



**GENOTOXICIDAD Y MUTAGENICIDAD EN AGUAS RESIDUALES DE LA
CURTIEMBRE SAN FAUSTINO, (CÚCUTA) NORTE DE SANTANDER,
COLOMBIA.**

GREILA PAOLA QUINTERO SALAMANCA

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y QUÍMICA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PAMPLONA, COLOMBIA**

2022

**GENOTOXICIDAD Y MUTAGENICIDAD EN AGUAS RESIDUALES DE LA
CURTIEMBRE SAN FAUSTINO, (CÚCUTA) NORTE DE SANTANDER,
COLOMBIA.**

GREILA PAOLA QUINTERO SALAMANCA

**Tesis presentada para optar al título de
Magíster en Química**

Director:

Mg. IVÁN MELÉNDEZ GÉLVEZ

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y QUÍMICA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PAMPLONA, COLOMBIA
2022**

DEDICATORIA

Dedicada a dos seres que no se encuentran con nosotros...

A mi estimado Dr. Alfonso Quijano, quien fue mi profesor y tutor, agradezco su asesoramiento, guiándome con sus conocimientos, consejos, afecto y respaldo.

Lo recordaré siempre por ese gran optimismo y energía que irradiaba y levantaba el ánimo a cualquiera.

Mi más inmenso respeto, admiración y aprecio.

Y, a mi estrella fugaz en la tierra, quien en su corta existencia me colmó de inigualable amor, a ti hijo, que me diste esperanzas, sueños y posibilidades.

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos especiales al Mg. Iván Meléndez, director de esta tesis, por brindarme su valiosa orientación, su gran disposición, su tiempo, paciencia y comprensión; quien me motivó a seguir adelante y sin su apoyo no hubiera sido posible esta tesis.

A mis profesores, personas de inmensa sabiduría quienes no sólo me han brindado sus conocimientos, sino se han esforzado por ayudarme e incentivarme a llegar al punto donde me encuentro.

A la Universidad de Pamplona, la cual abrió sus puertas para formarme y facilitarme sus instalaciones para la realización de la investigación.

A mi madre, por la confianza, paciencia, comprensión y amor.

Muchas personas han colaborado en el proceso y conclusión de esta tesis; hermanas, familiares, amistades y compañero de vida, gracias por alentarme a culminar este trabajo.

RESUMEN

Las industrias curtiembres impactan nocivamente el ecosistema por las considerables cantidades de residuos orgánicos y tóxicos que generan, tales como sales y metales pesados; siendo estos últimos, altamente tóxicos, según la IARC (International Agency for Research on Cancer) por inducir efectos mutagénicos y genotóxicos en los seres humanos.

La problemática se presenta por el mal manejo de los desechos, debido a la falta de cultura en la preservación y cuidado de los recursos naturales, la desinformación y la no concientización de las secuelas que se generan, siendo una de las más relevantes que este recurso hídrico contaminado puede llegar a ser usado indiscriminadamente por la población; por tal motivo se hace necesario estimar el impacto ambiental generado. La importancia de este estudio radica en que los desechos de curtiembres ubicadas en la ciudad de Cúcuta, pueden llegar al río Pamplonita, y contaminarlo con metales pesados, como lo reportan estudios realizados en las aguas de desecho de la curtiembre Tasajero.

En este estudio se identificaron los metales pesados (Cr, Pb, Cd, Fe, Zn, Cu) presentes en el agua residual proveniente de la curtiembre San Faustino (Cúcuta), utilizando la técnica de espectroscopia de absorción atómica; encontrándose concentraciones perjudiciales para el ser humano. Se determinó genotoxicidad, usando el ensayo cometa y mutagenicidad, a través del test de Ames, con las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100. Se encontró que las aguas de desecho de la curtiembre San Faustino, provocan daño al ADN en linfocitos humanos; de igual manera, se halló que estas aguas inducen un incremento en la mutagenicidad.

ABSTRACT

The leather tanning industries impacts harmfully the ecosystem by the considerable amounts of organic and toxic waste they generate, such as salts and heavy metals; being the last ones, highly toxic, according to the IARC (international agency for researching on cancer) because it induces mutagenic and genotoxic effects in humans.

The problem is presented by the poor management of waste, in addition to the lack of culture in the preservation and the environmental care, the lack of information and not being aware of the consequences that are generated, being one of the most relevant this contaminated water resource can be used indiscriminately by the population; for this reason, it is necessary to estimate the environmental impact generated. The importance of this study lies on the possibility of heavy metals arriving to the Pamplonita River, and contaminate it, due the tanneries waste from Cúcuta, as the results made over wastewater of Tasajero tannery show.

In this study we identified the heavy metals (Cr, Pb, Cd, Fe, Zn, Cu) present in the wastewater from San Faustino leather tanning industries y Cúcuta city, using the atomic absorption spectroscopy technique; concentrations are found to be harmful to humans. Genotoxicity was determined, using the comet assay and mutagenicity, through the Ames test, with the strains of *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. It was found that wastewater from San Faustino leather tannery causes DNA damage in human lymphocytes; similarly, it was found that these waters induce an increase in mutagenicity.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	6
TABLA DE CONTENIDO.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABLAS.....	10
LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. OBJETIVO GENERAL.....	14
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3. MARCO REFERENCIAL.....	15
3.1. CURTIEMBRE.....	15
3.1.1. PROCESO DE LA CURTIEMBRE.....	15
3.1.1.1. PRE TRATAMIENTO Y ALMACENAMIENTO.....	16
3.1.1.2. RIBERA.....	16
3.1.1.3. CURTIDO.....	19
3.1.1.4. RECURTIDO, TEÑIDO Y ENGRASE (RTE).....	27
3.1.1.5. ACABADOS.....	29
3.2. IMPACTO AMBIENTAL DE LAS CURTIEMBRES.....	29

3.2.1. PRINCIPALES IMPACTOS AMBIENTALES DE LAS INDUSTRIAS CURTIEMBRES.....	30
3.2.1.1. USO INEFICIENTE DEL AGUA.....	31
3.2.1.2. GRAN CANTIDAD DE RESIDUOS.....	31
3.2.1.3. LA ETAPA DE TERMINACIÓN.....	31
3.2.1.4. INADECUADA DISPOSICIÓN DE RESIDUOS.....	32
3.2.1.5. UTILIZACIÓN DE SUSTANCIAS QUÍMICAS.....	32
3.3. NORMATIVIDAD PARA CURTIEMBRES.....	33
3.3.1. RESOLUCIÓN 0631 DE 2015.....	33
3.3.2. DECRETO 1207 DE 2014.....	34
3.3.3. RESOLUCIÓN 0330 DE 2017.....	34
3.3.4. AGENCIA DE PROTECCIÓN AMBIENTAL (EPA).....	34
3.3.5. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS).....	34
3.4. ANTECEDENTES DE INDUSTRIAS CURTIEMBRES.....	35
3.4.1. ANTECEDENTES DE CURTIEMBRES A NIVEL INTERNACIONAL.....	36
3.4.2. ANTECEDENTES DE CURTIEMBRES A NIVEL NACIONAL.....	36
3.4.3. ANTECEDENTES DE CURTIEMBRES A NIVEL REGIONAL.....	39
3.5. METALES PESADOS.....	40
3.5.1. CLASIFICACIÓN DE LOS METALES PESADOS.....	40
3.5.2. IMPACTO DE LOS METALES PESADOS.....	41
3.5.3. CROMO.....	42
3.5.3.1. IMPACTO DEL CROMO.....	44
3.6. MUTAGENICIDAD.....	46
3.6.1. ANTECEDENTES DE MUTAGENICIDAD.....	48

3.6.2. TEST DE AMES.....	50
3.6.2.1. INDICE DE MUTAGENICIDAD.....	52
3.7. GENOTOXICIDAD.....	52
3.7.1. ENSAYO COMETA.....	53
3.8. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA (EAA).....	55
4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	56
4.1. MUESTREO.....	56
4.1.1. TOMA DE MUESTRA.....	56
4.1.2. CONCENTRACIÓN Y EXTRACCIÓN DEL MATERIAL ORGÁNICO DEL AGUA.....	57
4.1.3. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.....	57
4.2. DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS.....	57
4.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD MUTAGÉNICA.....	58
4.4. DETECCIÓN DE DAÑO DEL ADN	59
4.4.1. EXTRACCIÓN DE LINFOCITOS.....	60
4.5. ANALISIS ESTADÍSTICO.....	60
5. RESULTADOS Y ANALISIS.....	62
5.1. DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS.....	62
5.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD MUTAGÉNICA.....	63
5.3. DETECCIÓN DE DAÑO DEL ADN	66
5.4. CORRELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE METALES PESADOS CON EL DAÑO GENOTÓXICO Y MUTAGÉNICO DEL ADN	69
6. CONCLUSIONES.....	73
7. RECOMENDACIONES.....	75
8. REFERENCIAS.....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura N°1. Proceso de curtido, Ribera	21
Figura N°2. Proceso de curtido, curtido al vegetal.....	25
Figura N°3. Estructuras de los ácidos aspártico (izquierda) y glutámico (derecha), donde se resaltan las cadenas laterales que contienen un grupo carboxílico.....	26
Figura N°4. Interacción del Cr^{+3} en el entrecruzamiento de cadenas de colágeno.....	27
Figura N°5. Rangos de pH adecuado para el curtido.....	28
Figura N°6. Formas de entrecruzamiento del Cr^{+3} y el colágeno.....	28
Figura N°7. Estructura molecular de la piel curtida.....	29
Figura N°8. Procesos en la etapa de Curtido.....	30
Figura N°9. Procesos en la etapa de RTE.....	32
Figura N°10. Número de curtiembres en Colombia por departamento.....	41
Figura N°11. Ubicación de la curtiembre San Faustino, Cúcuta Norte de Santander.....	61
Figura N°12. Curva de calibración para la determinación de niveles de cromo en una muestra de aguas de curtiembre San Faustino, Cúcuta Norte de Santander.....	70

Figura N°13. Curva de calibración para la determinación de niveles de cromo en una muestra de aguas de curtiembre San Faustino, Cúcuta Norte de Santander.....	71
Figura N°14. Curva de calibración para la determinación de niveles de cromo en una muestra de aguas de curtiembre San Faustino, Cúcuta Norte de Santander.....	71
Figura N°15. Revertantes observadas.....	73
Figura N°16. Mutagenicidad inducida en <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 por extractos de aguas residuales de la curtiembre San Faustino de la ciudad de Cúcuta.....	74
Figura N°17. Mutagenicidad inducida en <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 por extractos de aguas residuales de la curtiembre San Faustino de la ciudad de Cúcuta.....	75
Figura N°18. Mutagenicidad inducida en <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 por la muestra tomada durante los vertimientos de la curtiembre San Faustino de la ciudad de Cúcuta, durante los tres muestreos realizados en el año.....	76
Figura N°19. Mutagenicidad inducida en <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 por la muestra tomada después de los vertimientos de la curtiembre San Faustino de la ciudad de Cúcuta, durante los tres muestreos realizados en el año.....	76
Figura N°20. Promedio de mutagenicidad inducida en <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 por extractos de aguas residuales de la curtiembre San Faustino de la ciudad de Cúcuta.....	78

Figura N°21. Mutagenicidad inducida en <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 por la muestra tomada antes de la curtiembre San Faustino de la ciudad de Cúcuta, durante los tres muestreos realizados en el año.....	79
Figura N°22. Mutagenicidad inducida en <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 por la muestra tomada durante los vertimientos de la curtiembre San Faustino de la ciudad de Cúcuta, durante los tres muestreos realizados en el año.....	79
Figura N°23. Mutagenicidad inducida en <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 por la muestra tomada después de los vertimientos de la curtiembre San Faustino de la ciudad de Cúcuta, durante los tres muestreos realizados en el año.....	80
Figura N°24. Cometas observados en los ensayos.....	82

