

**EVALUACIÓN DE LA MUTAGENICIDAD GENERADA POR EL USO DE  
TANINOS MODIFICADOS EN UN PROCESO DE COAGULACIÓN-  
FLOCULACIÓN EN AGUAS RESIDUALES POR MEDIO DEL TEST DE AMES**



**JULIÁN FELIPE CIFUENTES CAMARGO**

**JUAN DIEGO VILLAR MORENO**

**TRABAJO DE GRADO**

Presentado como requisito parcial para optar por el título de

**MICROBIÓLOGO INDUSTRIAL**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL**

**BOGOTA D.C.**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

### **Artículo 23 de la resolución N° 13 de Julio de 1946**

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vean en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por ser nuestro apoyo, guía y sobre todo fortaleza en los momentos de debilidad y duda. A nuestros padres por su constante comprensión, escucha, consejo y correcciones. A la Pontificia Universidad Javeriana, por ser la plataforma educativa que ha permitido nuestro desarrollo no solo académico sino integral, y por brindarnos la infraestructura y los bienes y servicios necesarios para el desarrollo del presente trabajo de grado. A nuestra directora la doctora María Claudia Campos, por su persistencia en nuestra excelencia, su apoyo y consejo, pero sobre todo por su confianza en nuestro trabajo y capacidades. A nuestra codirectora la microbióloga industrial Jennifer Tatiana López, por su ayuda y acompañamiento permanente. Al departamento de Química, por su colaboración constante al momento de solicitar información o material a analizar. A los miembros del laboratorio de Indicadores de Calidad de Aguas y Lodos de la Pontificia Universidad Javeriana (Camilo Venegas, Laura Palacios, Eliana Riaño y Natalia Leiton), por su acompañamiento, ayuda y aporte a nuestro aprendizaje constante. A nuestras compañeras y amigas Catalina Castillo, María José Hernández, Victoria Moscoso y Valentina Galvis, por su compañía constante, consejos académicos y personales, pero sobre todo por su comprensión y ayuda en momentos de discordancias. Finalmente, a mi compañero, amigo y hermano con quien realice el presente trabajo de grado, por su comprensión, ayuda, enseñanza, cariño y constante complicidad para cumplir un sueño más juntos.

*- Julián Felipe Cifuentes y Juan Diego Villar-*

## TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....	8
2. INTRODUCCIÓN .....	9
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
4. JUSTIFICACIÓN .....	13
5. MARCO TEÓRICO.....	14
5.1 Aguas Residuales y su tratamiento.....	14
5.2. Coagulación-Floculación .....	15
5.2.1 Uso de Taninos como Coagulantes-Floculantes.....	16
5.2.1.1 <i>Acacia mearnsii</i> .....	16
5.3. Mutagenicidad.....	18
5.4. Test de Ames.....	19
5.4.1 Cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> usadas en el Test de Ames.....	20
6. OBJETIVOS .....	22
6.1 Objetivo General .....	22
6.2 Objetivos Específicos.....	22
7. METODOLOGÍA .....	22
7.1 Obtención de la muestra.....	22
7.2 Análisis de la Muestra .....	23
7.2.1 Curva de Crecimiento.....	24
7.2.2 Verificación de los Marcadores Genéticos.....	25
7.2.2.1 Requerimiento Histidina-Biotina .....	25
7.2.2.2 Marcador uvrB .....	26
7.2.2.3 Mutación Rfa.....	27
7.2.2.4 Plásmido pkM101 .....	28
7.2.3 Procesamiento de Muestras .....	29
7.2.3.1 Índice de Mutagenicidad .....	31
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
8.1 Curva de Crecimiento.....	32
8.1.1 Parámetros Cinéticos.....	34
8.2 Verificación de los Marcadores Genéticos.....	36
8.2.1 Requerimientos His-Biot.....	36

8.2.2 Marcador uvrB .....	37
8.2.3 Mutación Rfa.....	38
8.2.4 Plásmido pkM101 .....	38
8.3. Muestras de Tanino de <i>Acacia mearnsii</i> Modificado.....	39
9. CONCLUSIONES .....	52
10. RECOMENDACIONES .....	52

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Mutaciones y características genéticas de las cepas de <i>S. typhimurium</i> utilizadas en el Test de Ames ( <i>Autores</i> ).....	21
<b>Tabla 2.</b> Resumen de las muestras procesadas, la concentración y diluciones realizadas a las mismas.....	30
<b>Tabla 3.</b> Resultados de la curva de crecimiento para la cepa TA98 de <i>Salmonella typhimurium</i> ....	32
<b>Tabla 4.</b> Resultados de la curva de crecimiento para la cepa TA100 de <i>Salmonella typhimurium</i> ..	33
<b>Tabla 5.</b> Resultados de los parámetros cinéticos determinados para la cepa TA98. ....	35
<b>Tabla 6.</b> Resultados de los parámetros cinéticos determinados para la cepa TA100 .....	36
<b>Tabla 7.</b> Resultados de los requerimientos nutricionales de las cepas TA98 y TA100 de <i>S. typhimurium</i> . ....	37
<b>Tabla 8.</b> Resultados de la presencia o ausencia del marcador uvrB. ....	37
<b>Tabla 9.</b> Resultados de la confirmación de la presencia de la mutación Rfa. ....	38
<b>Tabla 10.</b> Resultados de la confirmación de la resistencia a ampicilina por la presencia del plásmido pkM101. ....	39
<b>Tabla 11.</b> Resultados del test de Ames a la muestra liofilizada de agua residual tratada con tanino extraído de <i>Acacia mearnsii</i> a una concentración de 250 ppm y modificado empleando la reacción de Mannich.....	40
<b>Tabla 12.</b> Resultados del Test de Ames a la muestra líquida de agua residual tratada con tanino extraído de <i>Acacia mearnsii</i> a una concentración de 250 ppm y modificado empleando la reacción de Mannich.....	41
<b>Tabla 13.</b> Resultados del test de Ames para las tres replicas evaluadas de la muestra de tanino extraído de <i>Acacia mearnsii</i> a una concentración de 250 ppm y modificado empleando la reacción de Mannich.....	42
<b>Tabla 14.</b> Resultados del test de Ames a la muestra de tanino extraído de <i>Acacia mearnsii</i> a una concentración de 200 ppm y modificado empleando la reacción de Mannich.....	43
<b>Tabla 15.</b> Resultados del test de Ames a la muestra de tanino extraído de <i>Acacia mearnsii</i> a una concentración de 200 ppm sin modificar empleando la reacción de Mannich.....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Acacia mearnsii</i> en Honolulu, Hawái. (Forest y Kim Starr) .....	17
<b>Figura 2.</b> Metodología para la comprobación de requerimientos nutricionales de Histidina y Biotina (Autores).....	26
<b>Figura 3.</b> Metodología para la comprobación del marcador uvrB (Autores) .....	27
<b>Figura 4.</b> Metodología para la comprobación de la mutación Rfa (Autores).....	28
<b>Figura 5.</b> Metodología para la comprobación de la presencia del plásmido pKM101 (Autores).....	29
<b>Figura 6.</b> Metodología para el procesamiento de muestras (Autores).....	31
<b>Figura 7.</b> Curva de crecimiento para la cepa TA98 de <i>S. typhimurium</i> .....	33
<b>Figura 8.</b> Curva de crecimiento para la cepa TA100 de <i>S. typhimurium</i> . .....	34
<b>Figura 9.</b> Gráfica de linealización de la fase exponencial de la cepa TA98.....	35
<b>Figura 10.</b> Gráfica de linealización de la fase exponencial de la cepa TA100.....	36

## 1. RESUMEN

El coagulante-floculante extraído de *Acacia mearnsii* y modificado empleando formaldehído y cloruro de amonio, ha demostrado su eficiencia en procesos de remoción de contaminación de efluentes industriales. Sin embargo, se desconoce si el tanino por sí solo o al modificarse, induce mutagenicidad, la cual se puede evaluar por medio del Test de Ames. En el presente trabajo se realizó una curva de crecimiento por doce horas y a partir de esta se evaluó la presencia de marcadores genéticos característicos de las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium*; así mismo, después de obtener células viables en fase exponencial y confirmar la presencia de los marcadores genéticos, se evaluó la actividad mutagenica de un coagulante-floculante de origen vegetal extraído de *Acacia mearnsii* modificado adicionando cloruro de amonio y formaldehído por medio de la reacción de Mannich, empleando el Test de Ames con las cepas TA98 y TA100 de *S. typhimurium*. Se analizaron un total de siete muestras: las dos primeras provenían de un sistema de tratamiento de aguas residuales industriales tratadas con el tanino a 250 ppm, las cuales arrojaron un Índice de Mutagenicidad (IM) de 0. Las tres siguientes de tanino modificado a una concentración de 250 ppm, con las cuales se obtuvo un IM entre 5-43 y posteriormente una de tanino modificado en donde se redujo la concentración a 200 ppm con la cual se obtuvo un IM menor a 2 y una de tanino no modificado a 200 ppm para determinar si la mutagenicidad era causada por las sustancias modificantes o el extracto vegetal por sí solo, en la cual se obtuvo un IM de 0.

Los resultados obtenidos parecen indicar que los componentes empleados para la modificación y potenciación de la actividad coagulante-floculante del tanino extraído de *Acacia mearnsii*, formaldehído y cloruro de amonio, son los causantes de la mutagenicidad detectada empleando el test de Ames.



## 2. INTRODUCCIÓN

El aumento de los niveles de aguas contaminadas que requieren un tratamiento, ha llevado al desarrollo de distintos compuestos químicos o sintéticos empleados principalmente en los procesos de coagulación-floculación. Sin embargo, la composición de estos, principalmente sales de aluminio y hierro, pueden generar un efecto negativo sobre la salud de quienes consumen estas aguas después de su potabilización. Por esta razón, se ha implementado el uso y desarrollo de biofloculantes derivados de polímeros naturales obtenidos de sustancias vegetales como alternativa para el tratamiento de aguas, ya que estos además representan una ventaja a nivel económico. Parte de esta alternativa de tratamiento ha sido impulsada por el uso de los taninos extraídos de distintas especies vegetales, entre las cuales cabe resaltar la llamada acacia negra o acacia australiana, *Acacia mearnsii*, una legumbre de rápido crecimiento nativa de Australia. Estos taninos requieren una modificación empleando una amina y un aldehído para potenciar su actividad coagulante-floculante. Con el fin de implementar esta nueva alternativa de tratamiento, que no busca eliminar los compuestos actualmente utilizados sino reemplazarlos, se pretende evaluar el posible efecto mutagénico del tanino de *Acacia mearnsii* modificado que será utilizado en un proceso de coagulación-floculación.

Uno de los principales ensayos *in vitro* para evaluar la mutagenicidad de diversos sustancias o compuestos es el test de Ames, el cual fue creado en 1970 por el doctor Bruce Ames y su grupo de investigación de la Universidad de Berkeley en California. Para el desarrollo de este se utilizan distintas cepas de *Salmonella typhimurium* genéticamente modificadas que, además de presentar marcadores genéticos específicos y un requerimiento nutricional o auxotrofia por la histidina, carecen de la cubierta de lipopolisacáridos típica de las cepas silvestres lo que facilita la penetración de diferentes agentes solubles a la célula, aumentando así su sensibilidad.

El presente trabajo busca dar respuesta a la pregunta, ¿El tanino modificado de *Acacia mearnsii* usado para un proceso de coagulación-floculación presenta mutagenicidad al ser evaluado por medio del test de Ames? Previo al ensayo con el Test de Ames se determinó

el tiempo al cual se obtuvieron células viables en fase exponencial por medio de una curva de crecimiento de las cepas TA98 y TA100 empleadas en el test y evaluación de los marcadores genéticos característicos de estas. Una vez obtenido el tiempo y concentración de la fase exponencial y la presencia de los marcadores se realizó el análisis de dos muestras de agua residual industrial tratada con el tanino modificado (una liofilizada y otra en presentación líquida), tres muestras de tanino modificado a 250 ppm, una de tanino modificado a 200 ppm y una última muestra de tanino sin modificar, para un total de siete muestras.

Los resultados de las muestras de agua residual tratada no descartaban si la mutagenicidad era causada por posibles trazas de contaminantes propias del origen del agua o la concentración de tanino modificado empleado para su tratamiento. Por esta razón, se decidió evaluar primero la posible mutagenicidad causada por el tanino a diferentes concentraciones. En la concentración de 250 ppm de tanino modificado, se obtuvo un gran número de colonias revertantes, lo que podía ser originado por las sustancias (formaldehído y cloruro de amonio) utilizadas para la modificación. Por esta razón se decidió analizar una muestra de 200 ppm diluyendo las sustancias utilizadas para la modificación con resultados de no mutagenicidad. Estos resultados sugerirían que la mutagenicidad observada en las otras muestras puede estar relacionadas con dichas sustancias.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, uno de los principales problemas que se presenta a nivel medioambiental es la contaminación del agua por las altas cargas de componentes químicos, físicos y microbianos que llegan a los efluentes. Esto se encuentra estrechamente relacionado con la transmisión de enfermedades como el cólera, la disentería, la hepatitis A, la fiebre tifoidea y la poliomielitis. Se estima que 842.0000 personas mueren anualmente como consecuencia de los problemas anteriormente mencionados, de las cuales 361.000 son niños menores de cinco años y 127.000 las contraen en centros hospitalarios a nivel mundial (2). Por otra parte, la existencia de compuestos tóxicos en el agua presenta ciertos niveles permitidos que al ser superados generan patologías a largo plazo tales como el cáncer de piel, vejiga y pulmón, hipertensión, problemas cardiovasculares y respiratorios (3). Un grupo de estos compuestos tóxicos contaminantes son los metales pesados, presentes en efluentes provenientes de zonas de explotación minera en donde se encuentran trazas de arsénico, cadmio, mercurio y cianuro, cuya acumulación puede ocasionar enfermedades de tipo crónico como infecciones respiratorias, dermatitis y diarrea; razón por la cual es necesario realizar un tratamiento que disminuya las concentraciones de estos contaminantes con el fin de minimizar el riesgo ambiental y sanitario (4).

El tratamiento y potabilización de los efluentes generados se realiza empleando distintos compuestos de origen químico, principalmente coagulantes-floculantes para retener la mayor porción de sólidos presentes en el agua; estos pueden generar un impacto negativo en la salud humana debido a que quienes tienen contacto con estas aguas post-tratamiento son más propensos a presentar complicaciones de salud y desarrollar enfermedades neurodegenerativas como lo son el Alzheimer y el Parkinson (5, 6). Una de las alternativas para reducir este riesgo es el uso de taninos de origen natural. Por esta razón se llevó a cabo el proyecto titulado *Aplicación de taninos crudos y modificados para el tratamiento de aguas residuales industriales como sistema de bio-remediación de metales pesados* realizado por los investigadores William Arismendi, Claudia Delgado y Lorena Lugo, el cual evidenció que la evaluación y aplicación de los coagulantes-floculantes naturales en los efluentes industriales presentan un aporte significativo en el tratamiento de aguas

residuales ya que es una alternativa sostenible, de bajo impacto económico y promisorio para la bio-remediación de acuíferos contaminados con mejoras a nivel ambiental y de calidad de vida de las poblaciones afectadas por la contaminación de estos efluentes (7).

