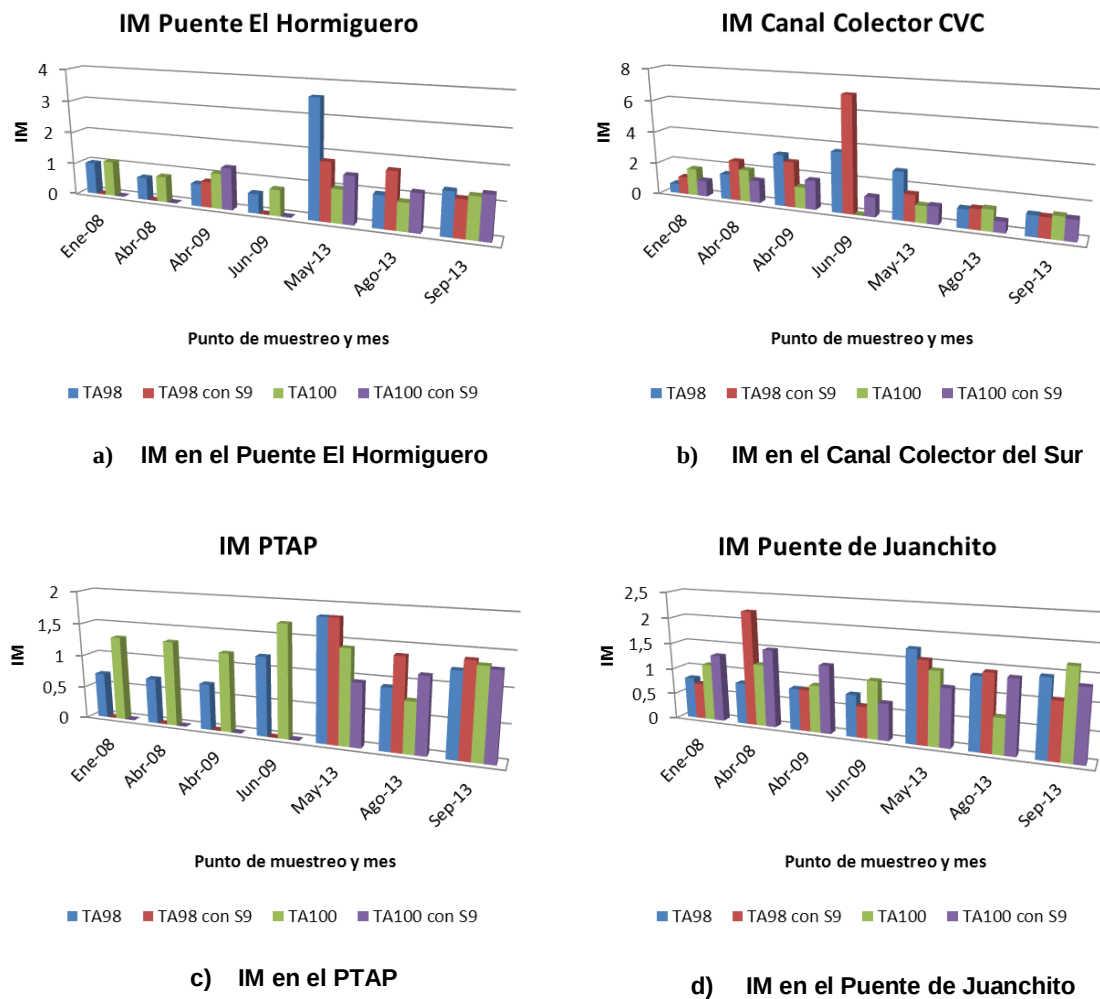
5.5.2 Comportamiento de la mutagenicidad por punto de muestreo. La Figura 18 corresponde a la mutagenicidad en los puntos de muestreo, en donde se puede observar que el Canal Colector Sur fue el único punto que presentó actividad mutagénica durante los tres años que duró esta investigación; esto se podría deber principalmente a que en sus cercanías se encuentra ubicado el relleno sanitario de Navarro, y hasta la fecha sigue vertiendo sus lixiviados a las aguas del río Cauca. Estos desechos contienen mezclas complejas de materia orgánica y productos químicos inorgánicos como metales pesados (Watanabe, 2001), que pueden contaminar considerablemente las aguas subterráneas y superficiales (Dewhurst, y otros, 2002).

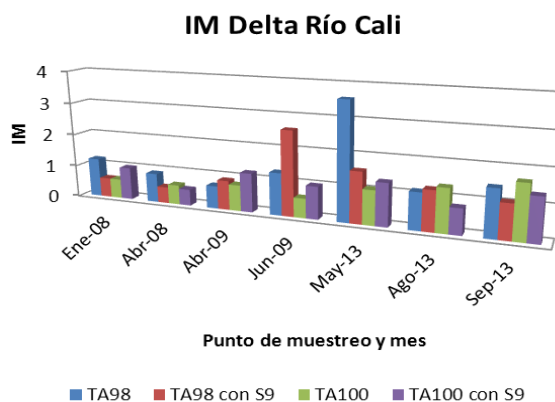
Además del Canal Colector Sur se presentó mutagenicidad en el puente de El Hormiguero, el puente de Juanchito y la desembocadura del río Calib ya que es una zona industrializada donde muchas de estas empresas descargan sus residuos directamente al río Cauca, sin ningún tipo de tratamiento previo, contribuyendo de esta manera a la cantidad de metales pesados y demás contaminantes.

La desembocadura del río Cali presenta en los meses junio del 2009 y mayo del 2013 índices de mutagenicidad de 2.6 y 3.59 respectivamente. Este río atraviesa de occidente a oriente toda la ciudad de Cali trayendo consigo gran cantidad de desechos arrojados por parte de la población y en algunos casos basuras industriales del centro de la ciudad.

El puente de El Hormiguero en el mes de mayo del 2013 con un índice de mutagenicidad de 2.91. Este es caso que se podría decir que es atípico ya que es el primer estudio en el que este punto arroja resultados positivos, de alguna manera sugiere una acentuación de la contaminación hídrica en uno de los puntos más externos al recorrido de descargas residuales urbanas en los últimos años.

Figura 18. Índice de mutagenicidad en los diferentes sitios de muestreo





e) IM en el Delta del río Cali

5.5.3 Comportamiento de la mutagenicidad con respecto al mes de muestreo.

La figura 18 registra, los comportamientos del índice de mutagenicidad con respecto al mes en que se hicieron los muestreos: enero, abril, mayo, junio, agosto y septiembre respectivamente. Observándose que en los meses de abril y mayo se presentaron la mayor cantidad de puntos que registraron mutagenicidad a la vez su mutagenicidad leve a moderada, una posible explicación a este evento es que en estos meses presentaron las más altas concentraciones totales de metales pesados como lo indica la tabla 11, y las figuras 14, 15 y 16 que podría encontrarse en el nivel de agua del río, debido a las continuas y abundantes precipitaciones que aumentaron considerablemente el nivel de agua del río.