LISTA DE TABLAS

Tabla N°1. Clasificación de los metales pesados biológicamente y toxicológicamente.....	44
Tabla N°2. Cepas TA98 y TA100 de Salmonella typhimurium.....	55
Tabla N°3. Longitudes de onda de los metales pesados	63
Tabla N°4. Concentraciones en partes por millón (ppm) de metales pesados permitidos en la norma de la OMS y las encontradas en los diferentes sitios de muestreo.....	68
Tabla N°5. Promedios y desviaciones estándares de las concentraciones en partes por millón (ppm) de metales pesados encontradas en los diferentes puntos de muestreo, durante las tres fechas de muestreo (abril, agosto y noviembre).....	69
Tabla N°6. Daño del ADN en la sangre periférica humana (linfocitos) inducida por el extracto orgánico del agua de curtiembres.....	74
Tabla N°7. Promedios y desviaciones estándares de la mutagenicidad inducida en Salmonella typhimurium TA100 por las muestras tomadas antes, durante y después de los vertimientos de la curtiembre San Faustino de la ciudad de Cúcuta.....	77
Tabla N°8. Daño del ADN en la sangre periférica humana (linfocitos) inducida por el extracto orgánico del agua de curtiembres.....	83

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
APHA	American Public Healt Association
ARN	Ácido Ribonucleico
AWWA	American Water Works Association
CORPONOR	Corporación Autónoma Regional de la Frontera Nororiental
Cr ⁺³	Cromo trivalente
Cr ⁺⁶	Cromo hexavalente
DHHS	Departamento de Salud y Servicios Humanos
EAA	Espectroscopia de Absorción Atómica
EPA	La Agencia de Protección Ambiental
FDA	Food and Drug Administration
IARC	International Agency for Research on Cancer
OMS	Organización Mundial de la Salud
ROS	Reactive Oxygen Species

SCG..... Single Cell Gel Electrophoresis Assay

UNEP.....Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente

WPCF.....Water Pollution Control Federation

1. INTRODUCCION

El río Pamplonita nace a 3000 metros de altura, en cercanías de Pamplona; cubre una extensión de 137.524 hectáreas y la longitud total son 115 kilómetros, Pérez (2015) recorre los municipios del departamento Norte de Santander, empezando por Pamplona, muy cerca Pamplonita, seguido Bochalema y Chinácota, los siguientes poblados son Herrán, Ragonvalia, continuando su recorrido en los Patios y llegando a la capital, Cúcuta, Villa del Rosario y por último culmina en Puerto Santander, Jaimes (2016). Estos municipios depositan las aguas residuales que producen, las cuales son producto de los residuos líquidos procedentes de viviendas, instituciones públicas, industrias y establecimientos comerciales y eventualmente se le suman, aguas subterráneas o de lluvia, Zurita (2010). La capital del departamento no es ajena de ello, por el contrario, por poseer mayor población y tener sus industrias y fabricas concentradas en puntos específicos, hace más visible la contaminación en este efluente.

Como es el caso de San Faustino, el cual es un sector donde focaliza gran parte de las industrias curtiembres de la capital del departamento Norte de Santander; estas industrias importan ya que abastecen de materia prima a gran parte de las empresas y microempresas que tienen su actividad económica va dirigido al marketing de productos de calzado, talabartería y marroquinería de esta ciudad, teniendo en cuenta que el departamento es reconocido a nivel nacional en este sector económico.

Las curtiembres adecuan las pieles, por medio de modificaciones de su aspecto químico y físico, y así estabilizando el colágeno de la piel, transformándola en cuero, este proceso es llamado curtido; es durante este proceso de transformación, donde las curtiembres depositan bastas cantidades de agua residuales a la fuente hídrica con elevada contaminación orgánica y tóxica proveniente de sales, sulfuro y cromo.

Jarsjöa (2011) (Chunxiao Zhang, Jiang Lina, Xinju Jia, 2016),(Jiayi Yang, Xuegang Luo, Tingsong Yan, 2018)

Ello constituye un problema, ya que impacta nocivamente el medio ambiente y el entorno, y se convierte en una de las actividades más devastadoras para el ecosistema, ya que gastan grandes cantidades de agua en el proceso y los residuos sólidos y líquidos generados son altos; en especial si son metales pesados, ya que son elementos altamente tóxicos, clasificados por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) ya que induce efectos mutagénicos y genotóxicos en los seres humanos. Estos metales pesados pueden ser transportados en el agua y ser absorbido por los seres vivos e ingresar por la ingesta, contacto o hasta inhalación, generando efectos de orden genético, (Wise, et al., 2004) y mutagénico (Alfonso Quijano Parra, Carol Castillo T, 2015) y carcinógeno. (Proctor et al., 2002). Siendo importante saber si estas aguas contienen metales pesados y de haberlos, determinar su concentración; además, detectar si existe daño mutagénico o genotóxico en la fuente hídrica en el sector del vertimiento de la curtiembre San Faustino.

2. OBJETIVO GENERAL

Determinar el daño genético inducido sobre el ADN de linfocitos humanos y *Salmonella typhimurium* procedente de agua residual de la curtiembre San Faustino.

2.2. Objetivos específicos

- *Determinar la concentración de los metales pesados (Pb, Fe, Zn, Cd, Cu, Cr) presentes en el agua residual procedente de la curtiembre San Faustino, utilizando la técnica de espectroscopia de absorción atómica.*
- *Determinar la actividad mutagénica inducida por agua residual procedente de la curtiembre San Faustino; por medio del test de Ames.*
- *Evaluar la actividad genotóxica inducida por agua residual procedente de la curtiembre San Faustino; por medio del ensayo "COMETA".*
- *Correlacionar la presencia de metales pesados con el daño genotóxico y mutagénico.*

3. MARCO REFERENCIAL

3.1. Curtiembre

El curtido es un proceso realizado en las curtiembres, donde las pieles de los animales, se convierten en cuero; (Zabala, 2012) por medio de diferentes modificaciones químicas y físicas, se transforma en un material duradero, resistente, imputrescible, pero de igual manera suave, elástico, flexible y belleza que le darán valor comercial y estético. (Porras, 2010), (Nancy Piedad Molina Montoya, 2010), (PORTAVELLA, 2005).

3.1.1. *Proceso de la curtiembre*

Es denominado proceso del curtido, este varía según la utilidad que vayan a tener los cueros y de así se pueden obtener más o menos impermeables, rígidos, blandos, etc.

Las etapas más importantes en el proceso de curtición, son:

- *Pre tratamiento y almacenamiento.*
- *Ribera.*
- *Curtido.*
- *Recurtido, teñido y engrase.*
- *Acabados.*

3.1.1.1. Pre tratamiento y almacenamiento

El pre tratamiento del cuero se puede realizar después del sacrificio del animal; se realiza un tratamiento por inmersión en salmuera, si se necesita conservar la piel por un tiempo prolongado; esto se utiliza para evitar la putrefacción de las pieles, ya que impide el crecimiento de microorganismos en las mismas. Adzet J. (2005),

3.1.1.2. Ribera

En este proceso se limpia la suciedad y eliminan los restos de sangre; con el fin de prepararla para el curtido. Posterior a ello, las pieles se someten a un proceso de remojo en piletas, las cuales contienen desengrasantes, humectantes y bactericidas; durante este proceso se calcula aproximadamente un gasto de agua del 50%, además, se utilicen agentes tensoactivos para ayudar en la rehumectación de la piel. Salas (2005).

Las principales operaciones en el proceso de ribera, son: Remojo, pelambre, descarnado y dividido.

Remojo

Es utilizado para rehidratar los cueros, utilizando grandes tanques de agua con detergentes, bactericidas, desinfectantes y humectantes; con un proceso aproximado entre 6 a 24 horas. Soler, J. (2004)

Pelambre

Esta operación se realiza para hinchar la epidermis, quitar el pelambre del cuero, aprovechar y saponificar las grasas y preparar las fibras para facilitar el efecto del curtido, este proceso dura entre 17 a 20 horas. Frankel, A. (2009).

Se retira el material que contiene queratina, como el pelo y la epidermis, en este proceso se utiliza principalmente sulfuro de sodio (Na_2S); posteriormente se encala la piel, con un álcali, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, esto es, en otras palabras, hinchar la piel de manera homogénea, expulsando al mismo tiempo algunas albúminas, mucopolisacáridos y grasas, con el propósito de prepararla para el curtido; durante este proceso es necesario un medio básico (pH de 12) para hidrolizar la queratina en la piel y así facilitar la eliminación del pelambre. Si hay un pH ácido, estos pueden protonarse y producir el gas de ácido sulfhídrico, H_2S siendo muy tóxico y de un olor desagradable (Salas, 2005). Además, los desechos generados aumentan la carga orgánica de los efluentes, incrementando la contaminación (IBTEN-CIN, 2014).

Descarne

Lacerca, M. (2003), Consiste en la remoción con máquinas descarnadoras de los tejidos subcutáneos, adiposos, musculares, subcutáneos y el sebo adherido en las capas de la piel, con el propósito de facilitar la penetración de los productos curtientes. Luego, se debe bajar el pH para seguir con el proceso de desencalado.

Dividido

Portavella, M. (2005), Consiste en dividir en dos capas la piel hinchada y depilada, de modo que se separe la piel de la carne.

A continuación se muestra el proceso de ribera detalladamente.

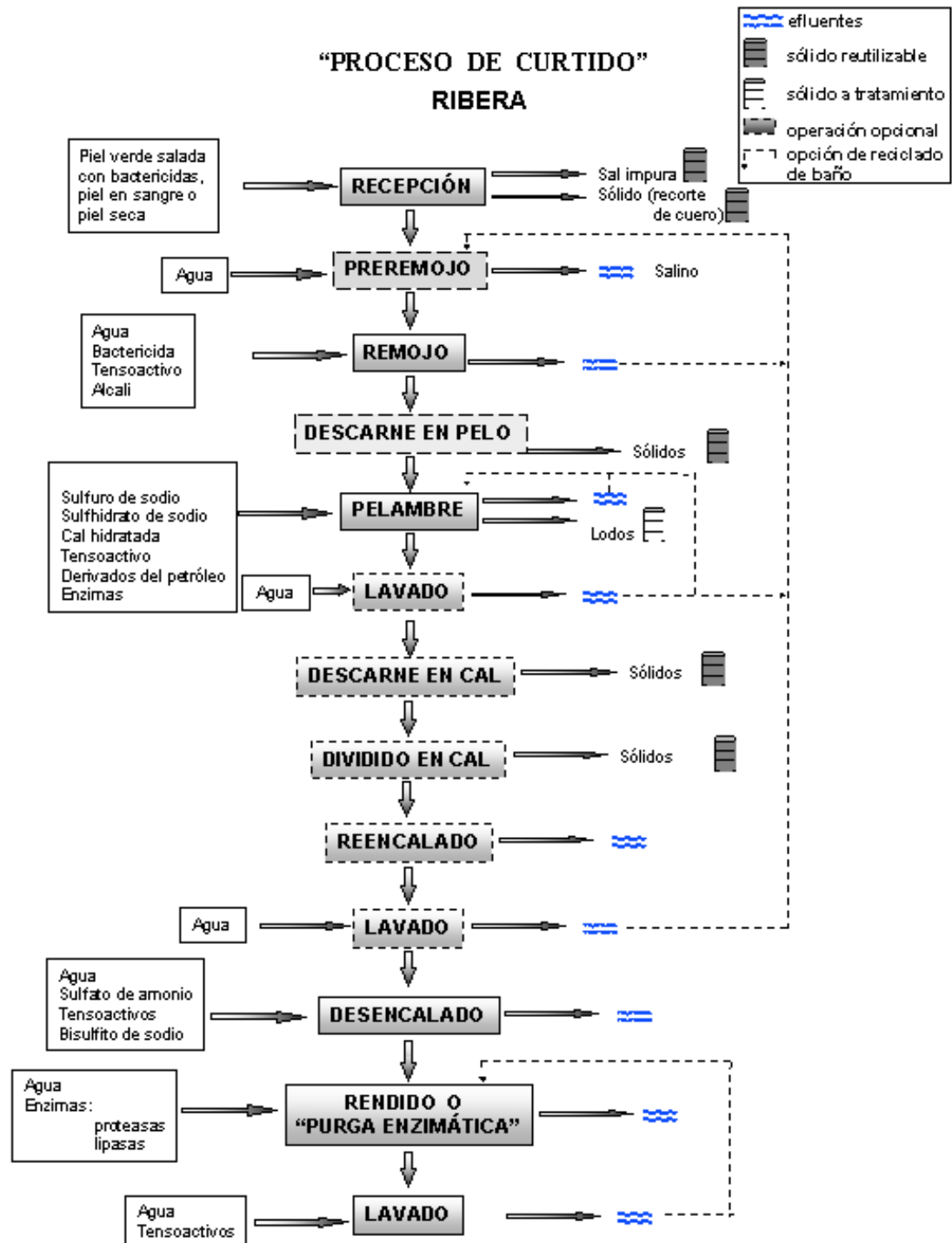


Figura N°1. Proceso de curtido, ribera.