Al utilizar nuevos productos para el tratamiento de efluentes de aguas residuales se busca evaluar una alternativa a la aplicación de los químicos ya existentes. Para esto se propone el uso de taninos modificados de extractos vegetales como biofloculantes ya que han mostrado ser eficientes en la reducción de contaminantes de origen químico presentes en el agua. Sin embargo, se desconoce el posible efecto mutagénico que puedan causar. Una de las pruebas *in vitro* empleadas en nuevos productos para la evaluación de la mutagenicidad es el test de Ames, el cual emplea cepas de *S. typhimurium* modificadas genéticamente para aumentar su sensibilidad en la detección de estos compuestos; por lo anterior, este es el Test seleccionado para evaluar la posible mutagenicidad del tanino.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Inicialmente, es necesario comprobar la presencia de los marcadores genéticos de las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium* (auxotrófica por histidina, sensibilidad a la luz UV por marcador *uvrB*, al cristal violeta por la mutación *Rfa*, y la resistencia a ampicilina por la presencia del plásmido *pkM101*) utilizadas para llevar a cabo el Test de Ames, debido a que primero, se debe realizar un control de calidad semestral de las cepas y del procedimiento ya estandarizado por el Laboratorio de Indicadores de Aguas y Lodos (LIAL) para comprobar que estos marcadores genéticos o mutaciones específicas no se hayan perdido al encontrarse criopreservadas, y segundo el garantizar resultados confiables al utilizar estas cepas para realizar el Test de Ames a muestras de taninos modificados y a largo plazo al analizar muestras de agua con otro origen de contaminación por parte del LIAL para comprobar su posible capacidad mutagénica.

La razón para utilizar el Test de Ames como método que evalúa la posible mutagenicidad de los taninos modificados para el tratamiento de aguas recae en los beneficios que este presenta, los cuales se centran en que es un bioensayo relativamente económico, los resultados son obtenidos en un tiempo corto y presenta una sensibilidad alta debido a las modificaciones que presentan las cepas empleadas. Por el contrario, las características (sensibilidad y especificidad) y la eficiencia de otras técnicas para detección de mutagenicidad como lo son el test de células germinales, micronúcleos, reversión empleando cepa WP2 de *E. coli*, ensayo mutación genética HPRT con células de ovario de hámster chino entre otros, son menores (8). De igual forma, si se determina que el tanino no presenta efectos negativos medioambientales o en la salud de la población humana y/o animal podría ser usado en el tratamiento para los efluentes provenientes de zonas de explotación minera del oro en Colombia donde predomina el uso del mercurio y otras sustancias químicas, cuyas trazas permanecen y se acumulan en los cuerpos acuíferos (4), tal y como se observó en los resultados obtenidos por el grupo de Investigación en Fitoquímica perteneciente al Departamento de Química, en donde se evidenció la reducción de la concentración de metales pesados empleando taninos modificados de *Acacia mearnsii* (9).

## **5. MARCO TEÓRICO**

### **5.1 Aguas Residuales y su tratamiento**

El agua residual se clasifica según el origen de su contaminación en doméstica, industrial, ganadera y agrícola, las cuales en su mayoría presentan un alto contenido de materia orgánica, metales pesados, y microorganismos. El agua residual de tipo industrial presenta residuos en su mayoría químicos y con distintos componentes orgánicos e inorgánicos provenientes de empresas textiles, curtiembres y farmacéuticas entre otras (10). Así mismo, la mayor concentración de metales pesados se encuentra en aguas contaminadas provenientes de zonas que presentan elevados niveles de explotación minera, en Colombia principalmente de la minería del oro, entre los cuales cabe resaltar la presencia de arsénico, cadmio, cianuro y mercurio; cuyas trazas presentes en el agua y su acumulación son nocivas para la salud, presentándose la posibilidad de desarrollar enfermedades de tipo crónico (4).

La principal opción de tratamiento y depuración de estos efluentes se presenta en las Plantas de Tratamiento, los cuales cuentan con diferentes etapas; la primera fase mediante tratamientos físicos y químicos que buscan la eliminación del material de gran tamaño, así como la precipitación de metales. En este proceso se emplean compuestos químicos o naturales llamados coagulantes-floculantes, en el proceso de coagulación se elimina la turbiedad y el color por aglomeración de partículas, y en la floculación se acumulan los coágulos anteriormente formados para su posterior eliminación mediante procesos de sedimentación y filtración, los cuales hacen parte de los procesos de potabilización o depuración en los sistemas químicamente asistidos. La segunda fase, utiliza microorganismos para disminuir la alta carga orgánica mediante sistemas anaerobios y/o sistemas aerobios dependiendo de la concentración de materia orgánica presente en el agua. La tercera fase es la desinfección, la cual busca la eliminación de contaminantes microbianos; en esta se emplean distintos métodos como el uso de calor, radiación por luz UV, y de compuestos químicos como el cloro y sus derivados, el ozono y el bromo (11).

## 5.2. Coagulación-Floculación

Como se mencionó anteriormente, uno de los procesos más relevantes en los sistemas de tratamiento de aguas es la coagulación-floculación, en la cual se busca incrementar la tendencia de las partículas de agregarse unas a otras para formar partículas mayores y así precipitar más rápidamente. De igual forma se pretende obtener una aglomeración de los flóculos recién formados, con la finalidad de aumentar el tamaño y peso necesario para sedimentar y filtrar con mayor facilidad los contaminantes presentes en el agua (12).

Para esto se utilizan coagulantes-floculantes de tipo químico, orgánico sintético o natural; los primeros son sales inorgánicas como el sulfato de aluminio, el sulfato férrico y el sulfato ferroso, los cuales poseen una alta capacidad de precipitación de partículas presentes en el agua, así como un bajo costo en el mercado. Sin embargo, en altas concentraciones estos coagulantes-floculantes pueden ser nocivos para la salud debido a su acumulación en el agua en forma de trazas (13). Por su parte los de tipo orgánico sintético son principalmente derivados de polímeros de poliacrilamida y petróleo, su actividad se puede llegar a ver afectada por parámetros como son las cargas y el peso molecular de las partículas presentes en el agua; debido a esto, y a su alto costo, son aplicados en bajas concentraciones que de igual forma pueden genera toxicidad y el posible desarrollo de patologías como el cáncer (14, 15).

Como alternativa al uso de los compuestos anteriormente mencionados se han desarrollado los biofloculantes o floculantes biológicos, los cuales son polímeros de alto peso molecular derivados de extractos vegetales o animales como polisacáridos de celulosa, almidón extraído de tubérculos como la papa y yuca (16), extractos de semillas de *Moringa oleífera* (17), alginato proveniente de algas marinas, quitosano originario del proceso productivo de camarones (18, 19), y taninos derivados de polímeros naturales (20), entre otros. Estos presentan una significativa capacidad de coagulación-floculación, así como la propiedad de ser biodegradables y presentar un menor efecto negativo en el ambiente y posiblemente en la salud humana (21).

### **5.2.1 Uso de Taninos como Coagulantes-Floculantes**

Los taninos (obtenidos de la corteza de especies vegetales) por sí solos presentan una reducida actividad coagulante-floculante, razón por lo que es necesario realizar una modificación estructural empleando la reacción de Mannich, en donde se adiciona un hidrógeno al nitrógeno proveniente de la reacción de amino-metilación del tanino condensado, por medio de la cual los taninos se convierten en anfóteros y se potencializa la capacidad catiónica, facilitando así la remoción de metales pesados ionizables por la precipitación de estos. Al someterlos a esta reacción se aumenta su capacidad de reducción de contaminantes orgánicos persistentes coloreados tipo diazoico, razón por la cual son una opción económica y eco-amigable para ser usados como una alternativa de los coagulantes y floculantes químicos y orgánico sintéticos empleados actualmente en las plantas de tratamiento; cabe resaltar que entre sus propiedades se encuentra el ayudar a reducir la turbidez y la concentración de sólidos en suspensión (22, 23, 24).

Al presentar estas propiedades, los taninos extraídos de *Acacia mearnsii* han sido utilizados para el tratamiento y potabilización de aguas residuales sin conocer el posible efecto mutagénico que estos puedan llegar a presentar en modelos biológicos, proceso necesario para realizar una formulación definida para un posible producto de venta que logre reemplazar el uso de sustancias químicas, principalmente del sulfato de aluminio; las cuales pueden generar enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y el Alzheimer por la acumulación de trazas de esta sustancia en la población que se encuentra en contacto con esta y que adicionalmente presente patrones hereditario de prevalencia de estas enfermedades (5, 6).

#### **5.2.1.1 *Acacia mearnsii***

Es una especie de leguminosa empleada por primera vez por el botánico griego Pedanius Dioscorides en 90 a.C y completamente descrita por Emile August de Waldemar en 1925. Pertenece al género *Acacia*, a la familia Fabácea y al orden Fabales, esta especie es comúnmente llamada *Acacia mearnsii* negra o *Acacia mearnsii* australiana debido a que es



nativa del continente australiano, pero se ha distribuido en los bosques tropicales lluviosos de Asia, África, América del Norte y Sur América, así como en algunas islas del pacífico. Posee la capacidad de crecer en suelos propensos a la erosión en temperaturas de hasta 28°C, puede alcanzar hasta los diez metros de altura, sus flores son amarillo pálido o doradas y comercialmente representa uno de los principales especímenes vegetales de los cuales se extrae leña, así como taninos de su corteza (25).



**Figura 1.** *Acacia mearnsii* en Honolulu, Hawái. (Forest y Kim Starr)

Se han realizado diversos estudios empleando *Acacia mearnsii* debido al alto porcentaje de taninos encontrados en esta especie vegetal, la cual es originaria de Australia, pero se ha expandido en los diferentes continentes por su aplicación en el proceso de curtido del cuero. Uno de ellos fue realizado por Beltrán y Sánchez (2009), en donde se observó la reducción de al menos el 75% de las concentraciones iniciales de los patrones de metales pesados empleados, como el zinc, níquel y cobre, al adicionar una concentración de 150 ppm del tanino de *Acacia mearnsii* (26). Así mismo Beltrán *et al.* (2010) emplearon taninos comerciales extraídos de *Acacia mearnsii* (Tanfloc) y *Schinopsis balancea* (Silvafloc) para la clarificación, decoloración y reducción de surfactantes presentes en agua de un río aledaño a una población española, obteniendo así una disminución de surfactantes de 50 a 7.5 mg/ L y decoloración de casi el 100% (de 100 a 8 mg/L de colorante). Estos resultados muestran la capacidad coagulante-floculante de estos extractos vegetales (27). Este tanino ha sido empleado también para la eliminación de colorantes de tipo azoico, derivados del trifenilmetano y antraquinónicos de los efluentes de aguas residuales de tipo industrial debido a su difícil remoción empleando métodos tradicionales.

En estudios realizados por Beltrán *et al.* (2011) se determinó que la difícil eliminación de Violeta de Alizarina (un colorante de tipo antraquinónico) en efluentes industriales se debe a la presencia de un gran número de anillos aromáticos en su estructura. Al emplear el tanino extraído de *Acacia mearnsii* (cuyo nombre comercial es Acquapol S5T), los resultados muestran una remoción del 50% del colorante presente en las muestras de agua analizadas (28).

Castañeda (2017), realizó estudios en los cuales se evaluó la estabilidad y efectividad del tanino modificado de *Acacia mearnsii*, denominado TAM, al someterlo a pH de 4, 7 y 9, y dosis de agua residual industrial que contenía altas concentraciones de sólidos en suspensión, materia orgánica y metales pesados como cobre, cromo y mercurio. Se evaluaron concentraciones del tanino modificado de 1, 2, 3.3 y 4.3%. Empleando una dosis de TAM al 1% a un pH de 9, se obtenía una remoción del 56% de cobre, 89% de cromo, 97% de mercurio, así como del 88% de los sólidos suspendidos totales y del 90% de la materia orgánica contenida en las muestras de los efluentes analizados. Estos resultados muestran la efectividad y eficacia del TAM, ya que no solo genera una remoción casi total de la materia orgánica y de los sólidos suspendidos totales, sino que también es un producto promisorio al ser utilizado para la remoción de efluentes que contengan metales pesados como pueden ser los provenientes de las zonas de explotación minera (9).

### **5.3. Mutagenicidad**

Los mutágenos son agentes capaces de inducir mutaciones en organismos eucariotas o procariotas, estos pueden ser de tipo físico como rayos UV y rayos X los cuales van dirigidos a ocasionar daños en la secuencia/conformación y estructura del ADN (29), o de tipo químico, de los cuales existen actualmente más de quinientos mil compuestos que pueden generar principalmente transiciones y transversiones en la secuencia del ADN (30). Al evaluar la mutagenicidad se busca conocer la capacidad o el grado de afección por parte de cierto compuesto químico o derivado de este, la cual puede clasificarse en

carcinogénica, teratogénica (deformación en el feto durante su gestación), o clastogénica (aparición de posibles síndromes) al ser evaluada en modelos *in vivo* (31, 32).

Estas mutaciones directas o indirectas en el ADN son detectadas e incluso cuantificadas por experimentos *in vivo* e *in vitro*. De los primeros podemos encontrar ensayos de micronúcleos en eritrocitos de mamíferos y ensayos citogenéticos; y de los segundos, los más utilizados son el test de Ames, ensayo de aberraciones cromosómicas en mamíferos y electroforesis unicelular (33). No existe un solo ensayo o test capaz de detectar todos los tipos de mutaciones inducibles por una sustancia o agente, por lo que es necesario realizar una serie de experimentos para conocer el posible efecto de la sustancia analizada.

#### **5.4. Test de Ames**

El Test de Ames fue creado en 1970 por el científico bioquímico de la Universidad de Berkeley, California, Bruce Ames quien buscaba conocer el nivel de toxicidad y la tasa de mutagenicidad de diferentes sustancias, y de esta forma determinar si estas podrían o no afectar directa o indirectamente al entrar en contacto con animales o humanos; este fue creado a causa de los estudios de las rutas metabólicas para la biosíntesis de la histidina en *Salmonella* spp. (1). Para evaluar estos efectos se utilizan cepas de la bacteria *Salmonella typhimurium* modificadas genéticamente con el fin de evidenciar mutaciones en el operón codificante para la degradación y aprovechamiento (biosíntesis) de la histidina como aminoácido empleado para el crecimiento bacteriano. Esta auxotrofia se confirma con el crecimiento en medios suplementados con histidina y el no crecimiento en medios carentes de este aminoácido. De esta forma se pone en contacto las cepas con la sustancia de interés a analizar, la cual por su posible actividad mutagénica podrá ocasionar una reversión en las mutaciones ya existentes en el operón de la histidina (His), esto será evidente al obtener crecimiento bacteriano en medios no suplementados con este aminoácido. Por otra parte, muchas sustancias adquieren su capacidad mutagénica al ser digeridas por enzimas hepáticas, por lo que el Test es también realizado con una mezcla de estas enzimas, para así conocer si la toxicidad de la sustancia es previa a la ingestión o posterior a la degradación/asimilación por parte del hígado en especímenes humanos y animales (34).