5.6 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Análisis espacio-temporal del IM se realizaron teniendo en cuenta los siguientes factores: Época de muestreos por año, sitio de muestreo, las cepas (TA98-TA100) y el tratamiento de activación metabólica (con y sin activador metabólico).

La comparación de las medidas de los diferentes tratamientos y de la significancia estadística (de segundo y de tercer orden), fueron realizadas con un análisis de varianza multifactorial del IM con el programa estadístico Minitab 16 y con el coeficiente de correlación de Pearson.

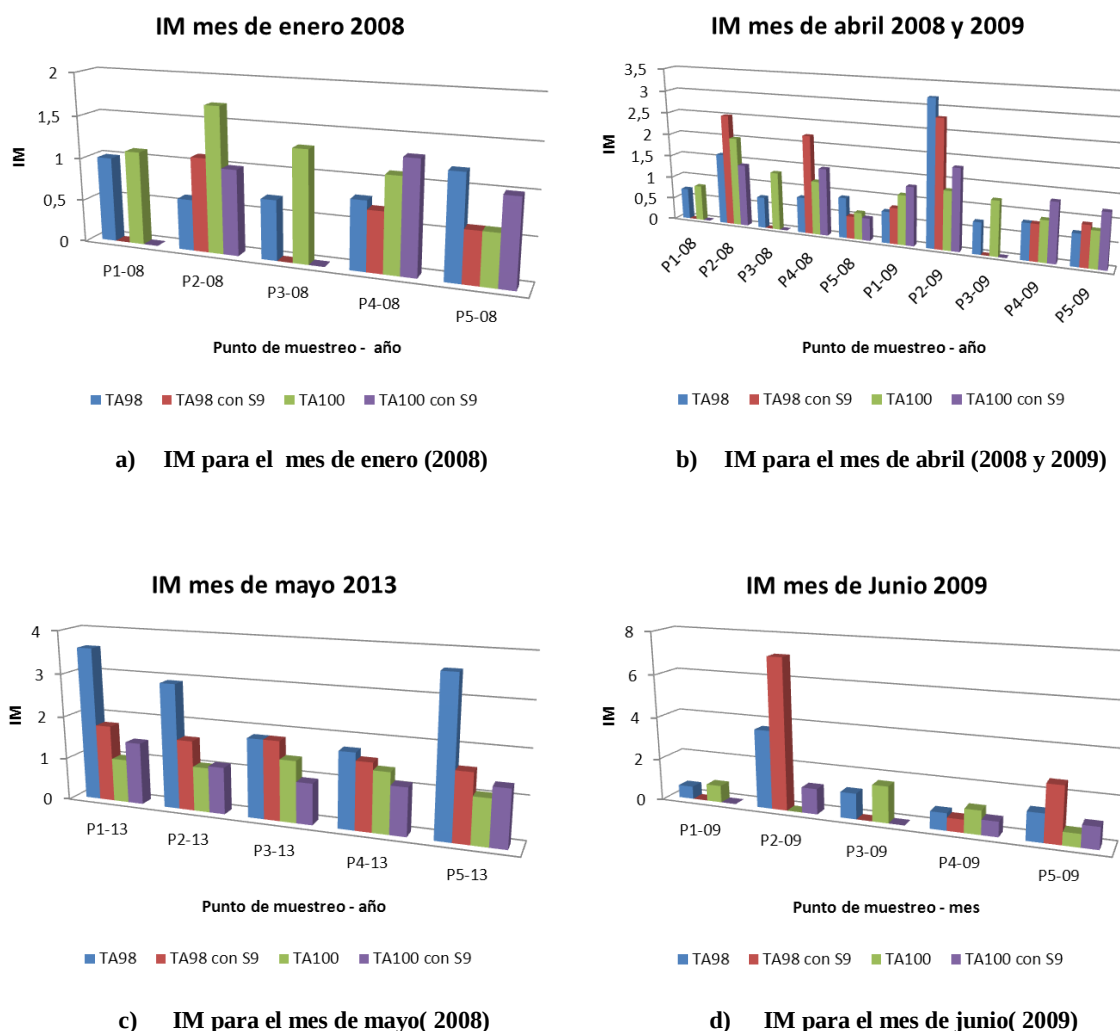
En la Figura 19 (grafico de dispersión del IM con las concentraciones totales de los metales), se registran los diagramas de dispersión de los índices de mutagenicidad y la concentración total de los metales pesados, en las cepas utilizadas en esta investigación: cepa TA98 sin S9, TA98 con S9, TA100 sin S9 y TA100 con S9 en el que se demuestra que existe alguna asociación entre el Índice de Mutagenicidad producido por la cepa TA 98 sin extracto enzimático S9. Y al realizar los diferentes modelos estadísticos de regresión, modelo lineal (figura 19), modelo cuadrático

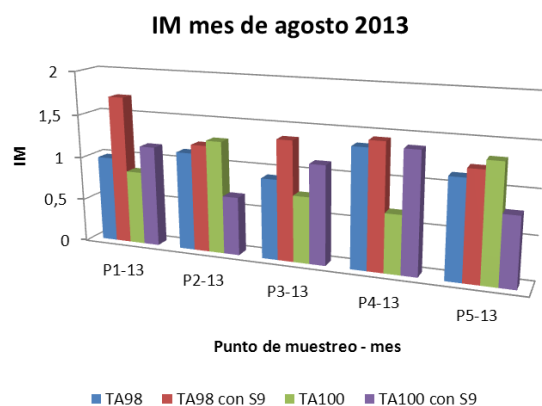
(figura 20), y modelo cubico (figura 21) , siendo este ultimo modelo el que más se ajusta a las relaciones entre el IM y la concentración total de los metales.

El tratamiento estadístico de los datos con las graficas de cajas con el IM con las cepas TA98 con y sin activación metabólica de S9, y las cepas TA100 con y sin activación metabólica de S9 (figuras 22,23,24 y 25) muestran que para todos los índices de mutagenicidad los valores se encuentran presentes en el canal colector Sur.

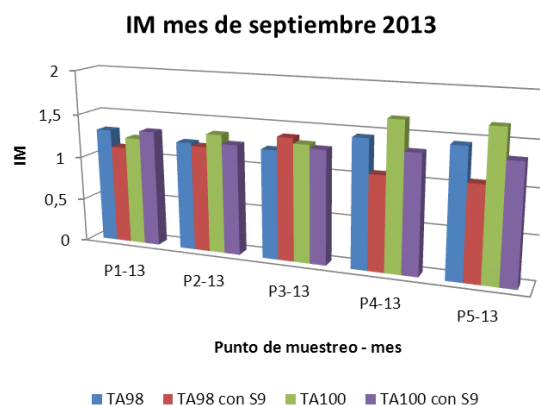
Quedaría por realizar unos modelos estadísticos que incluyan otras variables fisicoquímicas que están presentes en las aguas de un río (DBO, DQO, pH, temperatura, entre otras), al igual que de un mayor número de datos para proyectar un modelo con mayor poder de predicción del índice de mutagenicidad.