Fuente: McCann, M ,2001

3.1.1.3. *Curtido*

El proceso de curtido se desarrolla básicamente en los siguientes pasos: desencalado, purga, piquelado y curtido propiamente dicho.

Desencalado y purga

En este proceso se preparan las pieles para el curtido, utilizando lavados con agua, con el fin de reducir la alcalinidad y eliminar los residuos de cal y sulfuro de sodio. Para eliminar los restos de agentes encalantes se utilizan ácidos y sulfato de amonio (Vidal et al., 2003). Estos agentes desencalantes utilizados, son sales hidrolizables ácidas que neutralizan los agentes encalantes y forman sales solubles que son retirados con agua, posteriormente, para desengrasar las pieles se añade hidrógenosulfito de sodio, para terminar el proceso de desencalado se realiza una purga a las pieles con agentes humectantes y desengrasantes, por un tiempo aproximado de 45 minutos, y se finaliza con un lavado (Shupack, 1991).

Piquelado

Para el proceso de piquelado se utilizan tambores rotativos para la preparación de la curtición al cromo, al aluminio o cualquier otro elemento que se utilice para este proceso, se utiliza cloruro de sodio, NaCl y generalmente ácido sulfúrico, H_2SO_4 al 1.2% o ácido fórmico, $HCOOH$ a un valor de pH menor a de 3.8, con el fin de evitar el hinchamiento y permitir que las sales de cromo penetren debidamente en la estructura y entren a las células de la piel. Es de importancia que las proporciones de sal y ácido sea la adecuada, ya que un exceso de ellas puede alterar la calidad del cuero. Si se baja demasiado el pH, la piel se hinchará irreversiblemente, pero si

por el contrario, si se utiliza demasiada sal, la piel se deshidratará y el cuero adoptará una textura tiesa y plana (Muñoz, 2008).

En este proceso los residuos de aguas tienen diferentes concentraciones de cromo y otras sustancias, por tal motivo, el procedimiento a seguir para la eliminación de estas sustancias depende de la concentración que posean; durando aproximadamente de 2 a 3 horas, para continuar con la etapa del curtido, se realizan 2 horas adicionales de lavados.

Curtido

El proceso de curtido consiste en convertir las pieles en materiales resistentes y fuertes a la putrefacción, utilizando diferentes sustancias curtientes minerales o vegetales, que penetran la estructura de la piel estabilizando las fibras de colágeno (Vidal L, et al., 2013). Los principales procesos de curtido según el curtiente empleado son; curtido vegetal, curtido mineral y curtido sintético.

- Curtido vegetal

Utiliza taninos vegetales, utilizando principalmente el extracto de quebracho y corteza de acacia negra y la mimosa. En la antigüedad, este proceso se realizaba en pozas, tomando varias semanas en el proceso, en la actualidad, las curtiembres utilizan tambores rotativos, y en un tiempo de sólo 12 horas y utilizando una solución de tanino al 12%, se realizan el proceso de curtido en las pieles.

A continuación, se muestra el proceso de ribera detalladamente.

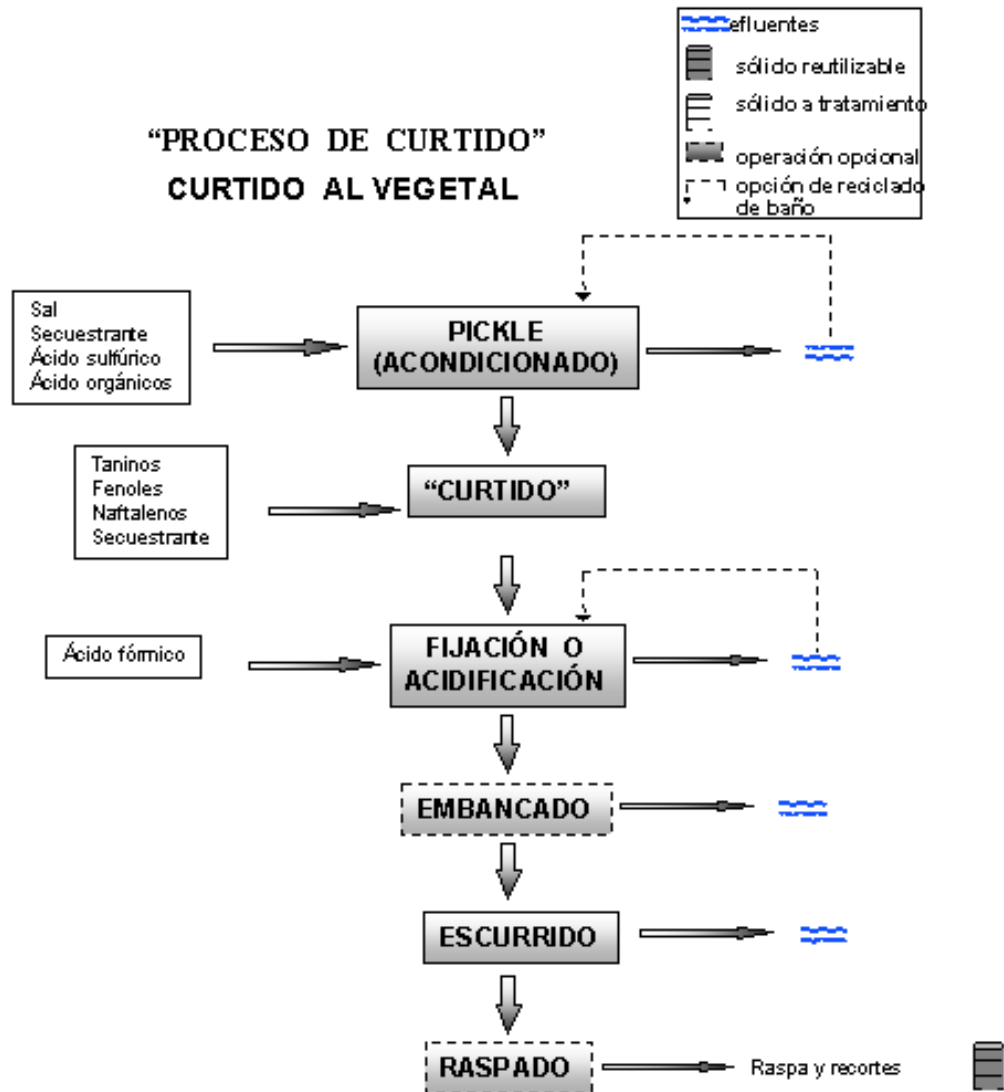


Figura N°2. Proceso de curtido, curtido al vegetal.

Fuente: McCann, M ,2001

- Curtido mineral

Es el método mayormente utilizado a nivel mundial, es usado en la fabricación de cueros para la elaboración de guantes, calzados, bolsos, ropa, etc. La principal

ventaja de este proceso es la disminución del tiempo de curtido es menor de 24 horas, además de obtenerse un cuero con mayor resistencia al desgaste y al calor.

En el proceso de curtido mineral se usan principalmente las sales de cromadas, también se utilizan para casos especiales, las de magnesio y aluminio; siendo la función de estas sales estabilizar la proteína de la piel. La principal proteína de la piel es el colágeno, su función es estructural. Está constituida por fibras polipeptídicas de triples hélices las cuales se unen mediante puentes de hidrógeno formando una red de fibras de colágeno (Covington, 1997). El ácido glutámico o aspártico contienen un grupo carboxílico libre en sus cadenas laterales, como se observa en la Figura N°3.

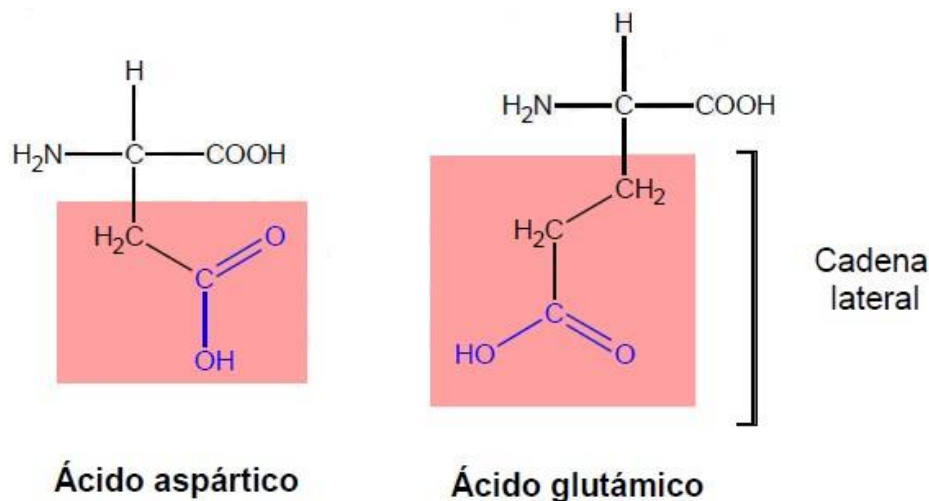


Figura N°3. Estructuras de los ácidos aspártico (izquierda) y glutámico (derecha), donde se resaltan las cadenas laterales que contienen un grupo carboxílico.

Fuente: (Aranda Salazar & Orrellando Angulo, 2016)

Los ácidos carboxílicos -COOH son importantes para la coordinación del cromo con el colágeno, ya que permite el cambio de propiedades en el proceso de curtido. (Rey de Castro Rosas, 2013). El cromo que se utiliza para tal fin es el Cr^{+3} , debido a su buena capacidad de poder enlazarse con ligandos orgánicos con carga

negativa, los cuales están presentes en la proteína de la piel animal. Se debe mantener un pH ácido para que las sales de cromo estén solubles y puedan desprotonarse y así puedan ser nucleófilos más efectivos, cuando el pH es básico las sales forman hidróxidos. (Aranda Salazar & Orrellando Angulo, 2016). Básicamente, los ácidos carboxílicos podrían interactuar con el Cr^{+3} puesto que el átomo de oxígeno posee dos pares de electrones libres en el grupo hidroxilo $-\text{OH}$, y estos llegan a coordinar con el metal. Aunque, el grupo carboxilo $-\text{COOH}$ no hidrolizados y sin carga no son de gran afinidad por el ion metálico. Por ello, los grupos carboxi $-\text{COOH}$ para obtener una buena interacción, deben primero desprotonarse, para incrementar su afinidad al complejo metálico positivo, de esta manera, el oxígeno logrará coordinar de una manera óptima con el cromo, como se puede observar en la Figura N°4 (Aranda Salazar & Orrellando Angulo, 2016).

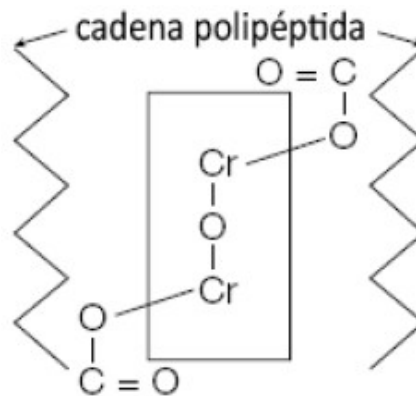


Figura N°4. Interacción del Cr^{+3} en el entrecruzamiento de cadenas de colágeno.
Fuente: Rey de Castro, 2013

Es por esto que el proceso de curtido debe empezar con un pH ácido aproximadamente de 2,5 y 3, esto se realiza, para facilitar que el cromo penetre la piel, para una mayor eficacia, se deja por un tiempo la piel en baños de cromo, y se aumenta el pH, lográndose que los grupos carboxilos del colágeno se desprotonen, de esta manera se dan las reacciones con el cromo.

En la siguiente figura se muestra cómo influye el pH el proceso de curtido.

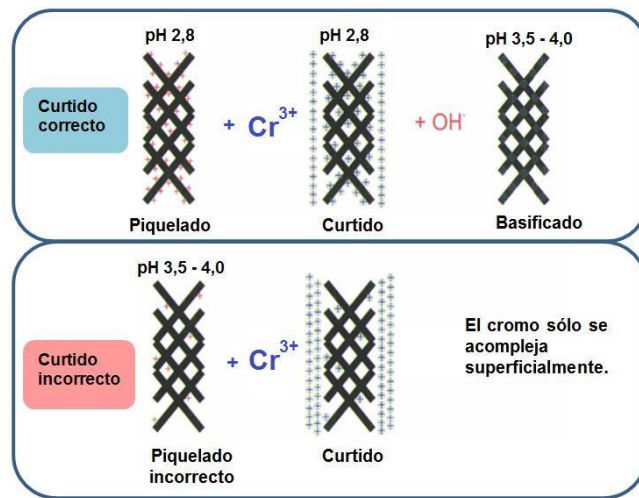


Figura N°5. Rangos de pH adecuado para el curtido.