#### 5.4.1 Cepas de *Salmonella typhimurium* usadas en el Test de Ames

El género *Salmonella* spp. tiene como características generales en coloración de Gram ser un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo; por otra parte, este puede llegar a un organismo por medio de un alimento contaminado o en su defecto de agua contaminada; es decir, de forma oral por ingestión voluntaria o involuntaria (35). *Salmonella typhimurium* es el serotipo de *Salmonella* entérica subespecie entérica usada en el Test de Ames, la cual tiene cuatro modificaciones distintas en el operón de histidina (His +); aquellas cepas con las que se cuenta en el Laboratorio de Indicadores de Aguas y Lodos (LIAL) quienes poseen esta alteración son las cepas TA98, TA100; cabe resaltar que existen otras cepas como la TA97 y TA102, que a su vez presentan esta mutación. En la Tabla 1 se muestran las características de cada una de ellas.

Las cepas que se emplearán en el presente trabajo para llevar a cabo el Test de Ames son la TA98 y TA100. La primera (TA98) presenta una mutación de corrimiento de marco de lectura en el operón de la histidina *HIS-D3052*, y una reversión espontánea de 30-50 colonias/placa. Así mismo, la cepa TA100 presenta una mutación de sustitución de bases (G-C) en el operón de la histidina *HIS-G46*, y una reversión espontánea de 120-200 colonias/placa (1, 36).

En general, ambas cepas presentan mutaciones con respecto a la pared celular denominada *rfa* por medio de la cual se afecta la síntesis de polisacáridos esenciales para su construcción y a su vez la permeabilidad de la misma, permitiendo el paso de moléculas que presentan un elevado peso molecular como lo es el cristal violeta haciéndola sensible a este; también presentan la delección en el marcador *uvrB*, la cual está relacionada con una deficiencia en el sistema de reparación por escisión de bases, esta es evidenciada al no obtener crecimiento tras exponer las cepas a luz ultravioleta, un conocido mutágeno del ADN que impide la replicación celular, estas dos mutaciones hacen que la bacteria sea mucho más sensible a los agentes mutágenos. No menos importante, es el hecho que ambas

presentan el plásmido pKM101 que las hace resistente a la ampicilina, un antibiótico de amplio espectro (1, 36).

Debido a los marcadores genéticos anteriormente expuestos, el Test de Ames es una prueba rápida, económica y simple la cual permite el análisis de distintas muestras ya sean de origen ambiental, productos químicos, alimentos, medicamentos o agentes físicos (37). Así mismo, se reporta que el número de publicaciones por año en la década de 1980 en las cuales se mencionaba el uso del test de Ames fue de 500 trabajos y durante 1990-2010 se reportan más de 200 trabajos por año, considerándolo como uno de los ensayos más referenciados y empleados en estudios de mutagenicidad (38).

**Tabla 1.** Mutaciones y características genéticas de las cepas de *S. typhimurium* utilizadas en el Test de Ames (*Autores*)

<b>Cepa</b>	<b>Reversión Espontánea</b>	<b>Tipo de Mutación Presentada</b>	<b>Mutación en Pared Celular</b>	<b>Mutación en Operón de la Histidina</b>	<b>Plásmido</b>	<b>Mutación en Sistema de Reparación</b>	<b>Requerimientos Nutricionales</b>
<b>TA97</b>	90-180	Corrimiento del Marco de Lectura	Rfa	HIS-D6610	pKM101	uvrB	Histidina, Histidina + Biotina
<b>TA98</b>	30-50	Corrimiento del Marco de Lectura	Rfa	HIS-D3052	pKM101	uvrB	Histidina, Histidina + Biotina
<b>TA100</b>	120-200	Sustitución de Bases (GC)	Rfa	HIS-G46	pKM101	uvrB	Histidina, Histidina + Biotina
<b>TA102</b>	240-320	Sustitución de Bases: Transición y Transversión	Rfa	HIS-G428	pKM101 y pAQ1	No Presenta	Histidina, Histidina + Biotina

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo General

Evaluar la mutagenicidad generada por el uso del tanino modificado de *Acacia mearnsii* en un proceso de coagulación-floculación en aguas residuales por medio del test de Ames.

### 6.2 Objetivos Específicos

- Realizar una curva de crecimiento de las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, para obtener células viables en fase exponencial.
- Verificar la presencia de los marcadores genéticos de las cepas TA98 y TA100 necesarios para llevar a cabo el Test de Ames.
- Recolectar y procesar muestras de taninos modificados extraídos de *Acacia mearnsii mearnsii* empleado para el tratamiento de aguas residuales, con el fin de evaluar la mutagenicidad generada por este.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Obtención de la muestra

Inicialmente el grupo de investigación en Fotoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana adquirió el tanino de *Acacia mearnsii* comercial y se llevó a cabo su modificación mediante la Reacción de Mannich evaluando la concentración de la amina y el aldehído empleados para potenciar la actividad floculante de estos extractos vegetales. Para esto se llevó a cabo el procedimiento propuesto por Arismendi (2016), por medio del cual se realizan dos soluciones, la solución (A) la cual se prepara adicionando 10,5 mL de agua desionizada a 8,66 g del extracto de tanino de *Acacia mearnsii mearnsii*, y la solución (B) la cual contiene 3,8 g de cloruro de amonio, perlas de ebullición y 30 mL de formaldehído adicionados lentamente. Posteriormente, se agita suavemente y se coloca en un reflujo durante dos horas, una hora calentando a 300°C y otra hora a 500°C. Al finalizar el tiempo en el reflujo se mezcla la solución A y B, agitando a 900 rpm por 30 minutos a 70°C;

pasados los 30 minutos, se prepara una solución stock de 50.000 ppm con agua desionizada. Tras este proceso se llevó a cabo el Test de Jarras, que consiste en la simulación de un proceso de coagulación-floculación a escala de laboratorio en donde se evalúan distintas concentraciones del tanino modificado y se someten a condiciones de agitación constante, con el fin de evaluar distintos parámetros como lo son la disminución de turbidez, estabilidad del tanino a pH de 4, 7 y 9, remoción de color, de sólidos totales y de metales pesados (39).

Luego de determinar la concentración óptima del tanino modificado se escaló a un proceso empleando un mayor volumen de agua que contenía patrones de metales pesados de cobre, cromo, hierro, zinc y níquel, para conocer la concentración y el volumen de tanino que consigue reducir la concentración de estos en agua contaminada. Una vez conocidas estas concentraciones, se escaló el proceso de tratamiento a muestras de aguas residuales obtenidas del efluente de una industria. Este proceso consistió en adicionar volúmenes de 3, 6, 10 y 13 mL del tanino modificado a aproximadamente un litro del agua contaminada en un beaker, que se llevó a agitación continua por 6-8 horas. Al finalizar el tratamiento se determinó la concentración final de metales pesados por medio de cromatografía de extinción molecular y se comparó con los valores iniciales de estos para evaluar la efectividad del proceso.

El tanino modificado con una concentración de 250 ppm, 200 ppm y sin modificar fue analizado mediante el test de Ames, para evaluar la posible mutagenicidad de este.

## **7.2 Análisis de la Muestra**

Se realizó inicialmente una curva de crecimiento para las cepas TA98 y TA100 para determinar el tiempo óptimo en el cual estas se encuentran en fase exponencial. Posteriormente se realizó la comprobación de los marcadores genéticos (requerimiento de His-Biot, mutación en sistema de reparación *uvrB*, mutación en pared celular *Rfa* y plásmido de resistencia a antibióticos *pkM101*) de ambas cepas para asegurar la veracidad de los resultados obtenidos al llevar a cabo el test. Finalmente se procesaron las muestras de

mediante el test de Ames. Esto fue realizado según la metodología establecida por Maron & Ames (1983) y EPA-800/4-82-068 (1983) (36, 40).

Este análisis se realizó inicialmente a dos muestras de agua residual (una en presentación líquida y otra liofilizada), tratada con el tanino extraído de Acacia modificado a 250 ppm, obteniendo un IM de 0. La primera duda que surgió era si el tanino presentaba actividad citotóxica que generara la inhibición del crecimiento de las células y que al analizar un agua con contaminantes y tanino no se podía saber cuál de las sustancias eran causante de la mutagenicidad. Por esta razón se procedió a analizar solo el tanino modificado en tres muestras con concentración de 250 ppm. Así mismo, con el fin de determinar si el tanino puro o los componentes empleados para su modificación generaban mutagenicidad, se analizó una muestra de tanino modificado de 200 ppm en donde se diluyeron las concentraciones de cloruro de amonio y formaldehído, y una muestra de tanino sin modificar de 200 ppm, para un total de 7 muestras analizadas.

### **7.2.1 Curva de Crecimiento**

Se realizaron ensayos previos para la comprobación de marcadores genéticos y revertancia de las cepas TA98 y TA100 por un periodo de 12 horas según lo establecido en EPA-800/4-82-068 (1983), en los cuales no se obtuvieron resultados positivos al momento de observar el crecimiento en presencia de los tóxicos de referencia para la comprobación de revertancia. Por esta razón, se procedió a evaluar la cinética de crecimiento de las cepas de *Salmonella typhimurium*. Para ello, se partió de un vial criopreservado en DMSO (dimetil sulfóxido) a -80°C de las cepas TA98 y TA100. Inicialmente se reactivaron cultivando cada vial en 50 mL de caldo Nutritivo Oxoid® N°2; se tomó una muestra inicial (rotulada como hora cero) después de la inoculación del caldo para determinar la concentración celular inicial por medio de la medición de su absorbancia empleando técnicas espectrofotométricas a una longitud de onda de 610 nm. Seguidamente, se llevó a incubar a 37°C y 190 rpm, tomando una muestra de 3 mL cada dos horas para medir su absorbancia y realizar el recuento en placa de biomasa por medio de siembra en superficie en agar Nutritivo Oxoid N°2. La curva se llevó a cabo por 12 horas y se determinó que el tiempo en



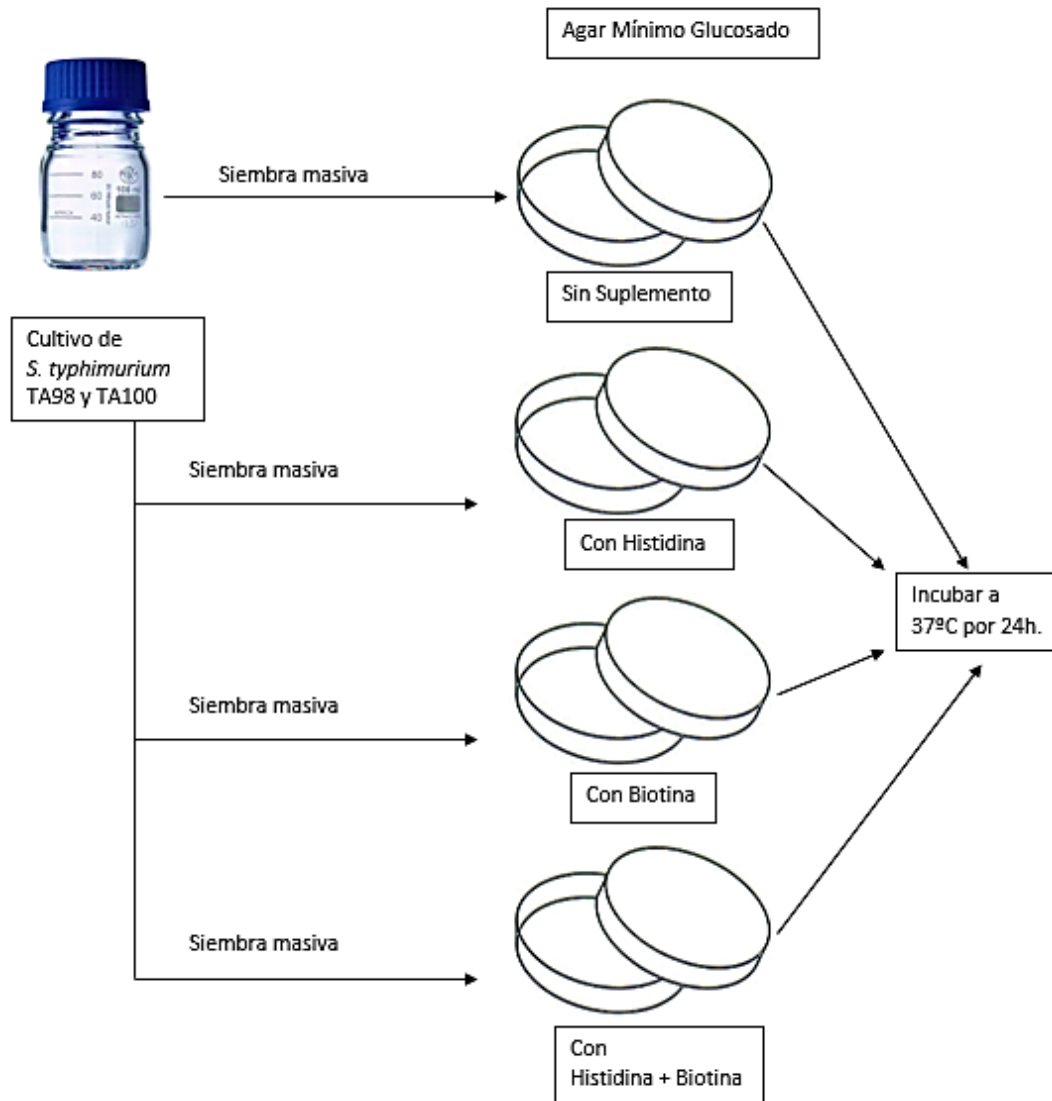
el cual ambas cepas alcanzan su fase exponencial y aseguran la viabilidad celular al momento de realizar la prueba de mutagenicidad fue a las 8 horas.

## **7.2.2 Verificación de los Marcadores Genéticos**

Previo a la aplicación del test de Ames a las muestras a analizar es necesario comprobar la presencia de los marcadores genéticos que aseguren la veracidad de los resultados obtenidos, estos son: requerimiento de histidina-biotina, sensibilidad a la luz ultravioleta y al cristal violeta, y resistencia a ampicilina.