Figura 15. Relación IM y el mes de muestreo





e) IM para el mes de agosto (2013)



f) IM para el mes de septiembre (2013)

Figura 16. Grafico de dispersión del IM con las concentraciones totales de los metales.

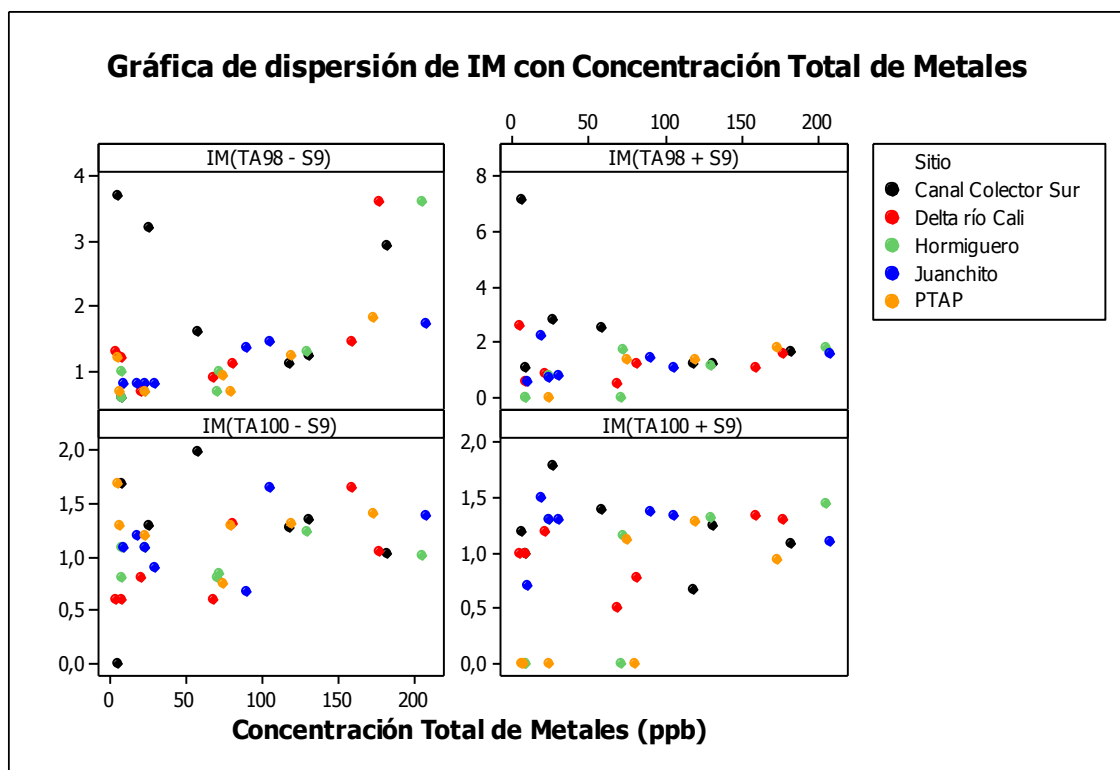


Tabla 13. Correlación de IM con Concentración Totales de Metales (ppb)

Índice de Mutagenicidad	Coefficiente de Correlación (r)
TA98-IM-SIN S-9	0,471
TA98IM-CON S-9	-0,004
TA100-IM sin S9	0,247
TA100 IM con S9	0,319

r=Coeficiente de correlación lineal de Pearson

La anterior tabla indica que existen relaciones lineales débiles entre la concentración total de metales y los índices de mutagenicidad. Es decir, que a medida la concentración de metales aumenta los índices de mutagenicidad

aumentan débilmente, con la excepción del IM TA98 + S9 donde no se encontró relación alguna con la concentración de metales.

Figura 20. Regresión cuadrática entre el IM de la cepa TA98 y concentración Total de metales pesados

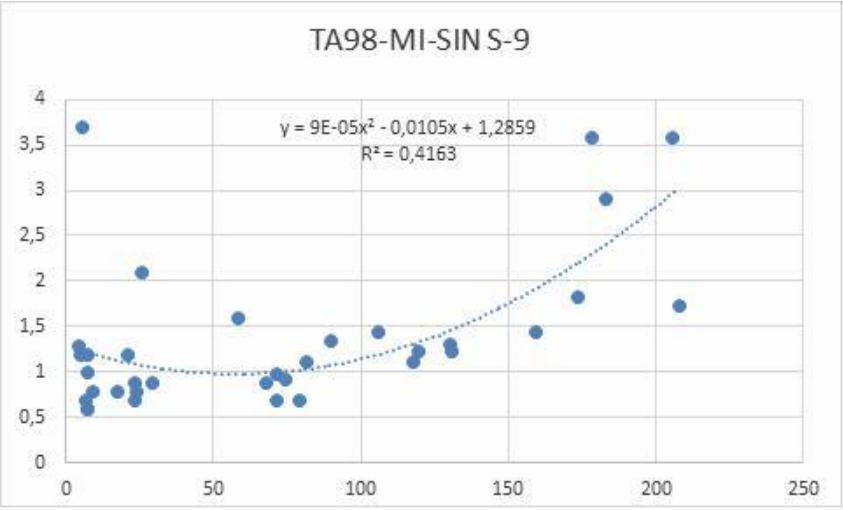


Figura 21. Regresión cubica entre el IM de la cepa TA98 y concentración Total de metales pesados.