Fuente: Leather Technology Centre, 2013

La interacción que tiene el cromo con la piel puede coordinarse en forma de una triple hélice, ya sea entre distintas fibras de la hélice o por entrecruzamiento intra hélice entre dos puntos de la misma fibra. El cromo coordina con dos fibras provenientes de hélices distintas, como se puede observar en la Figura 6 (Aranda Salazar & Orrellando Angulo, 2016).

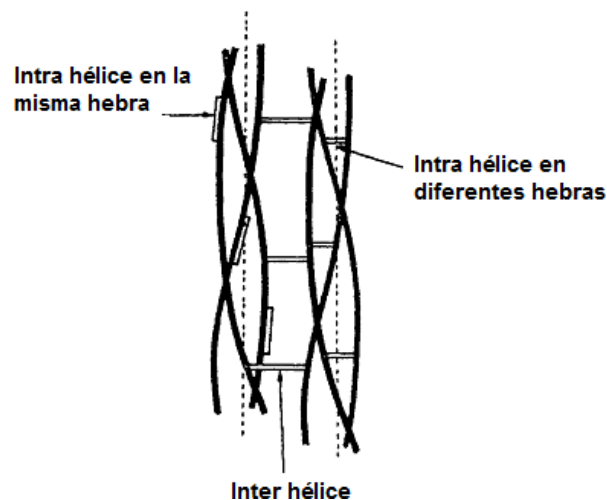


Figura N°6. Formas de entrecruzamiento del Cr^{+3} y el colágeno.

Fuente: European Comission Integrated Pollution Prevention, 2003

Las fibras de colágeno se enlazan debido a las sales de cromo, ya que el Cr^{+3} forma complejos de coordinación estables, cinéticamente inertes y que forman reticulaciones con las fibras de colágeno, como se muestra en la siguiente imagen (Sundar, Raghavarao, Muralidharan y Mandal, 2011)

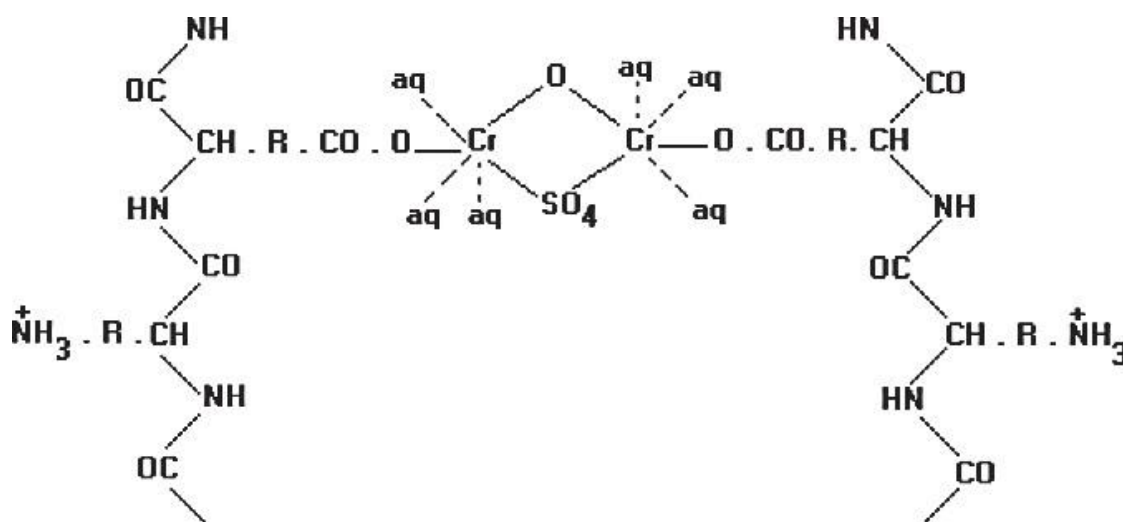


Figura N°7. Estructura molecular de la piel curtida.

Fuente: Viteri Tapia, 2017

El cuero adquiere propiedades de impermeabilidad y resistencia a la descomposición por bacterias, convirtiéndose térmicamente estables, debido a que el cromo se convierte en parte de la estructura del colágeno.

- Curtido sintético

En este proceso se utilizan curtientes orgánicos sobre la base del formol, quinona y otras sustancias. Esto permite aumentar la penetración de los taninos y proporcionando un curtido más uniforme. Se utilizan poco, porque maneja costos elevados.

En la siguiente figura se muestra el proceso de curtido detalladamente.

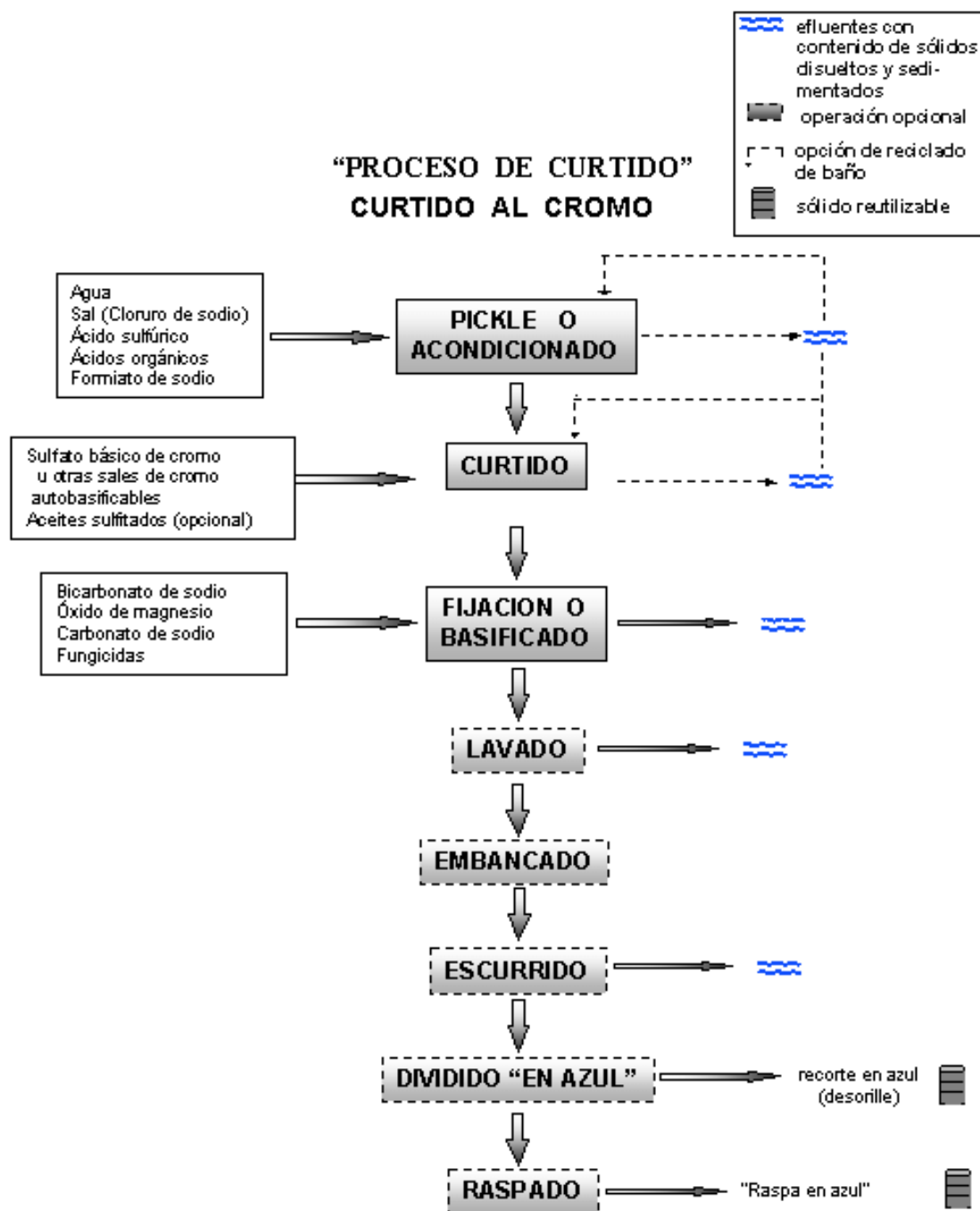


Figura N°8. Procesos en la etapa de Curtido

Fuente: McCann, M ,2001

3.1.1.4. Recurtido, teñido y engrase (RTE)

En este proceso se ultimas los mínimos detalles al cuero ya curtido y según sean las especificaciones del producto final, serán teñidos, recurtidos o engrasados.

El recurtido brinda una diversidad de calidades como, brillo, suavidad, elasticidad, flexibilidad, llenura y cuerpo al cuero; para ello se utilizan sales minerales y curtientes como los sintanos, para que el cuero se convierta en homogéneo, (Pinedo R., 2012).

Una de las etapas finales es el teñido, permite dar un color deseado al cuero, la siguiente etapa es la de engrase, en esta etapa se tienen en cuenta los detalles que especifique el comprador, como: elasticidad, conductividad térmica, textura, hidrofobicidad, elongación, peso específico, suavidad o dureza, etc.

El proceso de recurtido se muestra detalladamente en la siguiente figura.

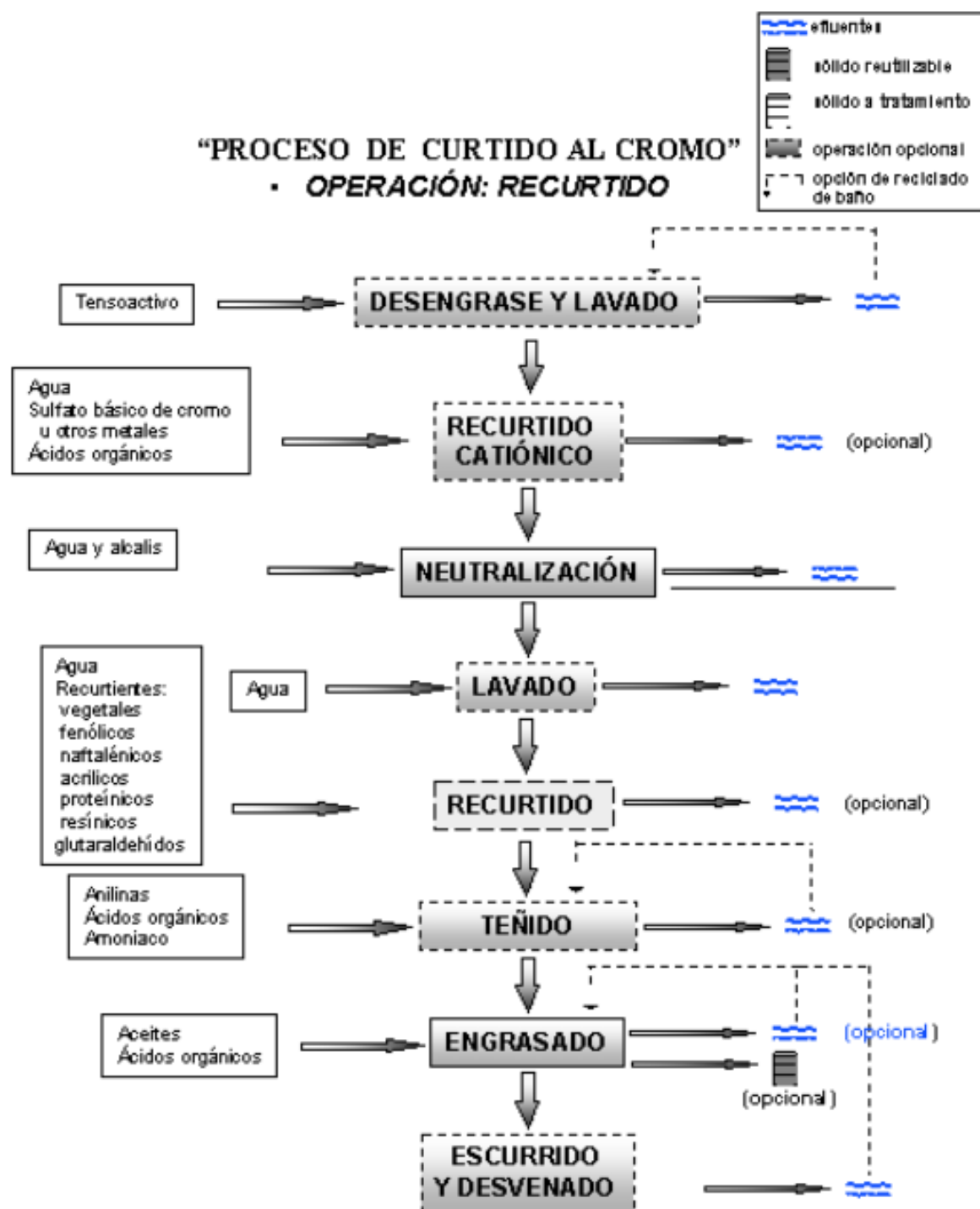


Figura N°9. Procesos en la etapa de RTE

Fuente: McCann, M ,2001

3.1.1.5. Acabados

El proceso final para producir cuero culmina con el secado y acabado, las cuales comprenden operaciones mecánicas que permiten dar las características según las especificaciones de cada producto, como puede ser laqueado, grabado, etc. (McCann, M ,2001).