### **7.2.2.1 Requerimiento Histidina-Biotina**

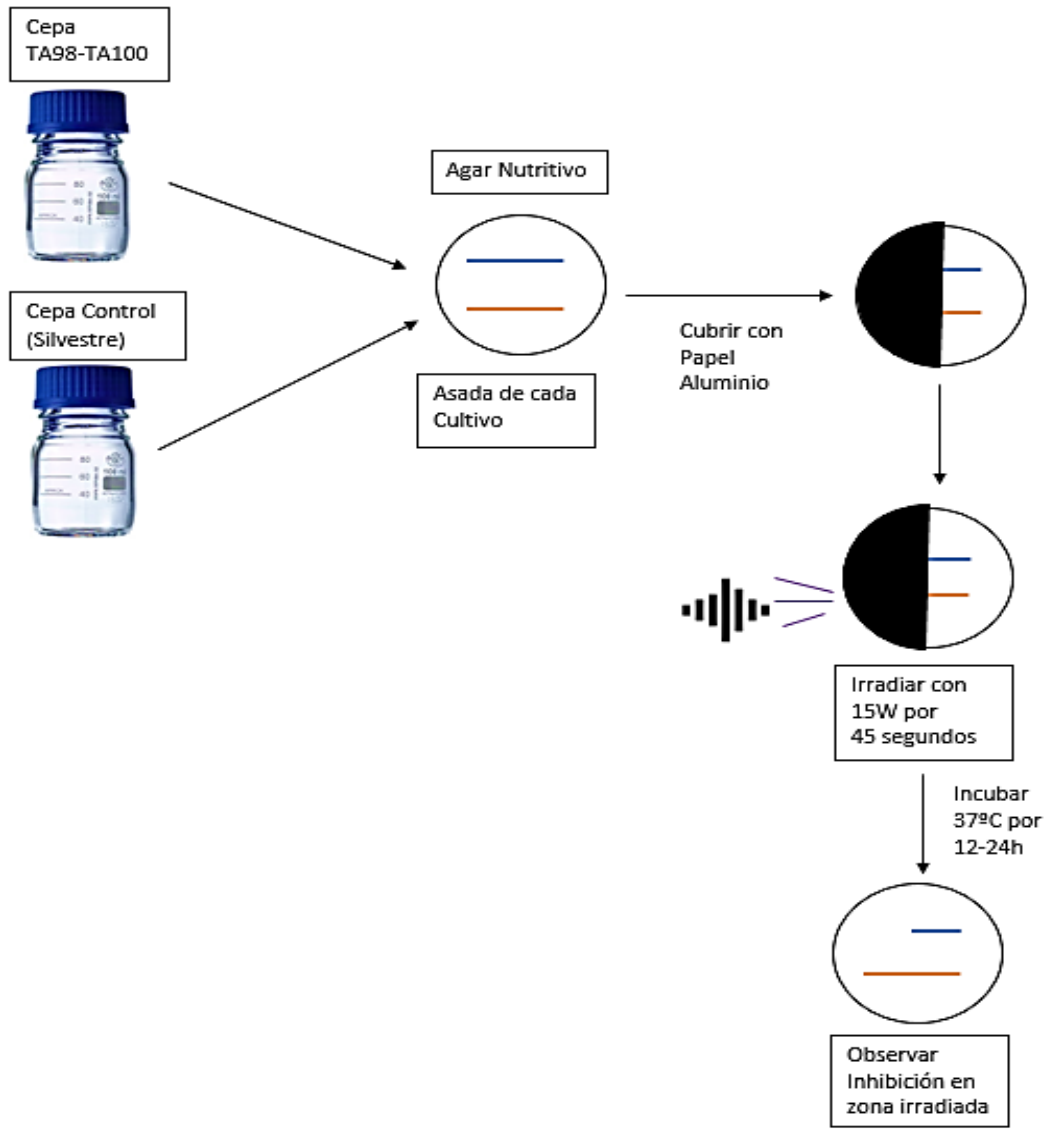
Para evidenciar la auxotrofia de histidina de las cepas debido a la mutación presentada en el operón de este aminoácido, se realizaron siembras masivas empleando hisopos estériles para cada una (TA98 y TA100) en medio mínimo con limitaciones nutricionales; el primero no contenía suplemento alguno (y por esto fue empleado como control negativo), el segundo estaba suplementado con una solución de L-Histidina, el tercero con una solución de D-Biotina y el cuarto con la mezcla de ambas soluciones; la prueba se realizó por triplicado y las cajas se llevaron a incubar por 24 horas a 37°C (Figura 2).



**Figura 2.** Metodología para la comprobación de requerimientos nutricionales de Histidina y Biotina (Autores)

### 7.2.2.2 Marcador *uvrB*

Para evidenciar la delección del marcador genético *uvrB*, el cual provee sensibilidad a la luz ultravioleta en ambas cepas, se expusieron las cajas de agar Nutritivo a radiación por luz UV por 45 segundos. Estas cajas contenían una estría de las cepas TA98 y TA100 donde la mitad de esta estaba cubierta con papel aluminio; después de la exposición a la luz ultravioleta, se incubaron a 37°C por 24 horas (Figura 3).

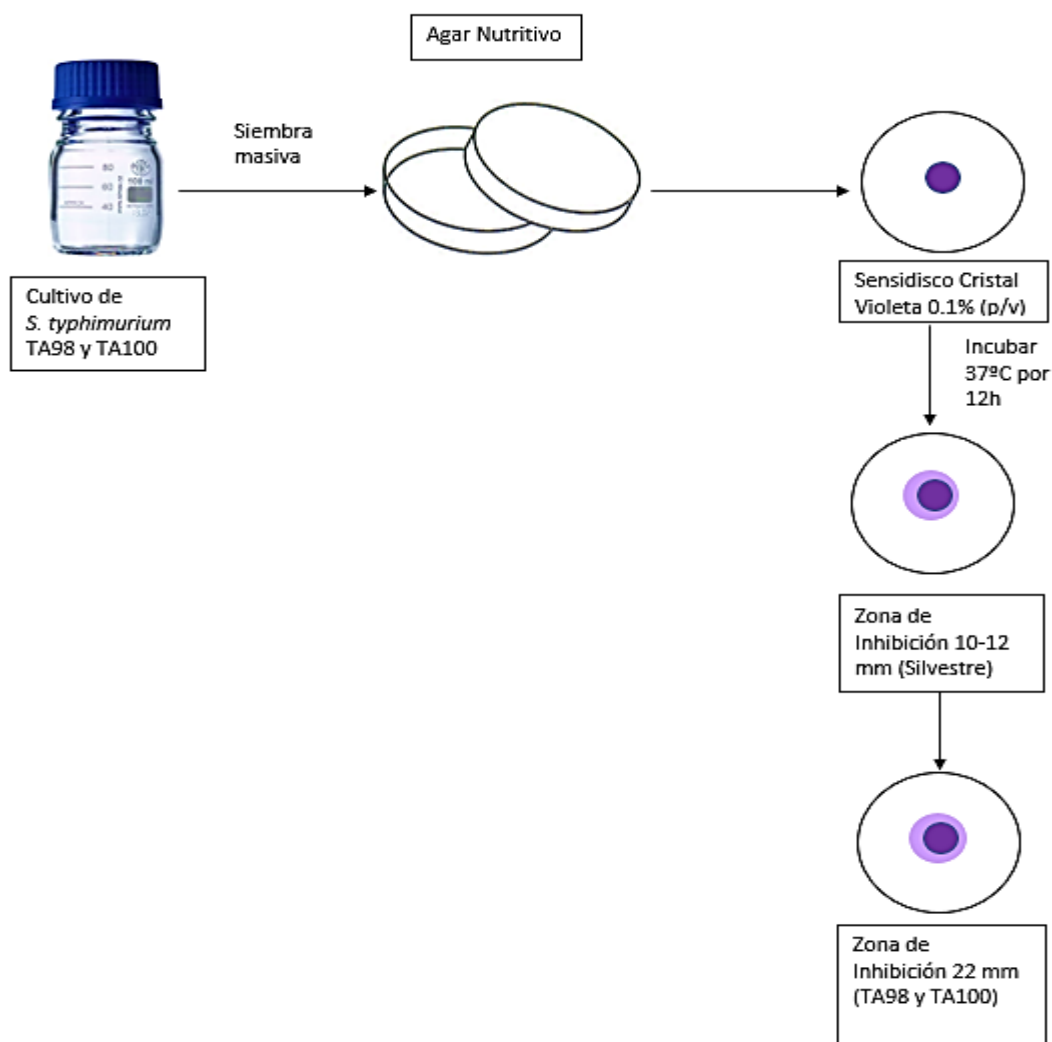


**Figura 3.** Metodología para la comprobación del marcador *uvrB* (Autores)

### 7.2.2.3 Mutación Rfa

La sensibilidad al cristal violeta es otorgada por la mutación Rfa que aumenta la permeabilidad de la pared celular ya que disminuye la concentración de lipopolisacáridos en la misma. Esta fue comprobada por medio de la siembra masiva de las cepas TA98 y TA100 en agar Nutritivo en las cuales se colocó un disco de papel filtro impregnado con 10  $\mu$ l de la solución de cristal violeta (al 0,1% p/v) en el centro de la caja. Se empleó como control una cepa de *Salmonella typhimurium* silvestre la cual presenta un menor diámetro

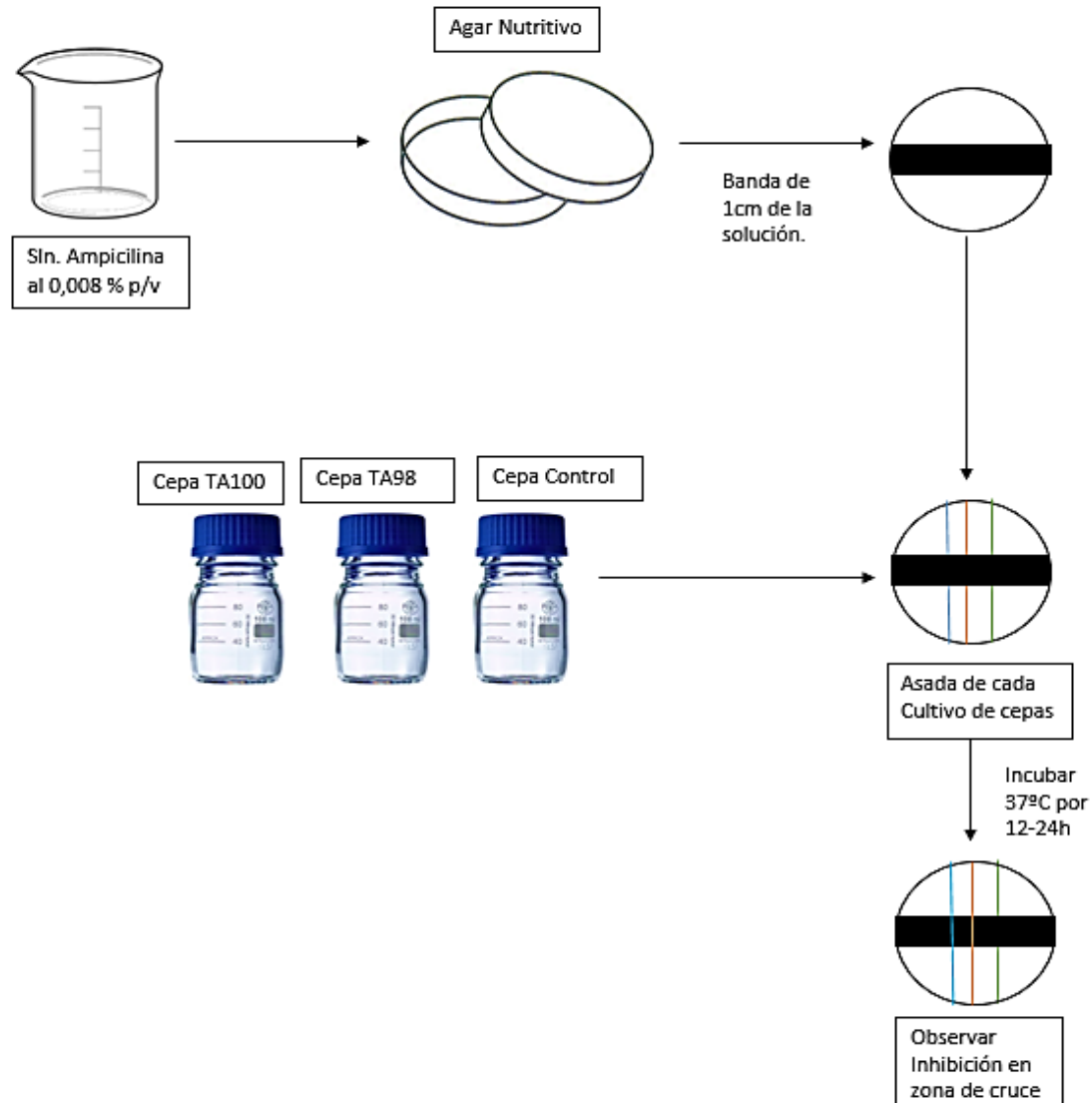
del halo de inhibición del crecimiento ocasionado por el cristal violeta; la prueba se realizó por triplicado y las cajas se incubaron por 24 horas a 37°C (Figura 4).



**Figura 4.** Metodología para la comprobación de la mutación Rfa (Autores)

#### 7.2.2.4 Plásmido pkM101

Para evidenciar la resistencia a la ampicilina otorgada por el plásmido pkM101 a ambas cepas, en agar Nutritivo se colocó una banda de aproximadamente 1 cm de grosor de la solución de ampicilina al 0,008 % p/v. Posterior a esto se realizó una estría perpendicular de las cepas TA98, TA100, y una cepa silvestre como control negativo, y se llevaron a incubar por 24 horas a 37°C (Figura 5).



**Figura 5.** Metodología para la comprobación de la presencia del plásmido pKM101 (*Autores*)

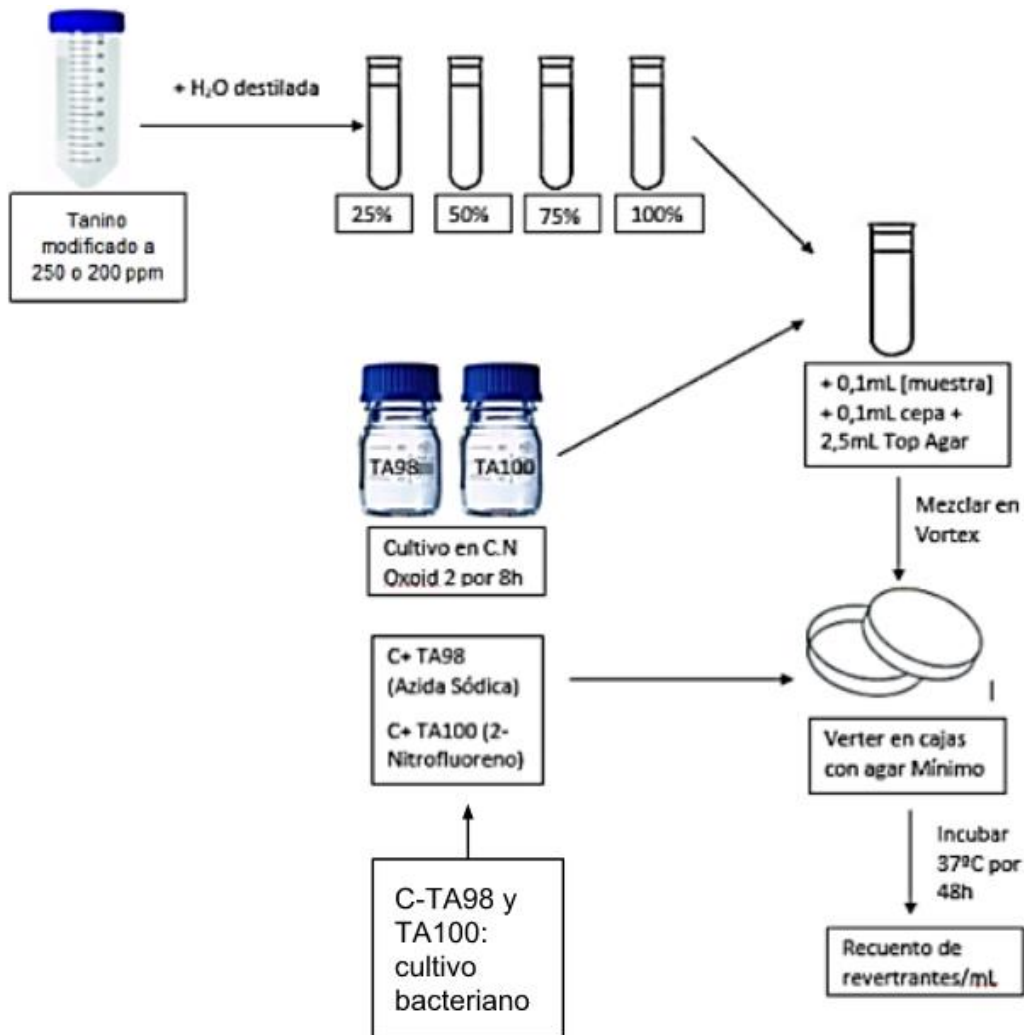
### 7.2.3 Procesamiento de Muestras

El procesamiento de las muestras iniciales de agua residual tratada con tanino modificado, así como de las muestras de tanino modificado a 250 ppm, a 200 ppm, y de la muestra de tanino sin modificar a 200 ppm, se realizó preparando concentraciones al 25%, 50%, 75%, 100% (% v/v), en las cuales se empleó agua destilada estéril como diluyente. Para el análisis de mutagenicidad de las muestras se reactivó un vial de las cepas TA98 y TA100 en 50 mL de caldo Nutritivo Oxoid® N°2 por medio de su incubación a 37°C y 190 rpm durante 8

horas. Al finalizar este periodo de tiempo se verificó la concentración celular por espectrofotometría y seguido a esto se adicionó 0,1 mL del cultivo de cada cepa en diferentes tubos, 0,1 mL de la muestra a evaluar y 2,5 mL de Top agar (4 tubos para TA98 y 4 tubos para TA100, es decir se empleó un tubo por concentración); se mezcló el contenido de los tubos empleando el vortex y se vertió el mismo en cajas de petri con agar Mínimo previamente servido, se homogeneizó y se colocó sobre una superficie plana para su enfriamiento. Adicional a esto se realizaron controles positivos empleando 2-Nitrofluoreno a una concentración de 7,5 µg/mL y Azida Sódica a una concentración de 0,0375 µg/mL para la cepa TA98 y TA100 respectivamente, y un control negativo en el cual solo se adicionó el cultivo celular y Top agar. Posterior a esto, se llevó a incubar a 37°C por 48 horas; los ensayos se realizaron por triplicado. Pasado el tiempo de incubación se realizó el conteo de colonias revertantes en cada placa inoculada, expresando cuantitativamente el número de colonias revertantes/mL por concentración de tanino presente en la muestra analizada, así como el índice de mutagenicidad (Figura 6).