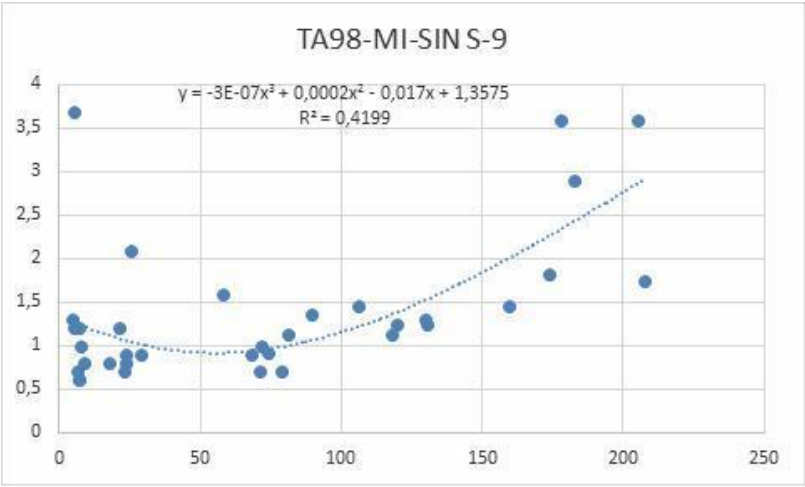


Figura 22. Grafica de cajas IM (TA98 sin S9) por punto de muestreo

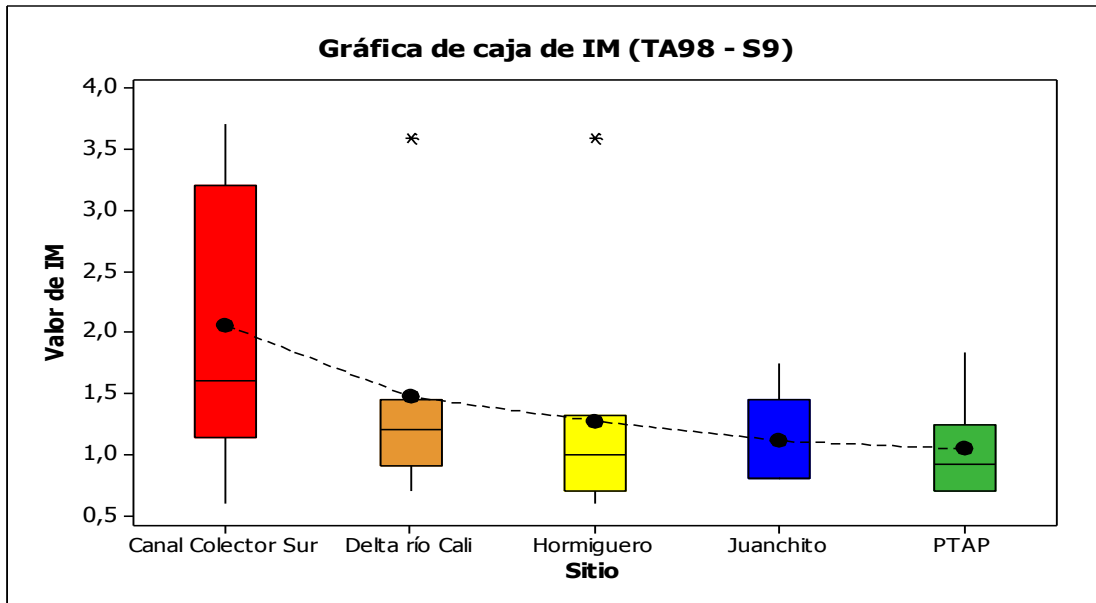


Figura 23. Grafica de cajas IM (TA98 con S9) por punto de muestreo

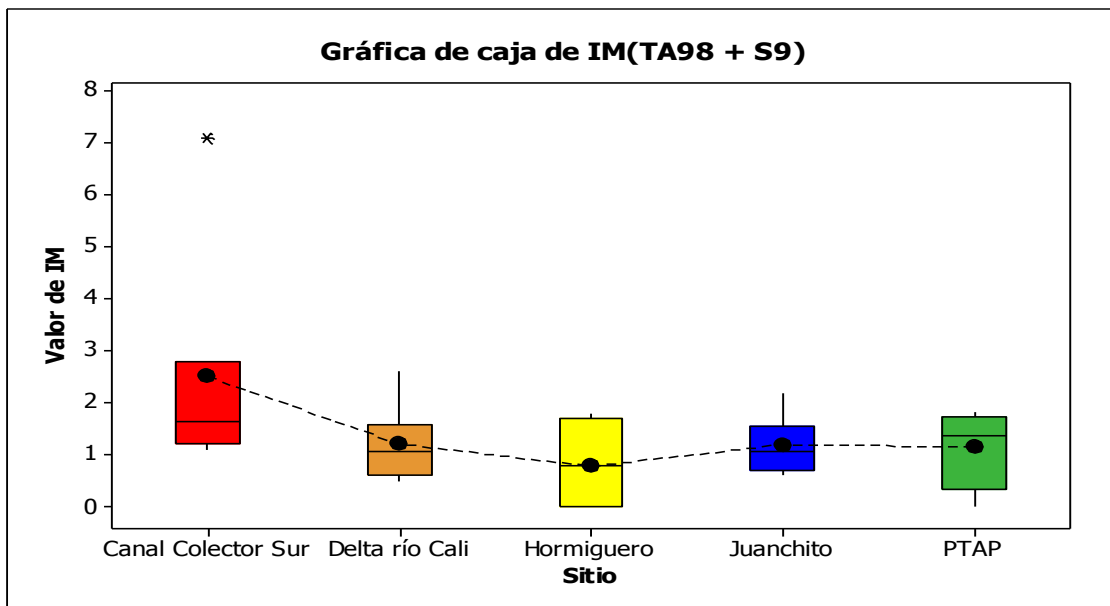


Figura 24. Grafica de cajas IM (TA100 con y sin S9) por punto de muestreo

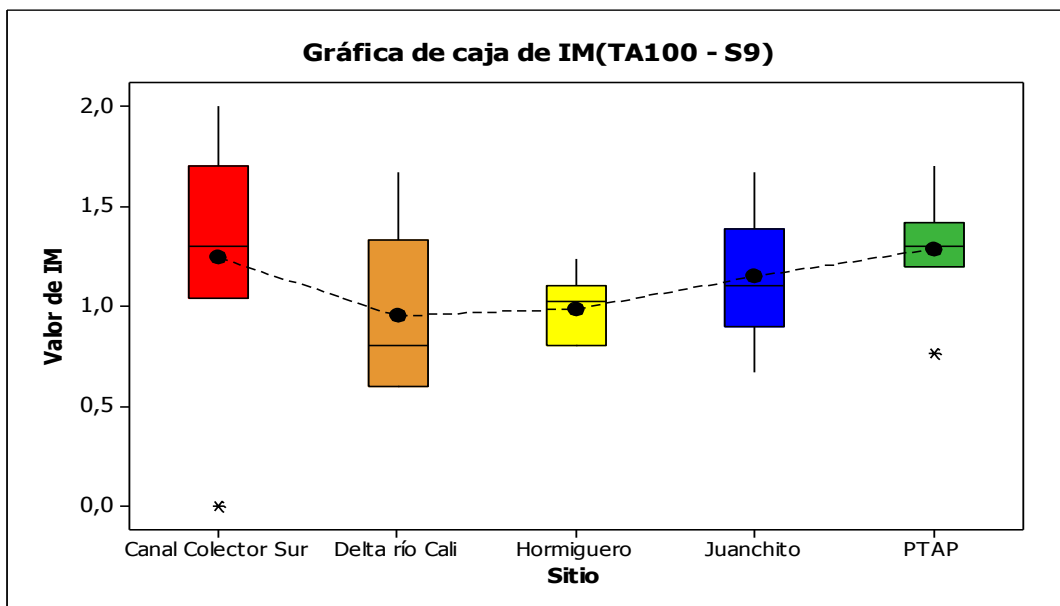
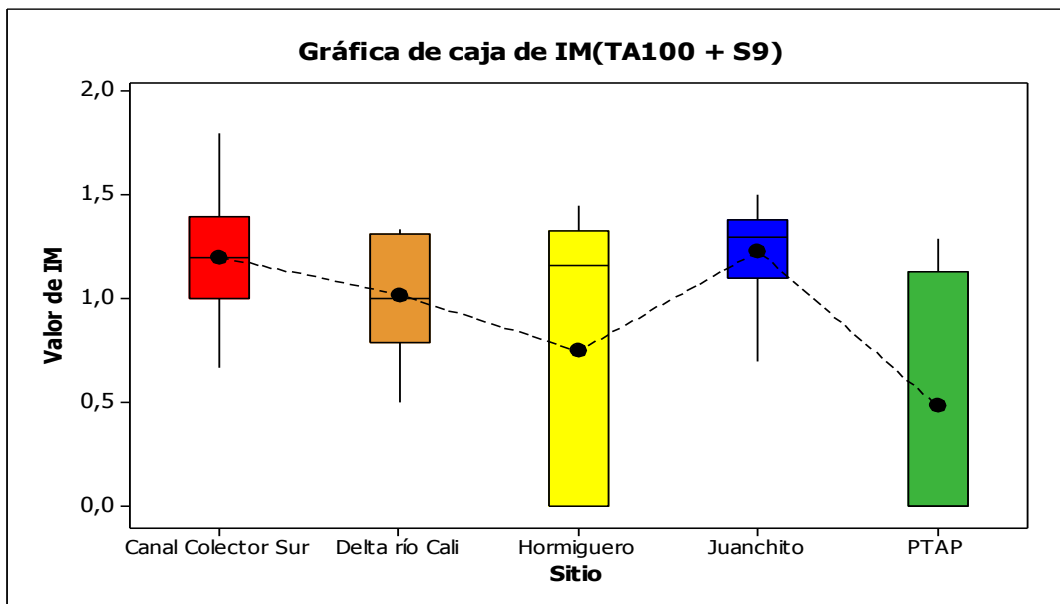