3.2. Impacto ambiental de las curtiembres

Durante la producción del cuero se desecha más de la mitad de la composición inicial de la piel; además, para procesar aproximadamente una tonelada de cuero se necesitan alrededor de 500000 g de productos químicos; porque la mayoría no se incorporan en el cuero acabado; por consiguiente, los residuos generados son muy grandes, siendo de tipo gaseoso, sólido y terminando en los efluentes líquidos con una mezcla de compuestos orgánicos e inorgánicos muy compleja y según las particularidades de los efluentes los desechos se eliminan a las fuentes hídricas o a la atmósfera, todo esto hace que las curtiembres sean consideradas uno de los sectores más contaminantes; (Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente, 2012).

Aunque en cada proceso del tratamiento de las pieles se produce un gran impacto ambiental por todos los desechos generados; visto más detalladamente, la mayor cantidad de contaminantes de los efluentes líquidos generados provienen de las dos primeras etapas, siendo las últimas etapas son las que aportan la cantidad de desechos sólidos y emisiones de sustancias (Amaya et al., 2005).

En los efluentes líquidos se encuentran elevados valores de pH, gran contenido de cal y sulfatos libres, sulfuros y una alta presencia de DBO5, esto se debe a la materia orgánica y grasas animales resultantes de los sólidos generados en el proceso. Es en el proceso de remojo donde se forman los efluentes líquidos de tierra, sal, sebo, grasas sangre y heces, que se producen durante aproximadamente de 6 a 24 horas. Pero las aguas residuales más contaminadas en cuanto a concentración y a la cantidad de la carga originada en todo el proceso de fabricación del cuero son las generadas en el pelambre. Es por ello, que las aguas residuales de este proceso de pelambre se reutilizan varias veces, retirando los sólidos y se acondiciona el sulfuro para la siguiente utilización.

3.2.1. Principales impactos ambientales de las industrias curtiembres

Hay que destacar, que uno de los principales inconvenientes en las industrias curtiembres es que la gran mayoría son informales y no se encuentran registradas y mucho menos cumplen con los requerimientos o parámetros para funcionar con los que exige la industria curtiembre, pues a través del tiempo las fábricas han sido improvisadas, en lugares adaptados donde, se realizan todo el proceso con operaciones rudimentarias; ya que no cuentan con maquinaria tecnificada, ni con procesos productivos tecnológicos de producción limpia y donde los desechos sólidos y líquidos no tiene ningún tratamiento; (Revista Virtual Pro, 2007) esto se presenta aún, puesto que las personas involucradas no le ven la importancia y trascendencia de los daños ecológico y menos tienen en cuenta las normas para evitarlas (Caracol Radio, 2018).

En el proceso de producción del curtido se pueden destacar que los principales impactos ambientales son:

- *Uso ineficiente del agua.*
- *Gran cantidad de residuos.*
- *La etapa de terminación.*
- *Inadecuada disposición de residuos.*
- *Utilización de sustancias químicas.*

3.2.1.1. *Uso ineficiente del agua*

Se utilizan unos 1000 litros de agua para la producción de cada cuero, generando grandes volúmenes de efluentes vertidos diariamente.

3.2.1.2. *Gran cantidad de residuos*

La descargada de materia orgánica, ácidos y diferentes residuos en las fuentes hídricas deteriora el oxígeno disuelto en el agua, provocando la muerte de la vida acuática y las funciones naturales de los ríos.

3.2.1.3. *La etapa de terminación*

Esta etapa utiliza una cantidad considerable de sustancias químicas, como lo son ciertos pigmentos que contienen productos químicos fluorados, polímeros y metales pesados (cadmio, plomo, cromo, etc.); siendo sustancias altamente tóxicas.

3.2.1.4. Inadecuada disposición de residuos

Los restos de las pieles como son recortes de cuero, pelo, residuos de pinturas, envases, en los cuales no se pueden utilizar ningún tipo de métodos de aprovechamiento y/o disposición, ya que han utilizado continuamente químicos en el proceso y lo hacen irreversibles.

3.2.1.5. Utilización de sustancias químicas

- *Cromo*

Dentro de estas sustancias químicas utilizadas, se observa con preocupación el uso del cromo, ya que es un metal pesado y muy probablemente se oxida a Cr^{+6} siendo catalogado como compuesto cancerígeno. El cromo es difícilmente biodegradable y por el contrario se bioacumula. Por tal razón se convierte en un gran problema para el medio ambiente debido a su acumulación y persistencia en el tiempo, provocando efectos impredecibles e irremediables en la vida acuática.

- *Solventes*

Los solventes son muy utilizados en las curtiembres en las operaciones de terminación de los cueros, limpieza en seco, acabado y desengrase. Los principales compuestos químicos utilizados son: etilacetato, acetato de etilo, acetato de butilo, acetona, alcohol isopropílico, xileno, 2-butanona, ciclohexanona, etilbenceno, metiletilcetona, 2-pentanona, tolueno, ciclohexano, di-isobutilcetona (DIBK), metil isobutilcetona (MIBK); todos estos compuestos tienen efectos nocivos para la salud

y el medio el ambiente. La normativa internacional restringe el uso de estas sustancias debido a los efectos perjudiciales que provocan.

- *Sulfuro*

El sulfuro es utilizado para retirar el pelo de la piel, pero al transformarse en ácido sulfhídrico se convierte en altamente nocivo para la salud; causando un malestar grave que produce sofocación y hasta la muerte si se sobreexpone.

- *Ácido sulfhídrico*

El ácido sulfhídrico es tóxico con valores superiores a 50 ppm, provocando un efecto adormecedor, hasta llegar al punto de no percibir el hedor, pero si sobrepasa los 100 ppm puede llevar a la muerte.

3.3. Normatividad para curtiembres

Algunos entes se han pronunciado con respecto a las normas para prevenir el impacto ambiental por el proceso de curtido, como son el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible mediante la Resolución 0631/2015, este ente regula por medio de normas los valores máximos de concentraciones de sustancias químicas permitidos en los vertimientos para que no representar riesgo en la salud humana o para las especies de animales que se encuentran en las fuentes hídricas, (Rama y Philip, 2005).

3.3.1. Resolución 0631 de 2015

Esta resolución reglamenta los valores y parámetros máximos permitidos en los vertimientos de aguas superficiales y a los sistemas de alcantarillado público, para que no afecte la salud humana y el medio ambiente. (Ambiente 2015).

3.3.2. Decreto 1207 de 2014

En este decreto se acuerdan los parámetros para la reutilización de agua residual tratada, la cual no debe ser usada como fertilizantes. (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible 2010)

3.3.3. Resolución 0330 de 2017

Esta resolución dicta las normas para cada etapa de planeación, diseño, construcción y funcionamiento de la infraestructura necesaria para el tratamiento de aguas. (Ministerio de Vivienda 2017)

3.3.4. Agencia de Protección Ambiental (EPA)

Esta agencia es la encargada de desarrollar los reglamentos para la reutilización de aguas residuales tratadas, desde 1980, siendo estas las primeras de este tipo, se actualizaron en 1992, 2009 y 2012. Teniendo en cuenta que cada territorio puede

modificar y desarrollar reglamentos según sea las necesidades del sector, (US Environmental Protection Agency 2012).

3.3.5. Organización mundial de la salud (OMS)

La organización mundial de la salud, estipula normas para la reutilización del agua, y de esta manera garantizar la calidad e higiene de esta, para el consumo humano. (World Health Organisation 2017)

Por lo tanto, el sistema utilizado en las aguas en las industrias curtiembre es uno de los principales factores en el cuidado del medio ambiente, debido a la cantidad de residuos generados y la peligrosidad que representan, tanto en la salud humana como demás seres vivos que se hallan en la fuente hídrica; por tal motivo, el procedimiento sugerido para el tratamiento inicial es la eliminación de los desechos sólidos, antes de ser tratados. (Secretaría Distrital de Ambiente, 2016).

- Tratamiento primario

Utiliza la floculación, coagulación y sedimentación con el fin de remover de materia orgánica, y las sustancias como cromo y sulfuros.

- Tratamiento secundario

Este tratamiento usa lodos activados que facilitan la reducción de la materia orgánica que hubiese podido quedar en la piel.

- *Tratamiento terciario*

Este último tratamiento es utilizado para retirar contaminantes específicos, parásitos y patógenos.

3.4. Antecedentes de industrias curtiembres

Se han realizado gran cantidad de estudios a las industrias curtiembres, desde hace aproximadamente 30 años en varios países, principalmente se estudia el cromo hexavalente y sus compuestos, ya se son derivados de tal proceso; además, son sustancias que tienen una relación con los potenciales efectos adversos en la salud del ser humano y del medio ambiente (Tellez M, Carvajal Roxs, & Gaitan, 2004).

3.4.1. Antecedentes de curtiembres a nivel internacional

Los estudios realizados a nivel internacional sobre las industrias curtiembres, han sido en diversos lugares como, Alemania, Italia, Canadá, Australia, Sudáfrica, Nueva Zelanda, Estados Unidos, Colombia; estas investigaciones se han realizado allí debido a la elevada presencia de estas industrias, y además por la cantidad de contaminantes que se generan en el proceso,

3.4.2. Antecedentes de curtiembres a nivel nacional

La industria de las curtiembres en Colombia, es muy amplio y se encuentra en varios sectores del mercado, localizándose en diferentes departamentos y municipios del país. En la siguiente imagen se pueden observar las industrias curtiembres según la distribución en el país.

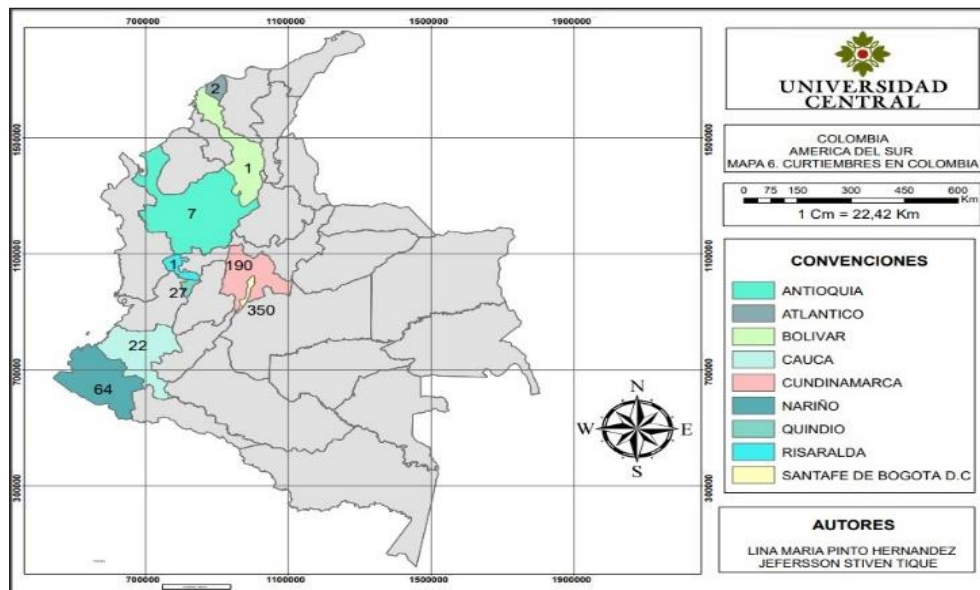


Figura N°10. Número de curtiembres en Colombia por departamento.