**Tabla 2.** Resumen de las muestras procesadas, la concentración y diluciones realizadas a las mismas.

<b>Muestra</b>	<b>Concentración</b>	<b>Diluciones (% v/v)</b>
Agua residual tratada (liofilizada)	250 ppm	75, 50 y 25 %
Agua residual tratada (liquida)	250 ppm	75, 50 y 25 %
Tanino modificado (R1)	250 ppm	75, 50 y 25 %
Tanino modificado (R2)	250 ppm	75, 50 y 25 %
Tanino modificado (R3)	250 ppm	75, 50 y 25 %
Tanino modificado	200 ppm	75, 50 y 25 %
Tanino no modificado	200 ppm	75, 50 y 25 %



**Figura 6.** Metodología para el procesamiento de muestras (Autores)

### 7.2.3.1 Índice de Mutagenicidad

Con el fin de determinar la posible mutagenicidad de una sustancia Marón & Ames (1983), establecieron un Índice de Mutagenicidad o IM determinado empleando la (*Ec. 1*), en donde las revertantes inducidas corresponden a las colonias obtenidas al analizar las diferentes concentraciones de la muestra, y las revertantes espontáneas a las obtenidas en los controles positivos al emplear el tóxico de referencia para cada cepa. Al obtener un resultado mayor o igual a dos al calcularlo, se considera como mutagénica la sustancia o grupo de sustancias analizadas.

$$IM = \frac{\text{Revertantes Inducidas}}{\text{Revertantes Espontanes}}$$

Ec. 1

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

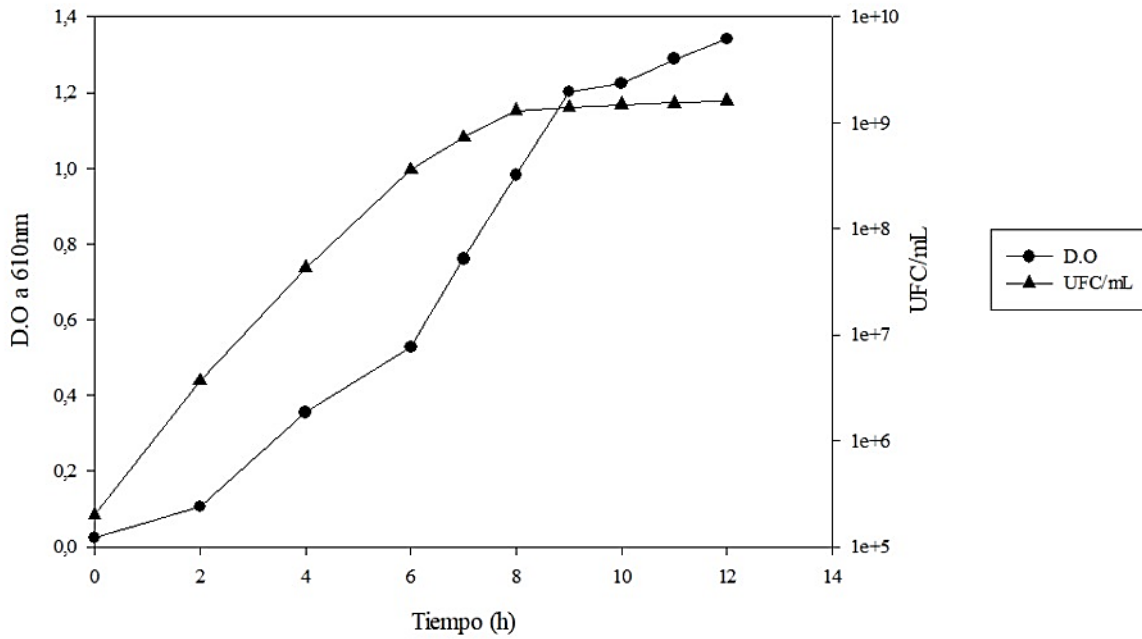
### 8.1 Curva de Crecimiento

Para determinar el tiempo de incubación al cual las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100 se encontraban en fase exponencial, se realizó una curva de crecimiento por 12 horas en una incubadora con agitación a 37°C y 190 rpm para ambas cepas. Los resultados obtenidos mostraron que la absorbancia medida a 610 nm para la cepa TA98 fue de 0,982 y para la cepa TA100 fue de 0,886 ambas a ocho horas de incubación como se muestra en la Tabla 3 y 4 y en las Figuras 7 y 8, en donde se muestra la absorbancia medida a 610 nm y el recuento en placa expresado como UFC/mL para cada cepa respectivamente. Con base en estos resultados se determinó el tiempo a emplear al momento de llevar a cabo el Test, ya que el cultivo se encontraba a una densidad celular entre  $1.3-2.5 \times 10^9$  UFC/mL lo que concuerda con lo establecido por Maron & Ames (1983) quienes mencionan que se debe contar con una concentración de entre  $1-2 \times 10^9$  UFC/mL para llevar a cabo el test.

**Tabla 3.** Resultados de la curva de crecimiento para la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*.

Tiempo (horas)	Absorbancia (610 nm)	UFC/mL
0	0,024	$2,00 \times 10^5$
2	0,106	$3,65 \times 10^6$
4	0,355	$4,30 \times 10^7$
6	0,526	$3,57 \times 10^8$
7	0,76	$7,28 \times 10^8$
8	0,982	$1,30 \times 10^9$
9	1,202	$1,40 \times 10^9$
10	1,224	$1,48 \times 10^9$
11	1,288	$1,53 \times 10^9$
12	1,404	$1,60 \times 10^9$

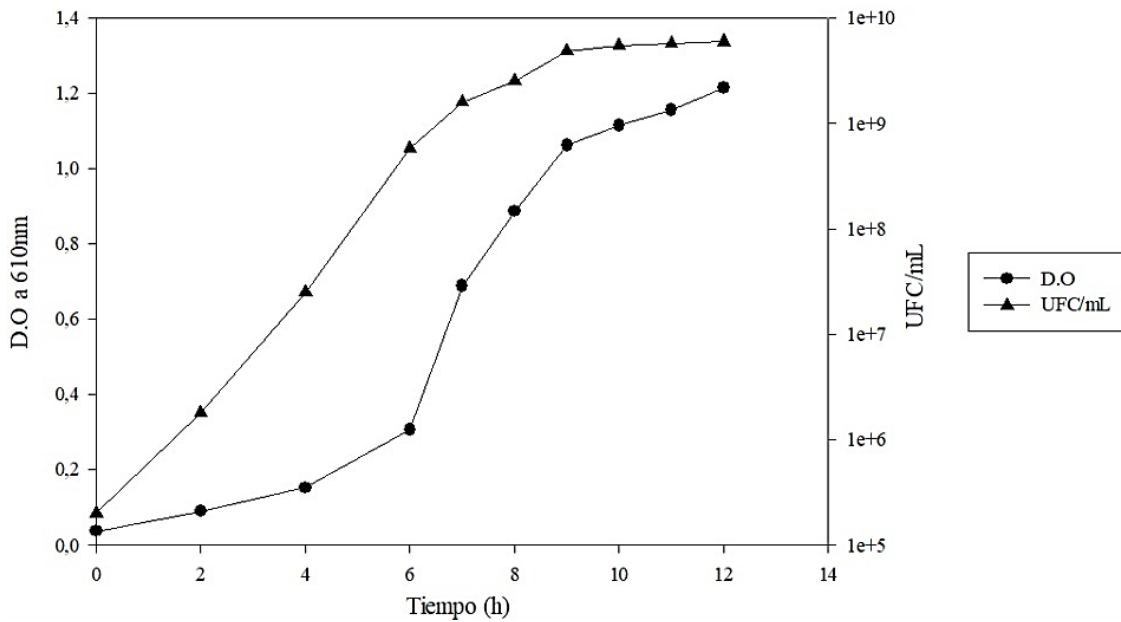




**Figura 7.** Curva de crecimiento para la cepa TA98 de *S. typhimurium*

**Tabla 4.** Resultados de la curva de crecimiento para la cepa TA100 de *Salmonella typhimurium*.

Tiempo (horas)	Absorbancia (610 nm)	UFC/mL
0	0,037	2,00 x10 <sup>5</sup>
2	0,09	1,80x10 <sup>6</sup>
4	0,152	2,50x10 <sup>7</sup>
6	0,306	5,80x10 <sup>8</sup>
7	0,689	1,59x10 <sup>9</sup>
8	0,886	2,52x10 <sup>9</sup>
9	1,062	4,90x10 <sup>9</sup>
10	1,114	5,50x10 <sup>9</sup>
11	1,156	5,80x10 <sup>9</sup>
12	1,214	6,00x10 <sup>9</sup>

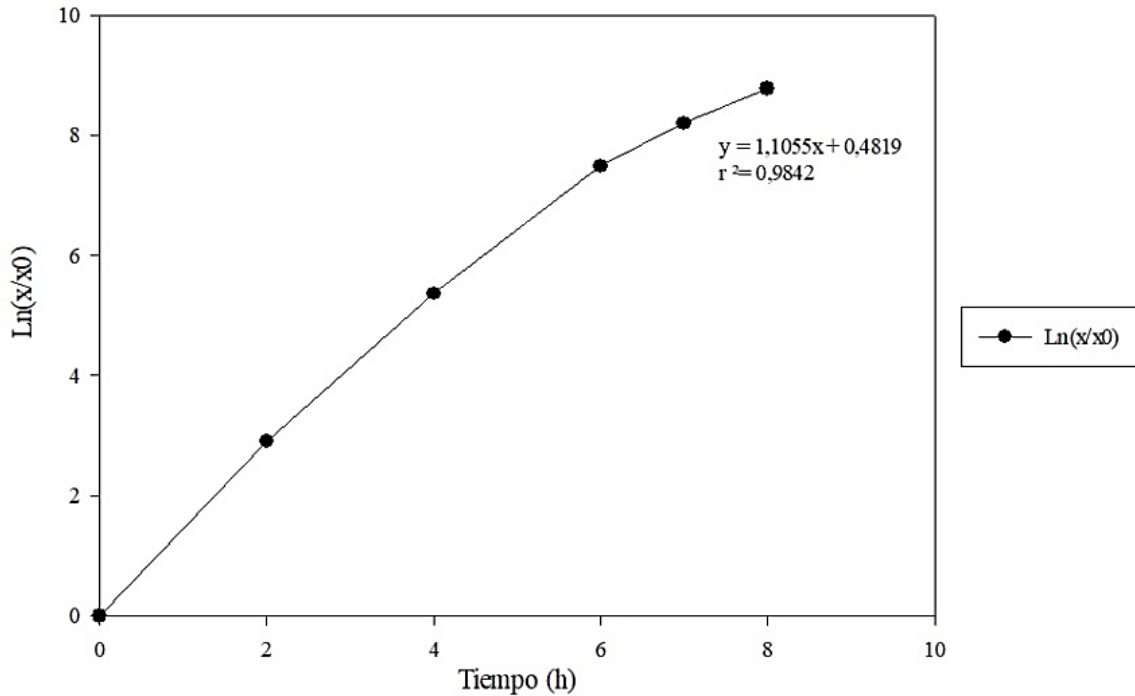


**Figura 8.** Curva de crecimiento para la cepa TA100 de *S. typhimurium*.

### 8.1.1 Parámetros Cinéticos

Luego de determinar la duración de la fase exponencial para ambas cepas (8 horas), se procedió a realizar la transformación o linealización de los datos de recuento en placa, expresados como UFC/mL, con el fin de determinar si estas cumplían orden 1 al presentar un coeficiente de correlación o  $R^2$  mayor o igual a 0,9000, esto para poder determinar parámetros cinéticos que permitieran comprender mejor el comportamiento de las cepas durante su cultivo en caldo nutritivo Oxoid N°2, así como la densidad celular alcanzada por cada una durante el periodo de doce horas de crecimiento al realizar dicha curva.

Para la cepa TA98 se representaron gráficamente los datos transformados ( $\ln(x/x_0)$ ) en función del tiempo y la respectiva ecuación de la recta en la Figura 9, en donde se observa como esta cumple cinética de orden uno al presentar un  $R^2$  de 0,9842; razón por la cual se procedió a determinar los parámetros cinéticos de velocidad específica de crecimiento ( $\mu_x$ ) y tiempo de duplicación (td), cuyos resultados se muestran en la Tabla 5.