Figura 25. Grafica de cajas IM (TA100 con S9) por punto de muestreo



7. CONCLUSIONES

Del análisis y discusión de los resultados de los ensayos llevados a cabo en este trabajo se extraen las siguientes conclusiones:

1-La conclusión de mayor relevancia en esta investigación, es que en las aguas del río Cauca entre el segmento comprendido del Puente de El Hormiguero a la desembocadura del río Cali, hay un gradiente entre las concentraciones de metales pesados que pueden estar influyendo sobre los índices de mutagenicidad obtenidos con el test de Ames en las temporadas de alta precipitación pluvial.

2-Las mayores concentraciones encontradas de metales pesados, fueron respectivamente $Pb > Cr > Cd > Hg$, presentes en la especiación de: Sólidos suspendidos > sustancias húmicas > iones metálicos libres, encontrando una relación directa con las épocas de precipitación de pluviosidad.

3-La actividad mutagénica, mostrada al ser evaluada el agua del río Cauca con la cepa TA98 con activador enzimático S9 indica mutaciones en cambio de lectura, hecho que concuerda con la mayoría de los estudios en aguas superficiales. Estas cepas son las más sensibles para detectar genotoxicidad en este segmento del río evaluado. Para el caso de la cepa TA100 también con activador enzimático S9 detectan mutágenos inductores de sustituciones de pares de bases, pero no es lo suficientemente sensible para el seguimiento de genotoxicidad de las aguas del Cauca ya que con ella tan solo se detectó IM considerados como leves.

4-El sitio de muestreo que presentó el mayor índice de mutagenicidad fue el Canal Colector Sur con las dos cepas, lo cual evidencia el fenómeno de contaminación que se presenta en esta zona, ya que en este punto convergen el que fue el relleno sanitario de la ciudad de Cali y algunos municipios aledaños, además de que el canal colector Sur es donde se descargan todo tipo residuos y desechos líquidos de esta ciudad. Generando la hipótesis muy probable que los lixiviados del relleno sanitario de Navarro y las aguas negras municipales sean genotóxicas.

BIBLIOGRAFÍA

ALBADALEJO, R. Evaluación de la mutagenicidad inducida por concentrados orgánicos derivados de aguas de consumo público por medio del test de Ames. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Medicina. Medicina Preventiva y Salud Pública. (1993).

_____, et al. Evaluación de la actividad mutagénica de aguas de consumo público por medio del test de Ames. Revista Española de Salud Pública, 69, 393-408. (1995).

ALCALDÍA DE SANTIAGO DE CALI. DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO DE PLANEACIÓN. Cali, Datos y Cifras 1998. Cali: Rodrigo Ordóñez Editores. (1998).

AMES B.; N., McCann y J. & Yamasaki, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutation Research, 347-364. (1975).

_____. B. A combined bacterial and liver test system for detecting and classification of carcinogens as mutagens. Genetics, 78(1), 91-95. (1974).

ARTUNDUAGA, y P. Evaluación de riesgo en madres lactantes y determinación de HJg, Pb, Cd en peces del río Cauca en la zona comprendida entre el corregimiento de El Hormiguero y la vereda el Paso de la Torre en el municipio de Yumbo. Trabajo de Grado, Universidad del Valle, Facultad de Ciencias. Departamento de Química, Cali. (2013).

BARBA HO, L. E. II Simposio Internacional y III Nacional. "Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y Salud Humana". Contaminación del río Cauca por residuos de pesticidas (págs. 54-65). Palmira: Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. (1994).

CAI, S., Yue y T., & Nordberg, G. Renal dysfunction from cadmium contamination of irrigation water: dose-response analysis in a Chinese population. Bulletin of the World Health Organization, 76(2), 153-9. (1998).

CAMEAN, A. Toxicología Avanzada. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos S.A. (1995).

CHEH, A., Skochdopole y J., Koski, P., & Cole, L. Nonvolatile mutagens in drinking water: production by chlorination and destruction by sulfite. Science, 207, 90. (1980).

CHISTIAKOV, V. A., & Kornilov, V. N. Mutagenicity background monitoring of the River Don delta water. Genetika, 749-52. (1991).

CHUNG, K., Chen, I., & Claxton, L. D. Review of the Salmonella typhimurium mutagenicity of benzidine, benzidine analogues, and benzidine-based dyes. Mutation Research, 410, 237. (2006).

CONTRALORÍA DEPARTAMENTAL DEL VALLE DEL CAUCA. Informe del Estado de los Recursos Naturales y el Ambiente en el Departamento del Valle del Cauca., Tomo I, págs. 160-181. Cali. (1995).

CORPORATION S. ANALYTICAL & DIVISION M. I. Manual de Instrucciones Espectrofotómetro de absorción atómica de Shimadzu AA-6300. (2006).

CORREA, W., Soto, A., & Larmat, F. Cuantificación de mercurio por espectrometría de absorción atómica en aguas del río Cauca en la zona urbana de Cali. Tesis de Grado, Universidad del Valle, Facultad de Ciencias. Departamento de Química, Cali. (2009).

COSS, A., Cantor, K. C., Reif, J. S., Lynch, C. F., & Ward, M. H. Pancreatic cancer and drinking water and dietary sources of nitrate and nitrite. American Journal of Epidemiology, 159(7), 693. (2004).

DAVINSON, J. N. Davidson's The biochemistry of the nucleic acids (8th ed.). Madrid, España: Reverté. (1976).

DEWHURST, R., Wheeler, J., Chummun, K., Mather, J., Callaghan, A., & Crane, M. The comparison of rapid bioassays for the assessment of urban ground water quality. Chemosphere, 47, 547. (2002).