Fuente: Martínez y Romero, 2018

El departamento de Cundinamarca y la ciudad Bogotá son los que presentan mayor cantidad las curtiembres en el país, representando una tercera parte de la producción total nacional.

La industria curtiembres en Colombia, se ha llevado a cabo como una actividad desde la época colonial, transmitido de generación en generación como una tradición y un trabajo cultural. Uno de los municipios que adoptaron esta cultura

es Villapinzón en Cundinamarca, y aún sigue siendo una de las principales fuentes de empleo (Ledesma, López, Ramírez, & Triana, 2017).

Tan bien es de destacar que esta industria se ha convertido en un gran problema no sólo en este municipio, sino donde se encuentran estas industrias rudimentarias, ya que suelen ser la principal fuente de contaminación de los ríos, principalmente el río Bogotá para este sector, uno de los más contaminados a nivel mundial. Esto se presenta porque las curtiembres son rudimentarias en sus procesos y vierten directamente los residuos al río Bogotá sin realizarles tratamiento a sus desechos, por tal razón sus vertimientos contienen grandes cantidades de contaminantes tóxicos, como los metales pesados; estos generan secuelas en las fuentes hídricas, casi irremediables, ya que remover estas contaminaciones es una tarea sumamente compleja y es necesario gran capital para ello. (Escobar, Ubaque, & Bohórquez, 2012).

Específicamente en Colombia, el Ministerio de Trabajo y Seguridad Social. “Decreto 1295 de 1994. Sistema General de Riesgos Profesionales” ha catalogado como actividades de riesgo alto para la salud del trabajador, donde los trabajadores se expongan a compuestos de Cr^{+6} , estos deben ser vigilados y supervisados por las autoridades de salud, ya que estos compuestos son considerados cancerígenos para la salud del ser humano. Existen muchas industrias en Colombia que utilizan compuestos de cromo, como son las industrias las curtiembres. Aproximadamente existen cerca de mil curtiembres funcionando ilegalmente. Según autores como (Chunxiao Zhang, Jiang Lina, Xinju Jia, 2016), (Alfonso Quijano Parra, Carol Castillo T, 2015), (Proctor et al., 2002).

3.4.3. Antecedentes de curtiembres a nivel regional

Las autoridades locales tienen sistemas de protección de las fuentes hídricas y cuentan con proyectos a futuro; (avanza el proyecto planta de tratamiento de aguas residuales de Cúcuta, 2016), (se construirá planta de tratamiento residual en Cúcuta) sin embargo, faltan controles más eficientes que permitan cumplir las normas establecidas.

Hay estudios reportados por la corporación autónoma regional, indicando que los aguas residuales e industriales no realizan ningún tratamiento en sus vertimientos, con alto contenido de cromo y sales al Río Pamplonita (CORPONOR, 2011), otro estudio elaborado durante dos años y medio por la Universidad Francisco de Paula Santander, del Plan de Ordenación y Manejo de la Cuenca del Río Pamplonita, estableció que el sector de las curtiembres presenta una gran repercusión en la contaminación ambiental, debido a que requiere de cantidades elevadas de agua y de productos químicos para llevar a cabo el procesos, generando sustancias residuales toxicas. (Jhon, 2011) En otro estudio, se halló que las aguas residuales de la curtiembre Tasajero inducen daño en el ADN en linfocitos humanos; además, que estas inducen un incremento en la mutagenicidad en la cepa TA98. (Alfonso Quijano Parra, Carol Castillo T, 2015).

3.5. Metales pesados

Son elementos que presentan números atómicos, pesos atómicos y densidades superiores a 20, 44,956 y 5 gr/cm³ respectivamente, excepto los elementos de los grupos alcalinos, alcalinotérreos, actínidos y lantánidos.

3.5.1. Clasificación de los metales pesados

Tabla N°1. Clasificación de los metales pesados biológicamente y toxicológicamente (Carmona, 2009).

Clasificación	Metales pesados
<i>Metales tóxicos y con gran distribución en el medio ambiente</i>	Cadmio (Cd) Arsénico (As) Mercurio (Hg) Plomo (Pb) Uranio (U)
<i>Metales con trazas esenciales</i>	Cobalto (Co) Cromo (Cr) Manganeso (Mn) Zinc (Zn) Selenio (Se)
<i>Metales biológicamente importantes</i>	Vanadio (V) Níquel (Ni)
<i>Metales con utilidad farmacológica</i>	Platino (Pt) Aluminio (Al) Litio (Li) Galio (Ga)

3.5.2. Impacto de los metales pesados

La contaminación se ha convertido en un escenario común en cada rincón del mundo, sin interesar su nivel de desarrollo o cultura. Una de las circunstancias que

ha propiciado este aumento en la industria, puesto utiliza compuestos tóxicos, como metales pesados, en los procesos de sus productos, (Vullo, 2003; Zúñiga, 1999) estos se acumulan y/o transforman, por medio de procesos biogeoquímicos en los cuales se incorporan y acumulan en la cadena trófica de diversas especies (Reyes, Vergara, Torres, Lagos & Jiménez, 2016), provocando daños al medio ambiente y la salud de las personas, debido a que estos se transportan mediante el suelo, aire y agua (Megharaj, 2003); por tal motivo se clasifica en compuestos altamente peligrosos debido al riesgo de toxicidad que representa para los organismos vivos.

Los metales pesados tienen gran capacidad para enlazarse con numerosos tipos de moléculas orgánicas y se dice que presentan toxicidad si no son metabolizados, por tanto, se almacenan en los tejidos de los organismos (Carmona, 2009). Los metales pesados se caracterizan por su elevada toxicidad en pequeñas concentraciones (Villanueva, 2007), sin embargo, la tendencia a bioacumularse es característico de cada especie química; lo cual conlleva a considerarlos como uno de los grupos químicos más contaminantes. (Rubio, Calderon, Gualtero, Acosta & Sandoval, 2015).

La clasificación de las sustancias según su condición carcinogénica, está encargada por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer, y lo clasifica como; carcinógeno o probablemente carcinógeno humano.

- *Carcinógeno Humano*

Correspondiente al grupo 1, donde se hallan el níquel, cadmio, hierro, los compuestos de cromo hexavalente y arsénico orgánico e inorgánico.

- *Probable Carcinógeno Humano*

Se encuentran en el grupo 2A y los pertenecientes a este grupo son el plomo y sus compuestos (IARC, 2012 citado en Reyes Navarrete et al., 2012)

3.5.3. Cromo

El Cromo pertenece a los metales de transición, también llamados elementos de transición; con símbolo químico Cr y número atómico 24. En su forma natural es sólido, presenta una elevada dureza, es quebradizo, su aspecto es plateado metálico, no tiene olor ni sabor, es muy resistente frente a la corrosión y exhibe un respectivo brillo que caracteriza a los metales, siendo buenos conductores del calor y la electricidad, su punto de fusión es de 1857 °C y el punto de ebullición es de 2672 °C.

Es utilizado en aleaciones, para desarrollar productos donde sus características principales son las de resistencia a altas temperaturas y resistencia de agentes químicos, siendo ampliamente usado en la producción de acero inoxidable (Kamaludeen, Baral, & Lu, 2006); su segunda aplicación más común, es el cromado, siendo el elemento principal de este proceso electroquímico, el cual recubre distintas superficies como son, metales hasta plásticos, con el fin de brindarles mejor apariencia y conseguir una mayor resistencia y durabilidad (Concha y García, 2017), sin embargo, es usado en diferentes aplicaciones, como fungicidas, curtido de cuero, coloración de vidrios, pigmentos textiles, fabricación de catalizadores, baterías, preservación de la madera entre otros (Lenntech.es, 2017). El cromo también se encuentra en rocas, plantas, animales y seres vivos.

El Cromo se produce a partir de cromita, presentándose en formas y estados diferentes; los estados de oxidación son (+2, +3 y +6), siendo las más estables, el

cromo trivalente y el cromo hexavalente, los cuales tienen propiedades químicas diferentes (Tenorio 2006).

El cromo trivalente se encuentra de manera natural en el cuerpo y es indispensable para mantener un estado de salud óptimo, ya que es un oligoelemento, ayudando al cuerpo a utilizar la grasa, el azúcar y las proteínas; la carencia de este puede causar trastornos metabólicos, condiciones del corazón y diabetes (Concha y García 2017). Aunque se debe tener en cuenta que no deben sobrepasar las trazas necesarias en el organismo; ya que, si son mayores a nivel intracelular, pueden producir efectos mutagénicos, ya que puede trastornar la replicación y transcripción del ADN. Además, el Cr^{+3} también alteran la estructura y la actividad enzimática, debido a que puede interactuar con grupos carboxilos y sulfhidrilos de las enzimas. (Azario, et al., 2010).

El grado de toxicidad del Cr^{+6} se puede explicar debido a sus características. Una de ellas es que las membranas celulares son permeables al Cr^{+6} , pero no al Cr^{+3} y otra característica es que el Cr^{+6} se reduce a Cr^{+3} en el interior de las células, en las mitocondrias y en el núcleo (Gil Tocados G., Manrique Plaza A, Fernández JM., 2003)

El cromo hexavalente es un agente oxidante fuerte y muy soluble, permitiendo la penetración las membranas biológicas, con mayor facilidad; este metal provoca estrés oxidativo. En las células se generan intermediarios reducidos de cromo que funcionan como catalizadores de una reacción tipo Fenton, en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), llevando a la formación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO); conduciendo al constante daño oxidativo, provocando oxidación de proteínas, daños a los ácidos nucleicos y peroxidación de lípidos (Gutiérrez y Cervantes, 2008). Los compuestos de cromo trivalente se encuentran bajo condiciones de reducción y no de oxidación y por tal razón, que presentan una toxicidad menor, ya que se dificulta atravesar las membranas, porque se han

formado precipitados (óxidos o hidróxidos) o compuestos insolubles (Azario, et al., 2010).

El Cr^{+6} puede reducirse a Cr^{+3} mediante donantes de electrones inorgánicos, como lo son el S^{2-} y Fe^{2-} en procesos biológicos en los que interviene la materia orgánica o en condiciones anaeróbicas, donde se favorecen los pH ácidos (Nuñez, 2007). No obstante, si el Cr^{+6} presente es elevado pueden impedir la capacidad reductora del ambiente y ser altamente contaminante, es por ello que es catalogada como una sustancia altamente tóxica y carcinogénica (Codd et al., 2001) comparada con el Cr^{+3} (Vankar, 2008),

Dos mecanismos relevantes en la toxicidad del Cr^{+6} , son la capacidad de formar complejos de coordinación con otras moléculas intracelulares y la reducción de Cr^{+6} a Cr^{+3} intracelularmente (Langard S, 1993). En soluciones acuosas el cromo hexavalente puede formar otras especies; existiendo especialmente el ácido crómico (H_2CrO_4) y sus sales ión hidrógeno cromato (HCrO_4^-), ión cromato (CrO_4^{2-}); esta distribución depende del pH de la solución. Las especies sobresalientes, según el pH, son ión cromato a pH sobre 6, ión hidrógeno cromato a pH entre 1 y 6 y ácido crómico a pH menores que 1. El ión dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) es formado cuando supera 1g/L la concentración de cromo (Hossain et al., 2005). La concentración de Cr^{+6} , es equivalente a la cantidad de compuestos reductores u oxidantes en la muestra, el potencial de reducción y la cinética de reacción (Barrera - Diaz, Lugo, & Bilyeu, 2012).

3.5.3.1. Impacto del cromo

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), catalogó el Cr^{+6} y sus compuestos como sustancias cancerígenas para el ser humano, en el

Grupo I (Boffetta P., 1993). Así mismo, la EPA (ACGHI, 2002), el Departamento de Salud y Servicios Humanos (DHHS) de Estados Unidos y el Programa Nacional de Toxicología; ya que es un elemento tóxico que provoca efectos nocivos agudos y crónicos en el organismo humano, en algunos casos de tipo reversibles e irreversibles (Tellez M, Carvajal Roxs, & Gaitan, 2004).