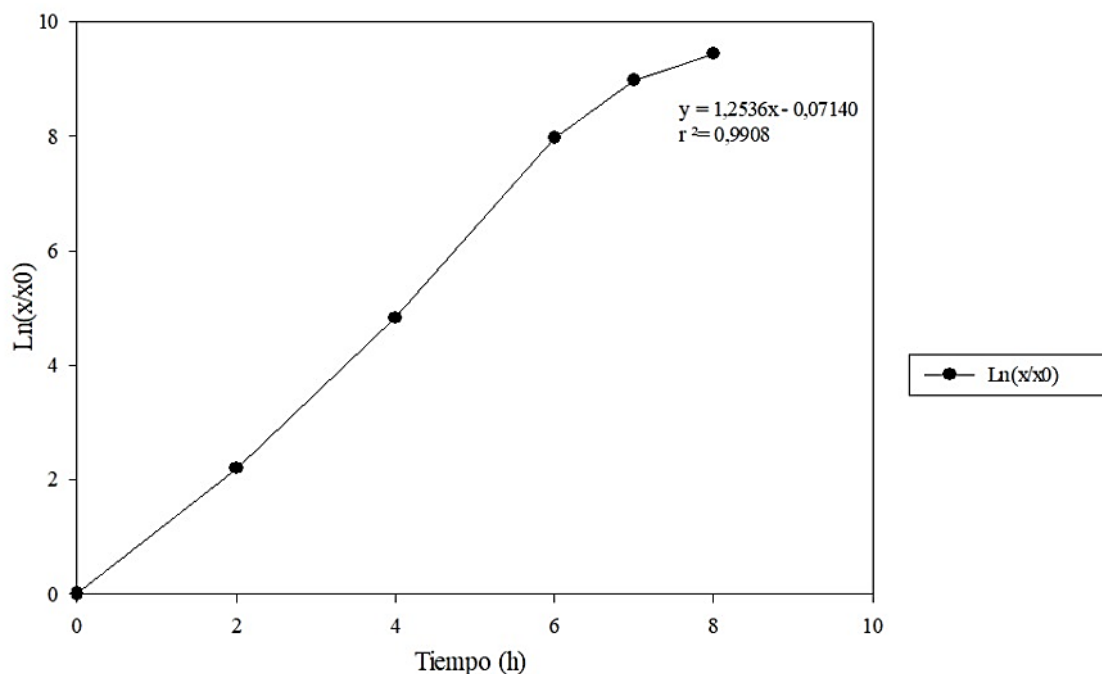


**Figura 9.** Gráfica de linealización de la fase exponencial de la cepa TA98.

**Tabla 5.** Resultados de los parámetros cinéticos determinados para la cepa TA98.

Parámetro	Resultado
Velocidad específica de crecimiento ( $\mu_x$ en $h^{-1}$ )	1,1055
Tiempo de duplicación (td en h)	0,627

Asimismo, para la cepa TA100 se representaron gráficamente los datos transformados ( $\text{Ln}(x/x_0)$ ) en función del tiempo y la respectiva ecuación de la recta en la Figura 10, en donde se observa como esta cumple cinética de orden uno al presentar un  $R^2$  de 0,9908; razón por la cual se procedió a determinar los parámetros cinéticos de velocidad específica de crecimiento ( $\mu_x$ ) y tiempo de duplicación (td), cuyos resultados se muestran en la Tabla 6. En donde se puede observar que  $\mu_x$  es mayor que el de la TA98 y por consiguiente su td es menor, significando esto que la cepa TA100 posee la capacidad de duplicarse celularmente en un menor tiempo y a una mayor velocidad durante cultivo en medio líquido.



**Figura 10.** Gráfica de linealización de la fase exponencial de la cepa TA100.

**Tabla 6.** Resultados de los parámetros cinéticos determinados para la cepa TA100

Parámetro	Resultado
Velocidad específica de crecimiento ( $\mu_x$ en $h^{-1}$ )	1,2536
Tiempo de duplicación (td en h)	0,5529

## 8.2 Verificación de los Marcadores Genéticos

### 8.2.1 Requerimientos His-Biot

Los resultados obtenidos tras evaluar la auxotrofia de histidina de las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium* se muestran en la Tabla 7. En esta se muestra la presencia o ausencia de crecimiento en medio mínimo no suplementado, suplementado con Histidina (0,1 M), suplementado con Biotina (0,05 mM) y suplementado con Histidina + Biotina. En esta se puede observar como el crecimiento fue mayor para ambas cepas en el medio suplementado con la solución de Histidina en comparación con el medio suplementado con

Biotina. Por otra parte, en el medio suplementado con Histidina y Biotina se evidenció un crecimiento masivo uniforme para ambas cepas, y en el medio sin suplemento no se observó crecimiento alguno, razón por la cual se confirma la mutación en el operón de la histidina que hace auxótrofas a las cepas TA98 y TA100 de este aminoácido, asegurando así la veracidad de los resultados obtenidos con el Test de Ames realizado.

**Tabla 7.** Resultados de los requerimientos nutricionales de las cepas TA98 y TA100 de *S. typhimurium*.

<b>Cepa</b>	<b>Mutación en el Operón de Histidina</b>	<b>Crecimiento en medio No Suplementado</b>	<b>Crecimiento en medio Suplementado con Biotina</b>	<b>Crecimiento en medio Suplementado con Histidina</b>	<b>Crecimiento en medio Suplementado con His+Biot</b>
TA98	hisD3052	No	Si*	Si	Masivo
TA100	hisG46	No	Si*	Si	Masivo

\*Hace referencia a un crecimiento del 50% menos del obtenido de forma masiva en medio suplementado con histidina

### 8.2.2 Marcador uvrB

Después de exponer las cajas de agar nutritivo inoculadas con un asada de las cepas TA98, TA100 y silvestre a luz UV cubriendo la mitad de la misma con papel aluminio, se obtuvo crecimiento en la cepa silvestre mas no en las cepas TA98 y TA100, confirmando así la mutación en el sistema de reparación por escisión de bases asociados a la mutación uvrB. Estos resultados se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Resultados de la presencia o ausencia del marcador uvrB.

<b>Cepa</b>	<b>Crecimiento en Zona Descubierta</b>
TA98	No
TA100	No

Silvestre	Si
-----------	----

### 8.2.3 Mutación Rfa

Esta mutación fue confirmada mediante la evaluación de los halos de inhibición de la siembra masiva de las cepas TA98 y TA100 en agar nutritivo al colocar un disco de papel filtro impregnado con la solución de cristal violeta (1 mg/mL) esperando obtener un halo de mínimo 14 mm. Estos resultados se muestran en la Tabla 9, donde se observa como la cepa silvestre no presenta inhibición alguna del crecimiento a diferencia de la cepa TA98 que presentó un halo de 16 mm y de la TA100 que a su vez presentó un halo de 22 mm, confirmando así la conservación de este marcador genético para ambas cepas.

**Tabla 9.** Resultados de la confirmación de la presencia de la mutación Rfa.

Cepa	Halo Inhibición
TA98	16 mm
TA100	22 mm
Silvestre	0 mm

### 8.2.4 Plásmido pkM101

La presencia del plásmido que le confiere resistencia a ampicilina a las cepas fue observada mediante el crecimiento de estas sobre una banda del antibiótico (8 mg/mL) en agar nutritivo, como se puede evidenciar en la Tabla 10. La cepa silvestre se mostró sensible al mismo, razón por la cual no se observó crecimiento al encontrarse en contacto con la banda de ampicilina.

**Tabla 10.** Resultados de la confirmación de la resistencia a ampicilina por la presencia del plásmido pKM101.

<b>Cepa</b>	<b>Resistencia a Ampicilina</b>
TA98	Presenta
TA100	Presenta
Silvestre	No Presenta

### **8.3. Muestras de Tanino de *Acacia mearnsii* Modificado**

Los resultados obtenidos al aplicar el test de Ames a las muestras de agua residual tratada con taino modificado a 250 ppm se muestran en las Tablas 11 y 12, las muestras de tanino modificado a 250 ppm y 200 ppm modificado empleando formaldehído (al 37%) y cloruro de amonio (grado químico) empleando la reacción de Manich (41), y de la muestra de tanino a 200 ppm sin modificarse se presentan en las Tablas 13, 14 y 15 respectivamente. En estas se muestra el número de colonias revertantes/mL y el Índice de Mutagenicidad (IM) con el que se considera mutagénica una sustancia al ser este mayor o igual a dos según lo establecido por Ames (1983).

En los resultados obtenidos para todas las muestras analizadas, se observó como las colonias de los controles positivos para ambas cepas se encuentran entre los rangos de revertancia establecidos por Ames *et al.* (1973), el cual para la cepa TA98 debe estar entre 20-50 y para la TA100 entre 120-200 revertantes/mL. Así mismo, en los controles negativos no se obtuvieron colonias revertantes lo que asegura la veracidad de los resultados obtenidos.

Para las muestras de agua residual tratadas con tanino modificado de *Acacia mearnsii* a 250 ppm (Tablas 8 y 9) no se obtuvieron colonias revertantes por lo tanto su IM fue de cero, esto pudo deberse a las trazas de compuestos previo al tratamiento no eliminados o a la

concentración del tanino empleado e incluso a la interacción de estos dos factores, lo cual ocasiono un efecto citotóxico y con esto se inhibió el crecimiento celular.

**Tabla 11.** Resultados del test de Ames a la muestra liofilizada de agua residual tratada con tanino extraído de *Acacia mearnsii* a una concentración de 250 ppm y modificado empleando la reacción de Mannich.

Cepa	Concentración de la Muestra en ppm	Revertantes/mL	IM
TA98	C+	62	-
	C-	0	-
	250 (100%)	0	0
	187,5 (75%)	0	0
	125 (50%)	0	0
	62,5 (25%)	0	0
T100	C+	202	-
	C-	0	-
	250 (100%)	0	0
	187,5 (75%)	0	0
	125 (50%)	0	0
	62,5 (25%)	2098	12,95

- Entiéndase como IM no calculado por ser control positivo o negativo



**Tabla 12.** Resultados del Test de Ames a la muestra líquida de agua residual tratada con tanino extraído de *Acacia mearnsii* a una concentración de 250 ppm y modificado empleando la reacción de Mannich.

Cepa	Concentración de la Muestra en ppm	Revertantes/mL	IM
TA98	C+	50	-
	C-	0	-
	250 (100%)	0	0
	187,5 (75%)	0	0
	125 (50%)	0	0
	62,5 (25%)	0	0
T100	C+	196	-
	C-	0	-
	250 (100%)	0	0
	187,5 (75%)	0	0
	125 (50%)	0	0
	62,5 (25%)	0	0

- Entiéndase como IM no calculado por ser control positivo o negativo

Por otra parte, para las tres réplicas de la muestra de tanino modificado a 250 ppm (Tabla 13), se observó que en las concentraciones de 25%, 50% y 75% (%v/v) se obtuvo un IM mucho mayor a dos para ambas cepas, lo que indica que la sustancia evaluada, es decir, el tanino extraído de *Acacia mearnsii* modificado es altamente mutagénico; por otra parte, la muestra pura (concentración de 100% v/v) no presentó colonias revertantes/mL y por lo tanto su IM fue cero.

**Tabla 13.** Resultados del test de Ames para las tres replicas evaluadas de la muestra de tanino extraído de *Acacia mearnsii* a una concentración de 250 ppm y modificado empleando la reacción de Mannich.

Cepa	Concentración de la Muestra en %v/v	Revertantes/mL			IM		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3
TA98	C+	36	39	41	-	-	-
	C-	0	0	0	-	-	-
	250 (100%)	0	0	0	0	0	0
	187,5 (75%)	712	823	756	19,78	21,10	18,44
	125 (50%)	1448	1625	1268	40,22	41,67	30,93
	62,5 (25%)	1936	2084	1892	56,67	53,43	46,15
T100	C+	162	133	145	-	-	-
	C-	0	0	0	-	-	-
	250 (100%)	0	0	0	0	0	0
	187,5 (75%)	828	851	924	5,1	6,40	6,37
	125 (50%)	1392	1312	1278	8,59	9,86	8,81
	62,5 (25%)	2098	2327	1920	12,95	17,49	13,24

- Entiéndase como IM no calculado por ser control positivo o negativo

Para la muestra de tanino modificado a 200 ppm (Tabla 14) se obtuvieron colonias revertantes en todas las concentraciones de este, aunque el IM para ninguna fue mayor o igual a dos lo cual indica que esta no presenta mutagenicidad; al evaluar la muestra en donde el tanino no fue modificado (Tabla 15), no se obtuvieron colonias revertantes en ninguna concentración y por lo mismo el IM en todas fue igual a cero, esto indica que el tanino puro no es mutagénico.

**Tabla 14.** Resultados del test de Ames a la muestra de tanino extraído de *Acacia mearnsii* a una concentración de 200 ppm y modificado empleando la reacción de Mannich.

Cepa	Concentración de la Muestra en ppm	Revertantes/mL	IM
TA98	C+	39	-
	C-	0	-
	200 (100%)	20	0,513
	150 (75%)	31	0,795
	100 (50%)	52	1,333
	50 (25%)	58	1,487
T100	C+	127	-
	C-	0	-
	200 (100%)	30	0,236
	150 (75%)	38	0,299
	100 (50%)	54	0,425
	50 (25%)	63	0,496

- Entiéndase como IM no calculado por ser control positivo o negativo

**Tabla 15.** Resultados del test de Ames a la muestra de tanino extraído de *Acacia mearnsii* a una concentración de 200 ppm sin modificar empleando la reacción de Mannich.

Cepa	Concentración de la Muestra en %v/v	Revertantes/mL	IM
TA98	C+	39	-
	C-	0	-
	200 (100%)	0	0
	150 (75%)	0	0
	100 (50%)	0	0
	50 (25%)	0	0
T100	C+	127	-
	C-	0	-
	200 (100%)	0	0
	150 (75%)	0	0
	100 (50%)	0	0
	50 (25%)	0	0

- Entiéndase como IM no calculado por ser control positivo o negativo

El Test de Ames ha sido ampliamente utilizado para determinar si los compuestos de un producto a base de extractos vegetales o químicos que tendrá contacto con seres humanos o animales presentan algún tipo de toxicidad y por lo tanto podría ocasionar problemas de salud. Este es el caso de los productos empleados para la potabilización de efluentes de agua residual, entre los cuales cabe resaltar los coagulantes-floculantes que actúan en la primera etapa de este proceso (41). Actualmente para este proceso se emplean compuestos como sales de sulfato de aluminio y sulfato férrico, de las cuales se ha reportado que su acumulación sumada a patrones hereditarios puede ocasionar problemas neurológicos y

degenerativos como lo son el Alzheimer y el Parkinson (5, 8, 42). Por esta razón se ha buscado reemplazar estas sustancias por otras de origen natural, entre las cuales cabe mencionar el alginato de sodio extraído de algas marinas, extractos de las semillas de *Moringa oleífera*, almidón y celulosa a base de desechos post cosecha y taninos extraídos de corteza de especies vegetales entre otros (21).

El grupo de Investigación en Fitoquímica del Departamento de Química de la Pontificia Universidad Javeriana ha desarrollado un biofloculante a base de taninos extraídos de *Acacia mearnsii* modificados empleando cloruro de amonio y formaldehído (mediante la reacción de Mannich como se mencionó anteriormente), para potenciar su actividad coagulante y floculante, pero sin conocer la toxicidad que este podría generar. Por esta razón, se evaluaron las tres réplicas de la muestra de tanino modificado de *Acacia mearnsii* a 250 ppm, de tanino modificado de *Acacia mearnsii* a 200 ppm y de tanino no modificado de *Acacia mearnsii* a 200 ppm empleando el test de Ames. Así mismo, el biofloculante se evaluará en el modelo vegetal *Lactuca sativa* (inhibición del crecimiento radicular), el modelo animal *Daphnia magna* (porcentaje de mortalidad) y el modelo bacteriana *Vibrio fischeri* (disminución de la actividad bioluminiscente), ensayos realizados en el trabajo de grado titulado “Evaluación de la toxicidad del tanino modificado (*Acacia mearnsii* *mearnsii*) utilizado para el proceso de coagulación-floculación en aguas”.