DORRONSORO, C. Lección 2. CONSTITUYENTES DEL SUELO. Fase sólida. (U. d. Agrícola, Editor) Recuperado el 06 de 05 de 2013, de Introducción a la Edafología: <http://edafologia.ugr.es/introeda/tema00/progr.htm> (2010).

EJOLT. Mapping Environmental Justice. Recuperado el 2014, de Environmental Justice Organisations, Liabilities and Trade: <http://www.ejolt.org/> (2014).

EPA 712-C-96-219. Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870. 5265. The Salmonella typhimurium Reverse Mutation Assay. (1996).

EPA 712-C-98-247. Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870. 5100. Bacterial Reverse Mutation Test. (1998).

FERGUSON, L., & Denny, W. Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators. Mutation Research, 623, 14-23. (2007).

FERRÃO V., V. M., et al. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mutation Research*, 490, 141-158. (2001).

FISCHER, G. R. I Simposio Internacional y II Nacional. "*Plaguicidas, Medio Ambiente y Salud Humana*". La problemática de los plaguicidas en Latinoamérica (pág. 69). Palmira: Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. (1990).

FISHBEIN, L. Overview of potential mutagenic problems posed by some pesticides and their trace impurities. *Environmental Health Perspectives*, 27, 125-131. (1978).

DE LA FUENTE, L y FRUTOS, J. (1995). Toxicología y seguridad química: Evaluación y Gestión del Riesgo Químico. Comunidad de Madrid. Consejería de Sanidad y Servicios Sociales.

GARCÍA A., C. Síntesis diagnóstica de las enfermedades profesionales producidas por metales, productos químicos y agentes vivos. Madrid: Mapfre. (1996).

GODFREY, I., Bravo, E., Soto, A., Benítez, N., & Larmat, F. Detection of mutagenic agents by means of the Ames Test in waters of the Cauca river in the city of Cali, Colombia. New Orleans: Pittcon Conference & Expo 2008. (2008).

GONZÁLEZ, D. Determinación de cromo total y disponible en diferentes fracciones granulométricas de sedimentos del río Cauca por espectrometría de Absorción Atómica. Tesis de Grado, Universidad del Valle, Facultad de Ciencias. Departamento de Química, Cali. (1997).

INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, M. Protocolo de toma de muestras de aguas superficiales, manuales y guías, 070710. Subdirección de Hidrología - Grupo Laboratorio de Calidad Ambiental. República de Colombia. (2008).

JENKINS, J. Genética (1 ed.). Madrid, España: Reverté. (1985).

JUNK, G. A. et al. Use of macroreticular resins in the analysis of water for trace organic contaminants. *Journal of Chromatography*, 99, 745-762. (1974).

KIER, L. D. The Salmonella Typhimurium/mammalian microsomal assay. A report of the of the U.S Environmental Protection Agency Gene-ToxProgram. *Mutation Research*, 168(2), 69-240. (1986).

KOPP, J. F., et al. "Cold Vapor" method for determining mercury. *American Water Works Association*, 64(1), 20-25. (1972).

KRAYBILL, F. Carcinogenesis of synthetic organic chemicals in drinking water. *Journal of the American Water Works Association*, 73, 370. (1981).

- KUTLU, M., Aydoğan, G., Susuz, F., & Özata, A. The Salmonella mutagenicity of water and sediments. The Salmonella mutagenicity of water and sediments, 17, 111-116. (2004).
- LERDA, D. E., & Prosperi, C. H. Water mutagenicity and toxicology in Río Tercero (Cordoba, Argentina). Water Research, 819-824. (1996).
- LEWIN, B. Genes II. New Jersey, United State: Pearson Prentice Hall. (2000).
- LOUIS, L., Atherholt, T., & McGarrit, G. Background and Results to Date. En L. McGeorge, Mutagenicity Analyses of Industrial Effluents. New Jersey: Office of Science and Research. Department of Environmental Protection. (1983).
- MA, M., et al. Mutagenic activity of organic pollutants extracted from waters in Guanting Reservoir and Yongding River. Wei Sheng Yan Jiu., 30(6), 355-7. (2001).
- MADIGAN, M., Martinko, J., & Parker, J. Brock Biología de los Microorganismos (Decima ed.). Barcelona: Pearson Education Prentice Hall. (2004).
- MARON, D. M., & Ames, B. N. Revised methods for the salmonella mutagenicity test. Mutation Research, 113, 173-215. (1983).
- MAROUKA, S., & Yamanaka, S. Mutagenic of laboratory chlorinated river water. Science of the Total Environment, 29, 143-154. (1983).
- MARX, J. Animal carcinogen testing challenged. Science, 743-6. (1990).
- MELÉNDEZ, I., ZULETA, M., CALLE, J., & Salazar, D. Actividad mutagénica de aguas de consumo humano antes y después de clorar en la planta de Villa Hermosa Medellín. Iatreia, 14(3), 167-175. (2001).
- MÉNDEZ, F., Ocampo, C. E., & Pradilla, A. Impacto de un depósito de residuos sólidos en el crecimiento físico infantil. Colombia Médica, 39(3), 253. (2008).
- MERSCH-SUNDERMANN, V., Dickgiesser, N., Kotter, K., & Harre, M. The mutagenicity of surface water, waste water and drinking water in the Rhine-Neckar region in the Salmonella microsome test (Ames Test). Zentralbl Bakteriöl Mikrobiol Hyg [B], 397-410. (1988).
- MORTELMANS, K., & Zeiger, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. Mutation Research, 455, 29-60. (2000).

MUÑOZ, M. Evaluación del grado de contaminación del río Cauca mediante la especiación geoquímica del cromo en sedimentos. Tesis de Grado, Universidad del Valle, Facultad de Ciencias. Departamento de Química, Cali. (1999).

NIES, D. H. Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 730-750. (1999).

NTC 5667-1. Norma Técnica Colombiana NTC-ISO 5667-1. Gestión ambiental. Calidad del agua. Muestreo. Bogotá: ICONTEC. (1995).

NTC-3650-5. Norma Técnica Colombiana NTC 3650-5. Calidad del agua. Vocabulario. Bogotá: ICONTEC. (1998).

OECD 471. OECD Guideline for testing of chemicals. Bacterial Reverse Mutation. (1997).

OHE, T., White y P. A., & DeMarini, D. M. Mutagenic characteristics of river waters flowing through large metropolitan areas in North America. *Mutation Research*, 534(1), 101-112. (2003).

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Evaluación de la actividad carcinogénica y mutagénica de los productos químicos. Serie de Informes Técnicos, Ginebra. (1974).

OROZCO, L., & Zuleta, M. Detección de mutacarcinógenos en aguas del Río Pantanillo y efecto genotóxico de esta agua en el DNA nuclear y mitocondrial de células eucarióticas. *Iatreia*, 13(2). (2000).

RADA MENDOZA, M. D. Estudio y evaluación del grado de contaminación por Cadmio, Mercurio y Plomo en aguas, peces y sedimentos del río Cauca por Espectrometría de Absorción Atómica. Trabajo de Grado, Universidad del Valle, Facultad de Ciencias. Departamento de Química, Cali. (1998).