Los compuestos solubles de cromo hexavalente se absorben rápidamente por cualquier vía del organismo, sin embargo, las vías principales, son la piel, la inhalación y la ingestión; ya en el organismo, estos ingresan rápidamente a la membrana celular, uniéndose a la fracción globina de la hemoglobina, ubicándose en los tejidos blandos, el hígado, los huesos, el riñón y el bazo. (Tellez M, Carvajal Roxs, & Gaitan, 2004).

En estudios en el laboratorio con animales, se ha evidenciado que estos compuestos de Cr^{+6} producen tumores en los intestinos, pulmones y estómago, además, puede provocar daños en el hígado, dificultades en el desarrollo y reproductivos, en dado caso producir cáncer.

Estudios con trabajadores expuestos a cromatos durante un periodo de 15 a 20 años, revela que tienen cáncer de pulmón, después de esta exposición. Estos tumores se producen en la periferia del árbol bronquial y por lo general pertenece histológicamente a carcinomas anaplásicos de células pequeñas (Domingo J, 1994).

Las industrias arrojan desechos al ambiente como producto de sus actividades, entre estos desechos se encuentran los metales pesados, como el cromo. El cual se encuentra en dos formas, trivalente y hexavalente.

En su estado trivalente es un elemento esencial e indispensable para el ser humano, participando en diversos procesos fisiológicos y bioquímicos del organismo, como son la intervención en el metabolismo de la glucosa, los ácidos

grasos y el colesterol; también, se encuentra implicado en reacciones enzimáticas tromboplásticas y betaglucoronidasa, a su vez, a ha sido señalado como precursor de la acción periférica de la insulina; pero en condiciones levemente ácidas o en presencia de materia orgánica se transforma en cromo hexavalente, que provoca enfermedades respiratorias, alérgicas, entre otras, además de ser como un agente mutagénico y cancerígeno.

3.6. Mutagenicidad

La mutagénesis, este término se deduce en génesis y mutación; génesis que indica origen, y mutación que indica cambio, por lo tanto, se refiere al origen de las mutaciones y tienen relación con cambios en el material genético. El material genético se encuentra en todos los organismos vivos ya sea en forma de ácido ribonucleico (ARN) o de ácido desoxirribonucleíco (ADN), está constituido por nucleótidos y se encarga de realizar y controlar todos los procesos que se realizan en el organismo, además de almacenar, la información con todas las características del organismo.

Según con la (Organización Mundial de la Salud (OMS), 1985), la mutación se entiende como la “Alteración en la información genética que ocurre como resultado de pequeños cambios (pérdida, adición o reemplazo de bases) alterándose así la secuencia del ADN y afectando la fidelidad del mensaje genético”.

Los mutágenos son sustancias que inducen mutaciones (Sundar, Jain, & Valani, 2018); estos pueden presentarse de forma natural o de forma inducida, es decir inducidas por sustancias químicas, o por medio de radiaciones, u otros agentes mutagénicos (Kremenchutzky & Vásquez, 2015); siendo capaces de estimular en los seres vivos varias clases de cambios deletéreos heredables; ya que causan

variaciones en la estructura del ADN; produciendo enfermedades genéticas como; mal de Parkinson, mal de Alzheimer, síndromes de Down, de Hurler, mal de Tay Sachs, enfermedad de Huntington, diabetes, distrofia muscular de Duchenne y el, entre otros. Este cambio puede ser por reemplazo de bases, una pérdida, adición, alterándose así la secuencia del ADN y afectando la secuencia del mensaje genético (Trosseros Claudia, et al 2006).

Las mutagenicidad es la encargada de examinar las maneras en las que se originan las mutaciones o los cambios en el ADN, estos pueden ser de origen espontaneo o inducido, el espontaneo ocurre cuando el ADN se replica y la inducida ocurre cuando se modifica el ADN por interacción de cualquier sustancia; las mutaciones pueden afectar de diferentes formas al ADN (delección, la cual es una mutación que implica la pérdida de uno o más nucleótidos de un segmento de ADN; y adición, se trata de ganancias de uno o más nucleótidos y en las mutaciones de traslocación ocurre cuando un cromosoma se rompe y los trozos fragmentados se agregan fuera de sitio a cromosomas diferentes), puede que afecte a las bases que lo conforman o de manera más macro afectando a los cromosomas o a secciones de genes, lo más importante de las mutaciones es que pueden ser de origen somático o germinal. Los de origen somático producen tejido anormal, donde se forma un tumor, denominado carcinogénesis; se debe tener en cuenta que algunas sustancias no pueden producir por si solas algún tumor, pero cuando el cuerpo trata de expulsarlas las convierte en metabolitos con propiedades altamente mutagénicas y carcinogénicas. Por el contrario, las de origen germinal son trascendentes debido a que pueden heredarse a la descendencia. (Sundar, Jain, & Valani, 2018)

3.6.1. Antecedentes de mutagenicidad

Muller en 1928, publico los primeros estudios de mutagénesis realizados en *Drosophila melanogaster*, demostrando que los rayos X causaban daño al ADN e

inducían mutaciones en las células germinales. Permitiendo posteriores estudios sobre las mutaciones en condiciones experimentales controladas (Cuenca, Patricia, & Ramírez, Vanessa, 2004).

En 1946, Auerbach y Robson, descubrieron el primer mutágeno de naturaleza química, el gas mostaza; que fue usado ampliamente en la guerra Irán-Iraq, en la primera guerra mundial y en Etiopía. Los efectos que provoca son los mismos que se experimentan a la exposición excesiva a los rayos X (Venitt y Phillips 1995). Este descubrimiento dio paso a una larga lista de mutágenos químicos, encontrándose una gran cantidad de compuestos que inducen mutagenicidad, a diferentes niveles.

En 1953, se propuso modelo de la doble hélice del ADN, por el biólogo estadounidense James Watson y el físico británico Francis Crick, en su estudio demostraron que el ADN es el material hereditario, esto abrió nuevas perspectivas para los estudios de los mecanismos mutagénicos.

Desde 1965, la investigación se ha concentrado en la estructura del ADN y en las funciones relacionadas con su metabolismo, como son los procesos de replicación y reparación.

En 1975, fue desarrollado el Test de Ames por el profesor de la Universidad de Berkeley Bruce Ames (W. Szybalski, 1958), Ames había investigado los mecanismos biológicos por los que la *Salmonella typhimurium* sintetizaba histidina, por lo que desarrolló un método como el del polaco Wacław Szybalski con estas bacterias (B. N. Ames, F. Jacob, P. E. Hartman, 1963). Con el tiempo tanto Ames como otros investigadores han perfeccionado la técnica probando su efectividad con múltiples compuestos carcinógenos.

A través de los años los estudios han demostrado, que no sólo los agentes químicos y físicos generan mutágenos, sino también los agentes biológicos como virus,

bacterias y parásitos, esto sucede cuando producen infecciones crónicas (Venitt y Phillips, 1995). Además, se sabe que los tejidos tienen diferentes sensibilidades a los mutágenos y que en algunos individuos es mayor que en otros. Por otra parte, las mutaciones pueden suceder aleatoriamente, siendo imposible pronosticar en cual célula o gen en particular surgirá una mutación. Sin embargo, con las metodologías moleculares, bioquímicas y citogenéticas con las que se cuentan en la actualidad, es posible descubrir cambios o alteraciones que podrían ser señal de alarma y así, tomar las medidas oportunas para menguar el peligro para la salud (Bonassi y Au, 2002).

Actualmente, los experimentos in vivo e in vitro detectan e incluso cuantifican las mutaciones directas o indirectas en el ADN. Los experimentos in vivo se realizan ensayos citogenéticos y ensayos de micronúcleos en eritrocitos de mamíferos; en los experimentos in vitro, los más utilizados son la electroforesis unicelular, el test de Ames y el ensayo de aberraciones cromosómicas en mamíferos (Ramírez P, Mendoza A, 2008). No hay ningún ensayo o test capaz de detectar todos los tipos de mutaciones inducibles por una sustancia, por lo tanto, se necesitan realizar varios experimentos para identificar el posible efecto del mutágeno.

La Agencia de Protección Ambiental (EPA), Food and Drug Administration (FDA), así como otras entidades de carácter gubernamental y científico aplican pruebas de mutagenicidad, a mezclas complejas como son: aguas de ríos, aguas para consumo, aguas residuales, suelos contaminados, HPAs, metales pesados, partículas aéreas, mezclas volátiles, compuestos químicos, alimentos, entre otros; con el fin de determinar si dichos productos y sustancias, pueden generar mutaciones en seres humanos o si estos contribuyen a resultados adversos en la salud (Sundar eal., 2018). Entre las pruebas de mutagenicidad más empleadas se encuentra el test SOS/umu, el test cometa, el test ELISA y el empleado en el presente estudio, el test Ames.

3.6.2. *Test de ames*

Este test se realiza para detectar mutagenicidad en *Salmonella typhimurium*, que identifica diferentes sustancias químicas idóneas de producir mutaciones en bacterias y cáncer en mamíferos (Ames, 1979), este método es conocido por ser eficiente, rápido, flexible, simple y reproducible (Nepalia et al., 2018) para detectar los posibles efectos mutagénicos y cancerígenos de las sustancias químicas y como estos podían generar una mutación en la bacteria *S. typhimurium*, siendo quizás la más difundida de las pruebas para detectar la capacidad mutagénica de diversas sustancias (Watson et al., 2014).

Según Trossero et al., 2006, el Test de Ames es “un ensayo de mutación bacteriana que emplea *Salmonella typhimurium* histidina-dependiente o *Escherichia coli* triptófano-dependiente, como bacterias indicadoras para la detección de mutágenos, debido a que revierten las mutaciones presentes en las cepas de prueba, restaurando la capacidad funcional del microorganismo para sintetizar un aminoácido esencial”.

Más específicamente, se podría decir, que el test de Ames se basa en un cultivo de *Salmonella* modificado genéticamente para que no pueda sintetizar el aminoácido histidina a partir de nitrógeno inorgánico. Estas bacterias, mientras se encuentran en un medio de cultivo con dicho compuesto, se desarrollan con normalidad y cuando la histidina del medio se termina, las bacterias de *Salmonella* fallecen al depender del aporte externo (bacterias His auxotróficas). Si las células mutantes se tratan con un agente mutágeno, alguna bacteria del cultivo revierte el error que la impedía sintetizar histidina a través de una mutación. Esta inversión restaura la facultad de las células para crecer y forma una nueva colonia de bacterias que sobrevive incluso cuando se acaba el aminoácido (bacterias His prototróficas). Esto indica que hay un mayor número de colonias revertidas (Watson et al., 2014).

Generalmente se utilizan las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium* (Tabla N°1), modificadas genéticamente para evitar la biosíntesis del aminoácido histidina (Sandoval, 2007).

Tabla N°2. Cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium*.

Cepa	Mutación operón histidina	Reversión	Bio uvrB	LPS	Plásmido
TA98	<i>hisD3052</i>	Corrimiento de armazón	Delección	<i>rfa</i>	<i>pKM101</i>
TA100	<i>hisG46</i>	Sustitución	Delección	<i>rfa</i>	<i>pKM101</i>

Es de resaltar el carácter mutante de las cepas de *S. typhimurium*, ya que el carácter auxótrofo de éstas, es confirmado al demostrar el requerimiento de ellas al aminoácido histidina para crecer en placas de agar selectivo. Estas cepas de *Salmonella typhimurium*, pueden reconocer el tipo de mutación, según la cepa que se utilice, puesto que cada cepa es específica para cada mutación; la TA98 (*hisD3052*), muestra mutación de corrimiento de marco de lectura y la TA100 (*hisG46*), corresponde a intercambio de pares de base (Tabla N°1).

La cepa TA98, se halla el gen *his D*, que codifica para la histidina deshidrogenasa; produce una mutación de tipo “frameshift”, esta radica en una adición de un par de bases cercana a una cadena de ocho restos de –GC- repetidos, esto manifiesta mutágenos que originan un desplazamiento en la lectura del ADN, que sucede en regiones del ADN que tienen secuencias de bases repetidas.

A diferencia de la cepa TA98 (*His D3052*), la TA-100 (*His G46*) proviene de la sustitución de una Leucina (GAG/CTC) por una Prolina (GGG/CCC). Esta mutación

se revierte por mutágenos que causan mutaciones en pares de bases principalmente a la sustitución de uno de los pares -GC-.