Se han desarrollado diversos estudios de la efectividad del uso de extractos de las diferentes especies pertenecientes al género *Acacia* al emplearse como coagulante floculante, ya sea en procesos de remoción de metales pesados, colorantes, eliminación de materia orgánica, trazas de surfactantes, coloides en suspensión, entre otros componentes que impiden la correcta potabilización del agua (43, 44, 45, 46).

Heredia *et al.* (2011) modificaron taninos extraídos de *Acacia mearnsii* empleando cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) y formaldehído por medio de la reacción de Mannich, la cual le atribuye al tanino una carga catiónica. Los investigadores evaluaron el efecto del pH final de la mezcla para conocer si está inactiva o altera las propiedades de coagulante del tanino modificado. Así mismo, al evaluar su efectividad en el tratamiento de aguas residuales y

superficiales, y efluentes con restos de colorantes y/o surfactantes, se obtuvo una remoción de más del 85% de colorantes antraquinónicos como Alizarin Violet 3R y azoicos como el Acid Red 88, y valores de eliminación entre 30-70% de surfactante empleando dosis de 100 ppm del coagulante-floculante modificado. De igual forma, la reducción total de turbidez de aguas superficiales fue alcanzada con una dosis de 25 ppm del tanino modificado y de 100 ppm para el agua residual. Compararon también la efectividad de este nuevo coagulante-floculante con los ya existentes como lo son el Tanfloc, Aquafloc, extractos de semillas de moringa y Alumbre, obteniendo valores de más del 50% de efectividad comparado con el coagulante químico Alumbre (41).

Hameed *et al.* (2016) quienes compararon la efectividad del biofloculante comercial modificado de *Acacia mearnsii* (Tanfloc®) con el coagulante-floculante químico PAC o Hidroxicloruro de Aluminio, actualmente empleado para el tratamiento de aguas residuales y la potabilización de estas en modelos a escala laboratorio y en una planta piloto, observaron que al adicionar dosis iguales de ambos coagulantes-floculantes (35 ppm) la remoción de turbidez total para el Tanfloc fue de 95% mientras que para el PAC fue de entre 80% y 85% de remoción de sólidos totales empleando Tanfloc y de 60% empleando PAC, confirmando así la efectividad del tratamiento de efluentes contaminados empleando biofloculantes. Así mismo, el tamaño de los flóculos obtenidos con el biofloculante fue de 144 micrones a diferencia de los obtenidos con el sintetizado químicamente de 96 micrones, generando un mayor tiempo de sedimentación de estos y haciendo más efectivo el proceso de coagulación-floculación (47). Esto confirma el uso de este tanino como reemplazo de los coagulantes químicos existentes y empleados actualmente en los procesos de tratamiento de agua debido a su efectividad en la remoción de distintos contaminantes.

Con lo expuesto anteriormente, se demuestra la efectividad de este extracto vegetal en una parte del proceso de potabilización del agua. Sin embargo, es necesario evaluar por medio del test de Ames si este genera o no efectos tóxicos, mutágenicos, carcinogénicos o citotóxicos en quienes consuman el agua tratada que presente residuos de este biofloculante. Alice *et al.* (1991) evaluaron los componentes de fitoterapéuticos comercializados en Brasil por medio de este test con el fin de determinar la existencia o no

de toxicidad y consiguiente mutagenicidad de estos; entre los compuestos de las 37 especies vegetales analizadas se encontraban los taninos con una prevalencia del 58% sobre otros compuestos como los alcaloides, flavonoides y esteroides. Los resultados obtenidos por los investigadores no arrojaron resultados positivos de colonias revertantes al emplear las cepas TA98 y TA100 de *S. typhimurium* exceptuando dos especies de plantas evaluadas, *Baccharis anomala* y *Luehea divaricata*, las cuales contenían el porcentaje más alto de flavonoides en su composición. (48). De igual forma, Bresolin y Vargas (1993) emplearon el test de Ames para evaluar el efecto mutagénico de taninos y flavonoides presentes en extractos vegetales de interés medicinal; cabe resaltar que solo un espécimen presenta taninos en su composición y este no presentó mutagenicidad, es decir, no se obtuvieron colonias revertantes en ausencia de histidina, a diferencia de los otros extractos ricos en flavonoides cuyas tasas de revertancia se encontraron entre 643-2870 revertantes/placa. Con estos resultados los investigadores concluyeron que los flavonoides son los causantes del efecto tóxico/mutagénico de estos extractos (49). Estos reportes aportan los datos de seguridad necesarios para emplear productos naturales derivados de extractos vegetales puros o modificados para procesos de potabilización.

La evaluación de la posible toxicidad por medio del test de Ames de biofloculantes que contengan taninos modificados de *Acacia mearnsii* no se encuentran ampliamente desarrollado. Sin embargo, Eldeen *et al.* (2005) evaluaron el efecto antimicrobiano, antiinflamatorio y el posible potencial mutagénico de diez especies vegetales empleadas en medicina tradicional africana, entre las cuales se encuentran dos especies de Acacia (*A. nilotica* y *A. sieberiana*); los extractos de hojas, raíces y corteza/tallo presentaron altas concentraciones de taninos y otros compuestos como lo son los alcaloides, flavonoides y ácidos orgánicos no definidos. Estos fueron sometidos al test de Ames empleando la cepa TA98, y no se presentó ninguna colonia revertante/mL al llevar a cabo la técnica de doble capa en agar mínimo sin suplemento de histidina, confirmando así que los extractos de esta especie vegetal no presentan ningún efecto mutagénico. Además, los extractos evaluados presentaron actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*, así como actividad antiinflamatoria en modelos *in vivo* (50).

Burnett *et al.* (2007) realizaron estudios de un extracto de *Scutellaria baicalensis* y *Acacia catechu* para evaluar si estos contienen componentes citotóxicos o mutagénicos empleando el test de Ames y pruebas *in vivo* en animales; los resultados obtenidos al llevar a cabo el Test mostraron que la combinación de estos dos extractos naturales no presentaban ningún tipo de mutagenicidad al emplear las cepas TA98, TA100 y TA102, lo cual fue evidenciado con la no obtención de colonias revertantes/placa en medios carentes de histidina, así como por la disminución de más del 85% de crecimiento de colonias en medios suplementados sugiriendo que los extractos no presentaron efectos tóxicos y a su vez reducen las tasas de mutagenicidad naturales de estas cepas. Cabe resaltar que las pruebas *in vivo* tampoco arrojaron resultados positivos pues los roedores estudiados no presentaron cambios de comportamiento ni morfológicos; es decir, alteración del peso y/o talla (51). Se ha reportado que los extractos de *Acacia mearnsii* (específicamente los taninos presentes en estos), contienen actividad antitumoral, anticarcinogénica, antiinflamatoria, antioxidante y antigenotóxica; esta última evidenciada al reducir el crecimiento de colonias revertantes de las cepas TA97, TA98, TA100 y TA102 al someter estos extractos al test de Ames en medios suplementados con histidina y realizar pruebas en modelos murinos que presentaban sintomatología asociada al desarrollo tumoral y presencia de muerte celular por estrés oxidativo (52, 53, 54). Estos estudios confirman que el tanino presente en *Acacia mearnsii* y sus diferentes especies no genera mutagenicidad al evaluarlo empleando el test de Ames.

Los resultados obtenidos experimentalmente al procesar las tres réplicas de la muestra de tanino modificado a 250 ppm mostraron un gran número de colonias revertantes/mL e Índices de Mutagenicidad mucho mayores a dos (Tabla 13); estos pudieron ser ocasionados por la concentración de las sustancias empleadas al momento de modificar el tanino de *Acacia mearnsii*, es decir, por el cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) y el formaldehído ( $\text{CH}_2\text{O}$ ). Con respecto a este último, se ha reportado la aparición de alteraciones cromosomales, daños puntuales a nivel celular (alargamiento del núcleo, defectos en los centrómeros y en los microtúbulos), efectos mutagénicos o genotóxicos en estudios realizados en células de mamíferos (55). De igual forma, diversos estudios realizados han demostrado que la



exposición prolongada a formaldehído o el contacto con altas dosis de este ocasiona la aparición de cáncer nasofaríngeo y leucemia mieloide (56, 57, 58, 59). El cloruro de amonio ha sido denominado como una de las sales de amonio que ocasionan el síndrome del coma hepático en ratones, conejos y perros; este se encuentra estrechamente relacionada con las concentraciones de iones y de gas de amonio en la sangre al atravesar la barrera cerebral por vía sanguínea (60). De igual forma, el contacto prolongado con el cloruro de amonio ocasiona irritaciones cutáneas y de las vías respiratorias, lo que puede conllevar a una crisis asmática y posterior asfixia; así mismo, el contacto prolongado con este puede ocasionar problemas renales y acidosis metabólicas generando oxidación acelerada de aminoácidos y por consiguiente denaturación proteica generalizada. A pesar de que no se encuentra determinado el riesgo directo de aborto al tener contacto con esta sal de amonio durante el embarazo, se reporta que puede ocasionarse acidosis materna en los dos primeros términos del desarrollo del feto esto se encuentra regulado por el pH así como por los niveles de esta sal en sangre (61, 62, 63, 64).

El test de Ames ha sido también empleado para determinar si esta sustancia química (formaldehído) es causante de mutagenicidad al revertir la mutación que hace auxótrofas de histidina a las cepas TA98 y TA100 usadas para el desarrollo de este; Takahashi *et al.* (1985) llevaron a cabo una caracterización de las propiedades mutagénicas del formaldehído empleando diferentes sistemas bacterianos, entre los cuales cabe resaltar el uso de las cepas TA98 y TA100 por medio del Test de Ames. Los investigadores obtuvieron entre 800 y 1000 colonias revertantes/placa al emplear concentraciones entre 0,5-1  $\mu\text{mol/placa}$ , concluyendo que la mutagenicidad de este compuesto es directamente proporcional con la dosis a la cual se exponga (65). Así mismo, Connor *et al.* (1985) realizaron un estudio de la composición química del aire contenido en diferentes *mobile homes* o trailers en Texas, encontrando la prevalencia de 19 sustancias predominando entre ellas el formaldehído; emplearon de igual forma diferentes estudios con modelos bacterianos para determinar si estos compuestos eran perjudiciales para la salud de quienes habitaban estas viviendas, utilizando el Test de Ames con las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium*. Obtuvieron resultados positivos al emplear concentraciones entre 200 y 500  $\mu\text{g/placa}$ , y confirmaron nuevamente que la tasa de mutagenicidad del

compuesto es proporcional a la dosis de este, pues a dosis inferiores de 200  $\mu\text{g}$  con la cepa TA98 no se observaron colonias revertantes y por lo tanto no se obtuvo mutagenicidad (66).

De igual forma, Voogd *et al.* (1981) y Haack *et al.* (2001) evaluaron la posible mutagenicidad de compuestos aromáticos nitrosos e hidroxilaminas y de epóxidos alifáticos respectivamente; para esto llevaron a cabo el test de Ames empleando las cepas TA98 y TA100 y sintetizaron los compuestos a analizar mediante cloruro de amonio y sus derivados. De las catorce hidroxilaminas aromáticas, seis arrojaron resultados de hasta 850 colonias revertantes con dosis de 100  $\mu\text{g/placa}$  para la cepa TA98 y 1378 colonias revertantes con la misma dosis para la cepa TA100. De los trece compuestos nitrosos, cuatro arrojaron resultados de hasta 896 revertantes de la cepa TA98 y de hasta 1200 revertantes de la cepa TA100 ambas con dosis de 20  $\mu\text{g/placa}$ . Cabe resaltar que dosis mayores de 100  $\mu\text{g/placa}$  ocasionaron muerte celular completa, razón por la cual a concentraciones de 500  $\mu\text{g/placa}$  no se obtuvo crecimiento alguno. Por otra parte, 6 de los 36 epóxidos analizados arrojaron resultados positivos para mutagenicidad al emplear la cepa TA100 (con y sin activación metabólica empleando la fracción S9 de hígado de ratón) al emplear concentraciones de 0,001 moles/L, con la cual se obtuvieron 1668 revertantes/placa, con 5 y 1 g/L se obtuvieron 267 y 293 revertantes/placa. Adicionalmente, reportaron que los resultados obtenidos con la fracción S9 y sin esta no presentaron diferencias estadísticamente significativas (67, 68).

Igualmente, Hayashi *et al.* (1988) llevaron a cabo experimentos *in vitro* e *in vivo* para determinar si 39 aditivos consumibles y 8 productos químicos eran mutagénicos y por lo tanto nocivos para el ser humano; entre estos se encontraba el cloruro de amonio. El test de Ames fue llevado a cabo como test *in vitro* y la prueba de micronúcleos en ratones como test *in vivo*, para el primero se reporta únicamente que la prueba fue positiva sin mencionar el número de colonias revertantes/mL y para el segundo se reporta una prueba negativa en la cual los ratones no presentaron alteraciones; esto puede deberse a que al ser ingerida o entrar en contacto con organismo, este activa una cascada enzimática con el fin de inactivar o eliminar la sustancia suministrada (69).

Los resultados de los reportes anteriormente presentados confirman que las trazas de cloruro de amonio y formaldehído pueden ser las responsables de la mutagenicidad obtenida tras realizar el test de Ames y no propiamente del extracto vegetal de *Acacia mearnsii*, lo que concuerda con los resultados obtenidos experimentalmente en donde para las tras réplicas de la muestra de 250 ppm de tanino modificado se obtuvieron índices de mutagenicidad entre 5-67 y recuentos de entre 712 y 2327 colonias revertantes/mL al analizar concentraciones del 25, 50, 75% (%v/v). Como se observó en las tablas de resultados anteriormente mostradas, ninguno de los tres análisis arrojó resultados positivos al procesar las muestras puras o con una concentración de tanino del 100% (%v/v); esto puede deberse a que las altas concentraciones de los posibles compuestos mutagénicos impiden el crecimiento de colonias y por lo tanto la mutación que genera la revertancia (36). También puede deberse a que los compuestos mutagénicos empleados para modificar el tanino de *Acacia mearnsii* pueden poseer efecto citotóxico, lo que ocasiona la muerte celular por inhibición del metabolismo microbiano y por lo tanto no se observa crecimiento (70, 71).

Al analizar la muestra de tanino modificado a una concentración de 200 ppm en donde se disminuyeron las cantidades de sulfato de amonio y formaldehído empleadas para modificarlo, se obtuvieron colonias revertantes en todas las diluciones evaluadas y así mismo no se obtuvo ningún IM mayor a dos, con lo que se puede concluir que la disminución de las concentraciones de las sustancias con las cuales se modifica el tanino genera como resultado final un posible compuesto no mutagénico. De igual forma, al analizar la muestra de tanino sin modificar a 200 ppm no se obtuvieron colonias revertantes, confirmando así que el formaldehído y el cloruro de amonio, es decir, las sustancias empleadas para modificar y así potenciar la actividad coagulante-floculante del tanino, son las causantes de la mutagenicidad detectada por medio del test de Ames y no el tanino por sí solo.