RANDOW, F. F., Hebener, T., Merkel, G., & Luck, S. Risk for the Rostock water supply from the Warnov river by an old deposit at Schwann. *Zentralbl Hyg Umweltmed*, 197(5), 408-19. (1995).

REIFFERSCHIED, D. R., & GRUMM, T. Genotoxicity in German Surface Waters - Results of a Collaborative Study. *Water Air and Soil Pollution*, 123(1), 67-79. (2003).

RESTREPO, M. C., & VELÁSQUEZ, L. O. Evaluación del grado de contaminación del río Cauca, mediante la especiación geoquímica del cromo en sedimentos. Tesis de Grado, Universidad del Valle, Facultad de Ciencias. Departamento de Química, Cali. (1999).

RODRÍGUEZ PAZ, D., & VELÁSQUEZ, L. O. Estudio y evaluación del grado de contaminación por plomo en sedimentos del río Cauca por espectrometría de Absorción Atómica con llama. Trabajo de Grado, Universidad del Valle, Facultad de Ciencias. Departamento de Química. (1997).

SAAVEDRA, S. M., VELÁSQUEZ, L. O., & Jaramillo, A. Evaluación de contaminación por cromo en aguas del río Cauca por espectrometría de Absorción Atómica. Tesis de Grado, Universidad del Valle, Facultad de Ciencias. Departamento de Química, Cali. (2001).

SALDARRIAGA, W., et al. Distribución geográfica en Cali, Colombia, de malformaciones congénitas. Hospital Universitario del Valle, marzo de 2004-febrero de 2005. Colombia Médica, 38(1). (2007).

SANCHEZ, R., SOTO, A., JIMÉNEZ, G. A., & Larmat, F. E. Monitoring of heavy metal levels in water from the river Cauca in the urban zone of the city of Cali, Colombia. Pittcon conference & expo 2008, New Orleans. (2008).

SIDDIQUI, A. H., & Ahmad, M. The Salmonella mutagenicity of industrial, surface and ground water samples of Aligarh region of India. Mutation Research, 541, 21. (2003).

SIERRA, J. E. et al. Evaluation of the mutagenic activity of waters collected from the Cauca river in the city of Cali, Colombia by using the Salmonella/microsome assay. Revista de Ciencias, 16, 131-143. (2012).

SIGMA ALDRICH Inc. Catálogo de reactivos y productos químicos. Amberlite® XAD-16. Recuperado el 22 de 08 de 2008, de Sigma Aldrich: www.sigmaaldrich.com. (12 de 4 de 2013).

SINGH, A., CHANDRA, S., K. G., & Chauhan, L. Mutagenicity of leachates from industrial solid wastes using Salmonella. Ecotoxicology and Environmental Safety, 66, 210-216. (2007).

SINGER, P. C; 3. J. BARRY; G. M. PALEN & A. E. SCRIVNER (1981) Triim!omethane formation in Nortit Carolina drinking waters. 3. AWWA 73 (8): 392-401.

SORIANO, C., CREUS, A., & Marcos, R. Gene-mutation induction by arsenic compounds in the mouse lymphoma assay. Mutation Research, 634, 40. (2007).

TAQUES, M., SOTO, A., & Larmat, F. Evaluación de la mutagenicidad en aguas del Río Cauca en la ciudad de Cali utilizando el Test de Ames. Tesis de Grado, Universidad del Valle, Facultad de Ciencias. Departamento de Química, Cali. (2009).

TOKALIOGLU, S., KAVTAL, S., & Elci, L. Speciation and Determination of Heavy Metals in Lake Water by Atomic Absorption Spectrometry after Absorption on Amberlite XAD-16 Resin. *Analytical Sciences*, 16, 1169-74. (2000).

_____. (2000). p. 16, 1119-1126.

UNIVERSIDAD DEL VALLE & CORPORACIÓN AUTÓNOMA REGIONAL DEL VALLE. El Río Cauca en su valle alto: Un aporte al conocimiento de uno de los ríos más importantes de Colombia. Cali, Colombia: Publicaciones CVC-Universidad del Valle. (2007).

_____. _____. Estudio de la calidad del agua del Río Cauca y sus principales tributarios mediante la aplicación de índices de calidad y contaminación tramos Salvajina-La Virginia. X. Cali. (2004).

_____. _____. Plan de muestreo con propósitos de control de calidad del agua del Río Cauca y sus tributarios basados en criterios estadísticos. III. (2001).

VAHL, H. H., Karbe, L., & Westendorf, J. Genotoxicity assessment of suspended particulate matter in the Elbe River: comparison of Salmonella microsome test, arabinose resistance test, and umu-test. *Mutation Research*, 394, 81-93. (1997).

VARGAS, V. M., MOTTA, V. E., & Henriques, J. A. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutation Research*, 31, 31-45. (1993).

VÁSQUEZ FORY, A., & VELÁSQUEZ L., O. Evaluación por espectrometría de Absorción Atómica de mercurio en aguas del tramo sur del río Cauca. Tesis de Grado, Universidad del Valle, Facultad de Ciencias. Departamento de Química, Cali. (2001).

WANDRUSZKA, V. *Geochemical Transactions*. Journal from © The Royal Society of Chemistry and the Division of Geochemistry of the American Chemical Society, 2, 1124-1139. (2000).

WATANABE, T. H. Genotoxicity of soil. *Journal of Health Science*, 47, 433. (2001).

WEINER, J. A., & NYLANDER, M. The Relationship Between Mercury Concentration in Human Organs and Different Predictor Variables. *Science of the Total Environment*, 138(1), 101-115. (1993).

WHITE, P. A., & RASMUSSEN, J. B. The genotoxic hazards of domestic waste in surface waters. *Mutation Research*, 410, 223. (1998).

WONG, P. K. Mutagenicity of Heavy Metals. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 40, 597-603. (1988).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for drinking-water quality (fourth ed.). World Health Organization. (2011).