## 9. CONCLUSIONES

- Las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium* presentan los marcadores genéticos necesarios para llevar a cabo el Test de Ames. Así mismo, se determinó un periodo de incubación de ocho horas a 37°C y 190 rpm para obtener una concentración de entre  $1-2 \times 10^9$  células viables en fase exponencial para llevar a cabo el test.
- El tanino extraído de *Acacia mearnsii* es mutagénico y citotóxico en concentraciones de 250 ppm al ser modificado con formaldehído y cloruro de amonio, pero no a 200 ppm al diluir estas sustancias.
- Se observó que el tanino por si solo no presenta mutagenicidad alguna, lo que potencia su posible uso en procesos de tratamiento y potabilización de aguas residuales.

## 10. RECOMENDACIONES

- Se sugiere analizar las muestras empleando otros modelos biológicos (batería de bioensayos), para obtener resultados que proporcionen más datos acerca de la posible toxicidad del tanino al momento de utilizarlo en el tratamiento o depuración de aguas residuales.
- Se sugiere analizar un mayor número de muestras relacionadas tanto a las diferentes concentraciones del tanino modificado como de las sustancias modificantes (formaldehído y cloruro de amonio).
- Se sugiere analizar la interacción entre aguas residuales que presenten metales pesados y el tanino modificado para determinar si poseen la capacidad de disminuir o aumentar la capacidad coagulante-floculante.

## 11. BIBLIOGRAFIA

1. Ames BN, Lee FD, Durston WE. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 70(3):782-6, 1973

2. OMS. Agua. World Health Organization. [citado el 14 de septiembre de 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs391/es/>
3. Ng JC, Wang J, Shraim A. A global health problem caused by arsenic from natural sources. *Chemosphere*. 52(9):1353–9, 2003.
4. Lopez Monsalve J. Evaluación del Potencial Mutagénico del Rio Boque en la Población del Corregimiento de Monterrey Causada por la Minería del Oro Mediante el Test de Ames [Pregrado]. *Pontificia Universidad Javeriana*. 2016.
5. Flatten T. Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water. *Brain Research Bulletin*. 55(2):187-196, 2001.
6. Gauthier E, Fortier I, Courchesne F, Pepin P, Mortimer J, Gauvreau D. Aluminum forms in drinking water and risk of Alzheimer's disease. *Environ Res*. 84(3):234-46, 2000.
7. Arismendi W, Delgado C, Lugo L. Aplicación de taninos crudos y modificados para el tratamiento de aguas residuales industriales como sistema de bio-remediación de metales pesados. *SIAP*. 1-14, 2017.
8. Eastmond D, Hartwig A, Anderson D, Anwar W, Cimino M, Dobrev I, Douglas G, Nohmi T, Phillips D, Vickers C. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. *Mutagenesis*. 24(4): 341–349, 2009.
9. Castañeda Lugo D. Remoción de metales pesados en el proceso de coagulación-floculación de aguas residuales industriales mediante el uso del tanino modificado de *Acacia mearnsii* [Pregrado]. *Pontificia Universidad Javeriana*. 2017.

10. Wright J, Gundry S, Conroy R. Household drinking water in developing countries: a systematic review of microbiological contamination between source and point-of-use. *Tropical Medicine and International Health*. 9(1):106-117, 2004.
11. Rodríguez Fernández A, Letón García P, Rosal García R, Dorado Valiño M, Villar Fernández S, Sanz García J. Tratamientos Avanzados de Aguas Residuales Industriales. *CITME*. 2, 2006.
12. Sadri S, Alavi M, Arami M. Coagulation/flocculation process for dye removal using sludge from water treatment plant: Optimization through response surface methodology. *Journal of Hazardous Materials*. 175(1-3):651-657, 2010.
13. Shak P.Y, Wu, T.Y. Coagulation-flocculation treatment of high-strength agroindustrial wastewater using natural *Cassia obtusifolia* seed gum: treatment efficiencies and flocs characterization. *Chemical Engineering Journal*. 256: 293–305, 2014.
14. Bolton G. Polielectrolitos orgánicos en el tratamiento de aguas. *Agua Res*. 41: 2301-2324, 2007.
15. Çebi A. Acrylamide Intake, Its Effects on Tissue and Cancer: Acrylamide in Food. Analysis, Content and Potential Health Effects. *Academic Press of London*. 5, 2016.
16. Degrémont A. Water treatment handbook. *Rueil-Malmaison: Degrémont S.A*. 6, 1991.
17. Okuda T, Baes A, Nishijima W, Okada M. Isolation and characterization of coagulant extracted from moringa oleifera seed by salt solution. *Water Research*. 35(2):405-410, 2001.

18. Brestskaya S, Schwarz S, Chernovetsky D. Comparative study of humic acids flocculation with chitosan hydrochloride and chitosan glutamate. *Water Research*. 38(12):2955-2961, 2004.
19. Renault F, Sancey B, Charles J, Morin-Crini N, Badot P, Winterton P, Crini G. Chitosan for coagulation/flocculation processes, an eco-friendly approach. *European Polymer Journal*. 45 1337–1348, 2004.
20. Lee C, Robinson J, Chong M. A review on application of flocculants in wastewater treatment. *Process Safety and Environmental Protection*. 92(6):489-508, 2014.
21. Yin C. Emerging usage of plant-based coagulants for water and wastewater treatment. *Process Biochem*. 45: 1437–1444, 2010.
22. Diaz Ortega C. Estudio de la reacción entre  $\beta$ -(4-hidroxifenil) etilaminas y aldehídos no enolizables [Magíster en Ciencias-Química]. *Universidad Nacional de Colombia*, 2014.
23. Roussy J, Chastellan P, Van Vooren M, Guibal E. Treatment of ink-containing wastewater by coagulation/flocculation using biopolymers. *Water S.A.* 31 (3): 369-376, 2007.
24. Özacar M, Şengil A. Evaluation of tannin biopolymer as a coagulant aid for coagulation of colloidal particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 229 (1-3): 85-96, 2003.
25. Sherry S. The black wattle (*Acacia mearnsii* the Wild.). *University of Natal Press, Pietermaritzburg*. 1971

26. Beltrán J, Sánchez J. Removing heavy metals from polluted surface water with a tannin-based flocculant agent. *Journal Of Hazardous Materials*. 165(1-3): 1215-1218, 2009.
27. Beltrán J, Sánchez J, Gómez MC. New coagulant agents from tannin extracts: Preliminary optimisation studies. *Chemical Engineering Journal*. 162(3): 1019-1025, 2010.
28. Beltrán J, Sánchez J, Delgado R, Bustos J. La eliminación de alizarina Violet 3R (tinte antraquinónicos) a partir de soluciones acuosas mediante coagulantes naturales. *Diario de materiales peligrosos*. 170: 43-50, 2011.
29. Zuluaga M, Valencia A, Ortiz I. Efecto genotóxico y mutagénico de contaminantes atmosféricos. *Medicina UPB*. 2009.
30. Lewis R. Human genetics: Concepts and applications. *Mcgraw-Hill International edition*. 2007.
31. Griffiths A, Wessler S, Carroll S, Doebley J. Introduction to genetic analysis. New York, 7, 2000.
32. Tomasetti A, Vogelstein J. Most Cancer Mutations Are Due to Random DNA Copying 'Mistakes'. *Oncology Times*. 39(8): 57-58, 2017.
33. Ramírez P, Mendoza A. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. *SEMARNAT*. 1, 2008.
34. Watson J, Baker T, Bell S, Gann A, Levine M, Losick R. Biología molecular del gen. *Editorial Médica Panamericana*. 1; 2016.



35. Mellado M, Jarne V, Arteaga M, Abínzano L. Diarrea crónica por *Salmonella typhimurium* en paciente inmunocompetente. *Anales Sis San Navarra*. 39(1): 139-141, 2016.
36. Maron D, Ames B. Revised methods for the salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*. 173-215, 1983.
37. MacGregor J, Casciano D, Muller L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. *Mutation research*. 3-20, 2000.
38. Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation research*, pp. 29-60, 2000.
39. Arismendi W. Evaluación y comparación de la capacidad floculante de taninos modificados (quebracho, acacia, castaño) y su aplicación en el tratamiento de aguas residuales. *Pontificia Universidad Javeriana*. 2016.
40. Williams L, Preston J. Interim procedure for conducting Salmonella/microsomal mutagenicity assay (Ames Test). *Environmental monitoring systems*, EPA-800/4-82-068, 1983.
41. Heredia J, Martín J, Davila J. Optimization of the synthesis of a new coagulant from a tannin extract, *Journal of Hazardous Materials*. 186:1704–1712, 2011.
42. Altmann P, Cunningham J, Dhanesha U, Ballard M, Thompson J, Marsh F. Disturbance of cerebral function in people exposed to drinking water contaminated with aluminium sulphate: retrospective study of the Camelford water incident. *BMJ* .319: 807-811, 1999.

43. Beltrán J, Sánchez J, Gómez MC. *Acacia mearnsii* the Wild Tannin-Based Flocculant in Surface Water Treatment. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. 29(2): 119-135, 2009.
44. Bongiovani M, Camacho F, Coldebella P, Valverde K, Nishi L, Bergamasco R. Removal of natural organic matter and trihalomethane minimization by coagulation/flocculation/filtration using a natural tannin, *Desalination and Water Treatment*. 57(12): 5406-5415, 2015.
45. Beltrán J, Sánchez J, & Solera C. Anionic Surfactants Removal by Natural Coagulant/Flocculant Products. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 48. 5085-5092, 2009. DOI: 10.1021/ie801913y.
46. Asrafuzzaman M, Fakhruddin A, Hossain M. Reduction of Turbidity of Water Using Locally Available Natural Coagulants. *ISRN Microbiology*. 6:32-89, 2011.
47. Hameed Y, Idris A, Hussain S, Abdullah N. A tannin-based agent for coagulation and flocculation of municipal wastewater: Chemical composition, performance assessment compared to Polyaluminum chloride, and application in a pilot plant. *Journal of Environmental Management*, 184(3): 494-503, 2016.
48. Alice C, Vargas V, Silva G, de Siqueira N, Schapoval E, Henriques A. Screening of plants used in south Brazilian folk medicine. *Journal Of Ethnopharmacology* [serial on the Internet]. 35(2): 165-171, 1991.
49. Bresolin S, Ferrão Vargas V. Mutagenic potencies of medicinal plants screened in the ames test. *Phytotherapy Research*. 7(3):260-262, 1993.
50. Eldeen I, Elgorashi E, van Staden J. Antibacterial, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and mutagenic effects of extracts obtained from some trees used in

- South African traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(3): 457-464, 2005.
51. Burnett, P, Silva S, Mesches M, Wilson S, Jia Q. Safety evaluation of a combination, defined extract of *Scutellaria baicalensis* and *Acacia catechu*. *Journal of Food Biochemistry*. 31: 797-825, 2007.
52. Bouhlel I, Kilani S, Skandran I, Ben Ammar R, Nefatti A, Laporte F, Hininger-Favier I, Ghedira K, Chekir-Ghedira L. *Acacia mearnsii* salicina extracts protect against DNA damage and mutagenesis in bacteria and human lymphoblast cell K562 cultures, *Nutrition Research*. 28(3): 190-197, 2008.
53. Kamaljit K, Saroj A, Michael E. Hawthorne, Swayamjit K, Subodh K, Rajendra G. M. A correlative study on antimutagenic and chemopreventive activity of *Acacia mearnsii auriculiformis* a. Cunn. And *Acacia nilotica* (L.) WILLD. EX DEL, *Drug and Chemical Toxicology*, 25(1): 39-64 2002.; 2008.
54. Burnett B, Jia Q, Zhao Y, Levy R. A Medicinal Extract of *Scutellaria baicalensis* and *Acacia catechu* acts as a Dual Inhibitor of Cyclooxygenase and 5-Lipoxygenase to Reduce Inflammation. *Journal of Medicinal Food*. 10(3): 442-451, 2003.
55. Yun Xin L, Cellular and mutagenic effects of formaldehyde in mammalian cells. *Scholar Archive*. 635; 2005.
56. Hauptmann M, Lubin J, Stewart P, Hayes R, Blair A. Mortality from lymphohematopoietic malignancies among workers in formaldehyde industries. *J Natl Cancer Inst*. 95: 1615-1623, 2003
57. Zhang L, Tang X, Rothman N, Vermeulen R, Ji Z, Shen M, Qiu C, Guo W, Liu S, Reiss B, Freeman L, Ge Y, Hubbard A, Hua M, Blair A, Galvan N, Ruan X, Alter B, Xin K, Li S, Moore. Occupational exposure to formaldehyde, hematotoxicity,

- and leukemia-specific chromosome changes in cultured myeloid progenitor cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers*. 19: 80-88, 2008.
58. Hayes R, Blair A, Stewart P, Herrick F, Mahar H. Mortality of U.S. embalmers and funeral directors. *Am J Ind Med*. 18: 641-652, 1990.
59. Monticello T, Swenberg J, Gross E, Leininger J, Kimbell J, Seilkop S, Starr T, Gibson J, Morgan K. Correlation of regional and nonlinear formaldehyde-induced nasal cancer with proliferating populations of cells. *Cancer Res*. 56: 1012-1022, 1996.
60. Warren K. The Differential Toxicity Of Ammonium Salts. *Journal of Clinical Investigation*. 37(4): 497-501, 1958.
61. NJ Health. Hoja Informativa Sobre Sustancias Peligrosas: Cloruro de Amonio [Internet]. 2nd ed. New Jearsey: *NJ Department of Health*; 2016. Available from: <https://www.nj.gov/health/eoh/rtkweb/documents/fs/0093sp.pdf>
62. Reaich D, Channon S, Scrimgeour C, Goodship T. Ammonium chloride-induced acidosis increases protein breakdown and amino acid oxidation in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 263(4): E735-E739, 1992.
63. Goodlin R, Kaiser I. The effect of ammonium chloride induced maternal acidosis on the human fetus at term: I. pH, hemoglobin, blood gases. *The American Journal of the Medical Sciences*. 233(6): 662-675, 1957.
64. Chesley L. The effect of ammonium chloride induced maternal acidosis on the human fetus at term: II. Electrolytes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 76(4): 924-936, 1958

65. Takahashi K, Kawazoe Y, Morita T. Mutagenic characteristics of formaldehyde on bacterial systems. *Mutation Research/Genetic Toxicology*. 156(3): 153-161; 1985.
66. Connor T, Theiss J, Hanna H, Monteith D, Matney T. Genotoxicity of organic chemicals frequently found in the air of mobile homes. *Toxicology Letters*. 25(1): 33-40; 1985.
67. Voogd C, van der Stel J, Jacobs J. The mutagenic action of aliphatic epoxides. *Mutation Research/Genetic Toxicology*. 89(4): 269-282, 1981.
68. Haack T, Erdinger L, Boche G. Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 of nitroso and respective hydroxylamine compounds. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 491(1-2): 183-193, 2001.
69. Hayashi M, Kishi M, Sofuni T, Ishidate M. Micronucleus tests in mice on 39 food additives and eight miscellaneous chemicals. *Food and Chemical Toxicology*. 26(6): 487-500, 1988.
70. Baumstark-Khan C, Rode A, Rettberg P, Horneck G. Application of the Lux-Fluoro test as bioassay for combined genotoxicity and cytotoxicity measurements by means of recombinant *Salmonella typhimurium* TA1535 cells. *Analytica Chimica Acta*. 437(1): 23-30, 2001.
71. Quillardet P, de Bellecombe C, Hofnung M. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: validation study with 83 compounds. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*. 147(3): 79-95, 1985.