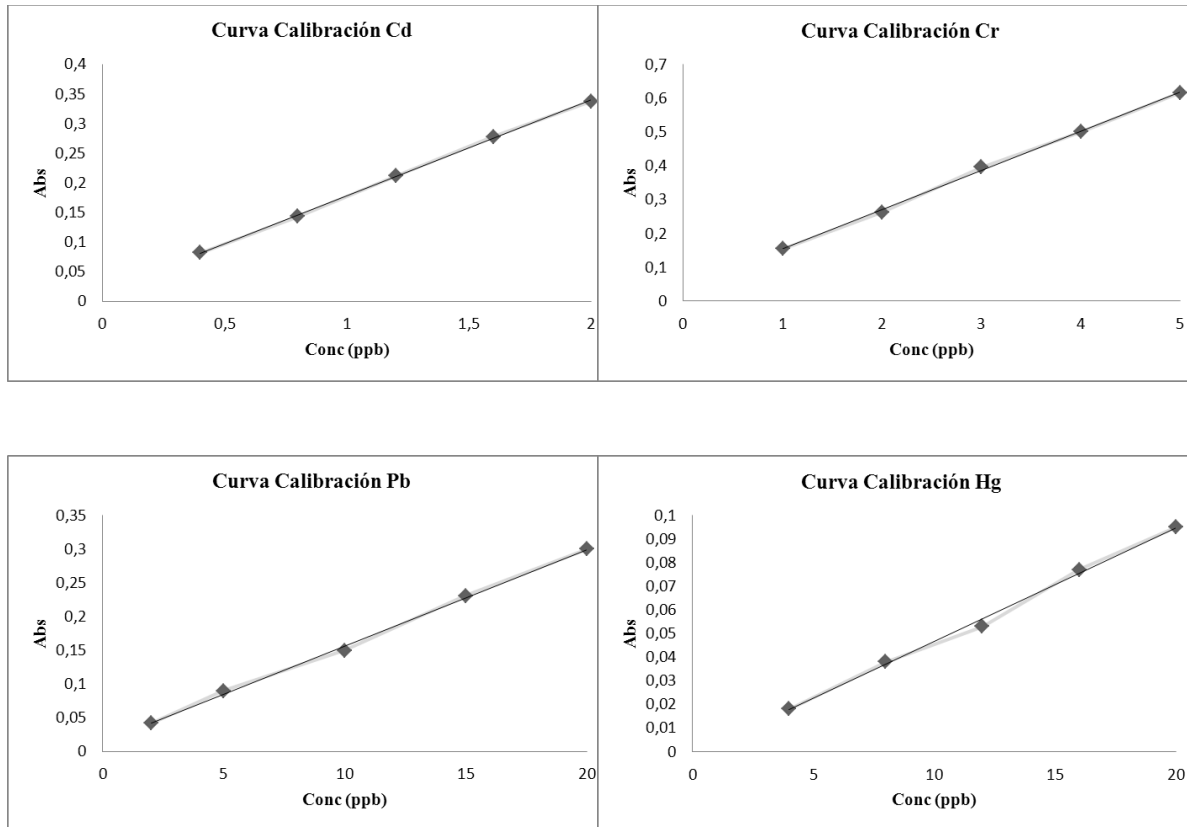
ZEIGER, E. & MORTELMANS, K. The Salmonella (Ames) Test for Mutagenicity. En E. Hodgson (Ed.), Current Protocols in Toxicology. John Wiley and Sons. (1999).

ZULETA, B. M. Mutágenos en agua de consumo humano. Curso Taller Genoma y Daño, Universidad de Antioquia., Instituto de Biología. Grupo de Carcinogénesis. Corporación Biogénesis, Medellín. (2006).

ZULETA, M. Contribución de la contaminación ambiental a la presencia de mutágenos en aguas colombianas de consumo humano. Memorias VII Congreso Latinoamericano de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental y I Congreso Colombiano de Mutagénesis y Carcinogénesis. Cartagena, Colombia 29–31 de agosto, Universidad de los Andes y la Asociación Latinoamericana de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental (ALAMCTA). (2007).

ANEXOS

ANEXO 1. Curvas de Calibración, para los metales Cd, Cr, Pb, Hg



ANEXO 2. Especiación de los metales Pb, Cd y Cr en sólidos suspendidos, sustancias húmicas e iones libres

Punto de muestreo	Fecha	Metal								
		Pb			Cd			Cr		
		SS	H	L	SS	H	L	SS	H	L
Puente el Hormiguero	Ene-08	0.030	0.060	0.070	0.436	0.003	0.010	ND	0.089	0.087
	Abr-08	7.03	17.1	7.92	ND	ND	0.0049	4.98	2.65	1.70
	Abr-09	0.325	0.057	0.526	0.003	0.029	0.061	2.89	0.749	1.114
	Jun-09	0.449	0.068	0.687	0.008	0.032	0.072	3.736	0.845	1.237
	May-13	44.01	14.06	14.64	48.02	1.14	10.78	56.54	6.88	1.87
	Ago-13	10.91	16.92	0.1	11.39	4.31	1.34	8.31	3.34	7.58
	Sep-13	28.73	11.37	26.75	14.31	2.53	1.14	35.92	2.34	3.56
Canal Colector Sur	Ene-08	0.020	0.003	0.020	0.021	0.001	0.002	0.002	0.090	0.119
	Abr-08	4.29	1.68	31.8	0.0075	0.0032	0.0066	6.03	0.793	5.61
	Abr-09	0.221	0.401	0.151	0.0031	0.051	0.019	0.487	0.625	2.001
	Jun-09	0.272	0.508	0.174	0.0048	0.064	0.024	0.522	0.747	2.759
	May-13	13.84	9.9	ND	72.13	11.41	1.12	58.71	0.32	4.12
	Ago-13	32.12	7.98	8.51	11.91	3.54	5.52	19.9	1.76	2.92
	Sep-13	14.33	37.26	37.26	14.31	5.71	1.14	18.7	3.61	3.64
PTAP	Ene-08	ND	0.007	0.005	0.022	0.004	0.002	0.068	0.011	0.092
	Abr-08	1.73	40.7	5.25	0.0053	0.0008	0.0013	3.13	0.852	1.93
	Abr-09	0.137	0.116	0.123	0.0101	0.002	0.0501	1.29	0.871	1.262
	Jun-09	0.182	0.130	0.285	0.0112	0.003	0.0656	1.420	0.948	1.898
	May-13	28.52	6.38	4.9	81.13	3.02	84.47	41.34	1.15	0.78
	Ago-13	1.12	13.01	ND	19.25	1.54	4.83	20.6	1.41	2.46
	Sep-13	35.44	21.7	21.7	12.34	6.44	2.12	26.21	1.65	4.46
Puente de Juanchito	Ene-08	0.020	0.008	0.005	0.204	0.005	0.002	0.164	0.010	0.091
	Abr-08	3.76	ND	ND	0.0045	0.0026	0.0037	6.45	1.31	ND
	Abr-09	0.259	0.326	0.728	0.789	0.103	0.072	1.977	1.031	2.892
	Jun-09	0.374	0.488	0.728	0.900	0.106	0.072	2.088	1.180	2.892
	May-13	47.42	10.64	2.05	91.01	3.65	95.98	71.14	3.29	0.15
	Ago-13	16.31	1.9	4.7	17.29	2.39	3.24	24.85	8.34	1.17
	Sep-13	41.96	1.0	1.0	13.26	0.43	1.21	33.5	0.87	6.34
Delta Río Cali	Ene-08	0.010	0.005	0.020	0.013	0.003	0.007	0.146	0.121	0.039
	Abr-08	6.15	4.3	17.2	0.003	0.0016	0.0029	8.92	1.06	26.6
	Abr-09	0.198	0.057	0.032	0.022	0.006	0.032	1.27	1.089	1.441
	Jun-09	0.198	0.057	0.032	0.022	0.006	0.032	1.270	1.089	1.441
	May-13	28.78	15.48	ND	71.29	1.58	75.18	41.32	2.18	8.31
	Ago-13	12.54	10.85	1.58	16.36	3.37	4.31	11.9	11.34	1.94
	Sep-13	48.62	23.13	23.13	21.31	1.18	3.98	32.25	2.56	3.65