3.6.2.1. Índice de mutagenicidad

En el Test de Ames, para determinar si una sustancia tiene posible mutagenicidad, se ha establecido un índice de mutagenicidad (IM), en donde las revertantes inducidas pertenecen a las colonias obtenidas al evaluar las diferentes concentraciones de la muestra, y las revertantes espontaneas corresponden a las alcanzadas en los controles positivos al utilizar el toxico de referencia para cada cepa.

La escala establecida para la interpretación de resultados del test Ames, según los valores del índice de mutagenicidad (IM) son; (MT: mutagénico ($IM \geq 2$), LM: ligeramente mutagénico ($1,5 \leq IM < 2$) y NM: no mutagénico ($IM < 1,5$)) (Ames et al., 1975). Si una sustancia o grupo de sustancias analizadas, superan los valores de ≥ 2 , es considerado como mutagénica (Sandoval, 2007).

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

Ecuación N°1. Índice de Mutagenicidad

3.7. Genotoxicidad

Ehrenberg incluyó el término genotóxico, en 1973, para aludir a los efectos letales toxicológicos y hereditarios, tanto en las células germinales como en las somáticas.

La Genética Toxicológica, es la ciencia encargada de estudiar los efectos genéticos adversos y los factores que los provocan; su interés es identificar los eventos que suceden en los procesos de interacción de las genotóxicas con el ADN y la expresión del daño genético. El daño en el material genético se da cuando se produce estrés oxidativo en las células principalmente por las especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden provocar la peroxidación de lípidos, daños en el ADN, reducción de grupos sulfhidrilo, así como alteraciones en las vías de señalización celular y de la homeóstasis del calcio (Valko, Morris y Cronin, 2005; Carmona, 2009).

El potencial genotóxico de una sustancia depende de la variabilidad de cada una de ellas. Las cualidades genéticas en el metabolismo de los xenobióticos, de igual manera la capacidad para efectuar la reparación del ADN, y la capacidad que posean las células para autodestruirse cuando el daño ha sido muy grande. Las células en presencia de xenobióticos revelan un gran número de alteraciones donde el comienzo son las lesiones producidas por los niveles de especies reactivas de oxígeno en los lípidos, proteínas y DNA.

Cuando la genotoxicidad ocurre por metales pesados, indica que es un tipo específico de toxicidad que poseen la facultad de relacionarse con el ADN, directa o indirectamente, produciendo efectos biológicos tóxicos para las células y sus organismos. Los metales pueden provocar genotoxicidad por sí solos o por la interacción entre agentes que potencian sus efectos (Beyersmann y Hartwig, 2008; Carmona, 2009).

3.7.1. Ensayo cometa

En 1970, Piter Cook y colaboradores empezaron las primeras investigaciones sobre este ensayo, hoy conocido como ensayo cometa; estos crearon una técnica

para estudiar la estructura nuclear basados en la lisis de las células con detergente no iónicos y cloruro de sodio a alta molaridad (Cook PR, Brazell IA, Jost E, 1976).

Posteriormente Rydberg y Johanson en 1978, describieron un ensayo cometa basado en la lisis alcalina, para el análisis de células individuales irradiadas (Ryberg B, Johanson, 1997). Fue modificado por varias versiones, con el fin de ampliar la sensibilidad y aplicabilidad del ensayo; en 1984, Östling y Johanson desarrollaron por primera vez este método de electroforesis en microgeles para revelar el daño al ADN a nivel de células individuales; identificaron que la cantidad de ADN que migraba hacia el ánodo aumentaba en las células irradiadas en una forma dosis dependiente. De esta manera, fueron capaces de cuantificar la relación dosis/respuesta calculándose la intensidad de la fluorescencia desde la cabeza del cometa hasta la cola (Ostling O, Johanson KJ, 1984).

En 1988, Singh y colaboradores, introdujeron una técnica en microgeles que involucra la electroforesis en estado alcalino, para identificar el daño al ADN en células individuales. (Olive PL, Banáth JP, Durand RE. 1990).

En 1990, Olive insertó otra versión alcalina de este método. En la actualidad se utilizan dos ensayos cometas, estas dos pruebas muy similares en su principio. El ensayo cometa de Sing, emplea $\text{pH} > 13$, por lo que es conocida como electroforesis alcalina y el ensayo cometa de Olive, utiliza electroforesis neutra con pH de 8,3. Estas técnicas son capaces de descubrir ruptura de las simple y doble cadenas de ADN, el método alcalino es capaz de identificar sitios alcalinos lábiles. Por tal motivo la prueba más utilizada se realiza en condiciones alcalinas (Singh NP, et al., 1991).

El ensayo cometa, es conocido como electroforesis Alcalina de Células Individuales (SCG: Single Cell Gel Electrophoresis Assay), es una prueba que detecta la ruptura de cadenas que pueden ser generadas en la célula causado por diferentes agentes químicos, físicos o procesos celulares (Collins AR, 2004). Este

daño del material genético es determinado por un incremento de fragmentos del ADN que migran fuera de las células del núcleo bajo una forma característica parecida a la cola de un cometa. La longitud de la cola y el contenido de ADN son directamente proporcionales al daño en el ADN.

El ensayo cometa es apropiado para una variada gama de aplicaciones, incluyendo la influencia de la genotoxicidad (Nousis L. 2005) o daño de ADN debido a las especies reactivas de oxígeno (Schraml E. 2009). Es una técnica electroforética sensible para identificar niveles inferiores de daño al ADN, requiere un tamaño pequeño de muestra, de su bajo costo, es un ensayo rápido, reproducible, flexible, simple en el estudio de los datos a nivel de células individuales y su aplicabilidad a cualquier población de células, siendo muy útil en el seguimiento de poblaciones humanas expuestas a radiaciones y a diferentes sustancias mutagénicas (Zapata et al., 2014). Este ensayo es utilizado con amplitud en por los científicos como el biomonitoreo ambiental, la toxicología genética, la epidemiología molecular y la investigación clínica.

3.8. Espectroscopía de absorción atómica (EAA)

Es ampliamente usadas para la identificación de más de 60 sustancias, en múltiples muestras. Algunas de sus aplicaciones es el análisis de: muestras orgánicas, aguas, metales, aleaciones y una gran variedad de muestras de industrias farmacéuticas, químicas, entre otras. Esta técnica se caracteriza por su sensibilidad, facilidad en la operación y la especificidad. (Torres Jessica, 2017). Por tal razón, es la principal técnica de análisis de vertimientos de curtiembres, debido a que permite cuantificar y cuantificar metales pesados, que son generados durante el proceso de curtido (Puja Biswas, Abhinav Kumar Karn, P. Balasubramanian, 2017).

La absorción atómica se fundamenta en que cada elemento tiene un número de electrones relacionado con su núcleo. El estado fundamental, es el estado más estable de la configuración electrónica de un átomo. Al aplicarle energía a un átomo, la energía, esta se absorbe y un electrón será enviado a un estado menos estable conocido como estado excitado. Donde el átomo regresa a su estado fundamental, liberando energía luminosa. En este estado el átomo absorbe energía luminosa a una longitud de onda específica para pasar al estado excitado. Si el número de átomos en el paso de luz se aumenta, la cantidad de luz absorbida también se aumentará. Por la medición de la cantidad de luz absorbida, se puede hacer una determinación cuantitativa de la cantidad de analito. Para identificar elementos específicos, es necesario seleccionar la longitud de onda definida y una fuente de luz especial (Gaitan, 2004).

4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1. Muestreo

La ubicación de la toma del muestreo es en aguas del río Pamplonita en El Cerrito, en el tramo donde se encuentra la curtiembre San Faustino-Vía el Salado Km 8 Cr 34, Norte de Santander, Cúcuta. El muestreo se realizó en la fuente hídrica; antes, durante y después del vertimiento de la curtiembre.

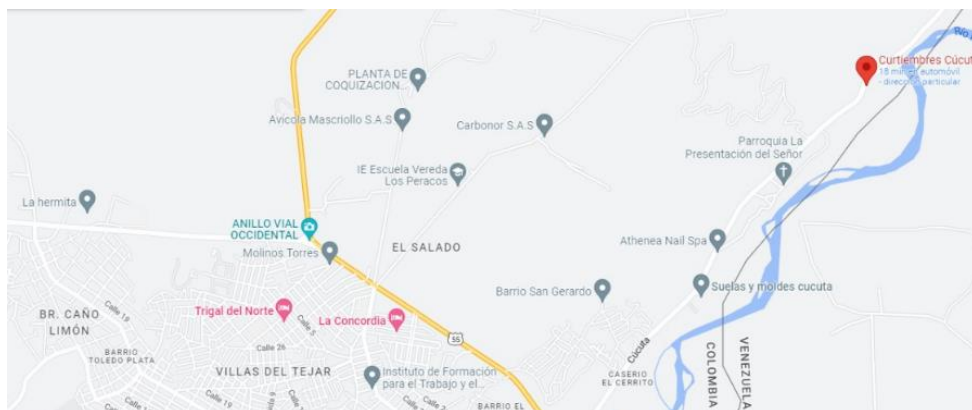


Figura N°11. Ubicación de la curtiembre San Faustino, Cúcuta Norte de Santander

4.1.1. Toma de muestra

Se recolectaron aproximadamente 20 litros de agua en botellas de plástico. Las muestras se recolectaron tres veces, durante un año (teniendo en cuenta los meses de mayor producción que maneja la curtiembre, los cuales fueron abril, agosto, noviembre) ya que son los meses previos a las fechas festivas; los puntos de muestreo fueron antes de la curtiembre, dentro de la industria y en los vertimientos de la curtiembre San Faustino de la ciudad de Cúcuta, Norte de Santander; con el fin de garantizar que los resultados analíticos correspondan a la composición real, estas muestras se recolectaron con cuidado a cincuenta centímetros de profundidad, con replicas por triplicado para cada muestreo.

El Método de referencia aplicado es el descrito en la edición 22 de los Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales 3500-Cr B. APHA/WWA-WEF, APHA (American Public Health Association), WWA (American Water Works Association) y WPCF (Water Pollution Control Federation); siendo las organizaciones a nivel mundial que orienta en la recolección de muestras de agua (PHA, AWWA, WPCF, 1985. Métodos normalizados para el análisis de aguas

potables y residuales. (Ediciones Diaz de Santos, S.A., 1992, n.d.) en los cuales se encuentran conceptos básicos para la selección de un método determinado, además los aspectos que se deben tener en cuenta como, el tiempo, los equipos especiales, viabilidad de los análisis y costos de los mismos, también recomiendan tener precauciones en la toma de la muestra y su forma de conservación para cada uno de los parámetros que se quieran determinar, ya que de esto depende el éxito de un análisis de aguas.

Entre sus objetivos está verificar el cumplimiento de la legislación vigente para aguas destinadas a diferentes propósitos (potable, consumo humano y doméstico previo tratamiento, recreativo) o para vertimientos a cuerpos de agua o alcantarillados.

4.1.2. Concentración y extracción del material orgánico del agua

Cada muestra de agua se concentró Amberlite XAD-2 por medio de una columna que contenía 100 g de resina Amberlite XAD-2 a una velocidad de 15 mL/min; después de pasar toda la muestra, la columna se eluyó con diclorometano. Seguidamente, la muestra se concentró en un rotaevaporador a una temperatura de 60 °C, a 150 rpm; hasta obtener sequedad. Seguidamente se diluyó el residuo en 20 mL de Dimetilsulfoxido al 3% para conservarla.

4.1.3. Tratamiento de la muestra

La muestra se caracterizó y se procedió a realizar determinación y cuantificación de metales solubles en agua, detección de la actividad mutagénica y valoración del daño en el ADN.

Se tendrá en cuenta los criterios analíticos actuales de la química ambiental; con el fin de reducir los errores experimentales que se ocasionan en ellos, esto implica una manipulación mínima de las muestras.

4.2. Determinación de metales pesados

En la determinación de metales pesados presentes en los vertimientos de curtiembres, se utilizó la técnica de espectroscopia de absorción atómica (EAA). Empleándose una lámpara específica para cada elemento (Cd, Cr, Fe, Pb, Cu, Zn) dependiendo de su longitud de onda, como se muestra en la tabla N°3, elaborando una curva de calibración formada con disoluciones de concentraciones conocida a partir del estándar 1000 ppm.

Tabla N°3. Longitudes de onda de los metales pesados

Metal	Longitud de onda (nm)
<i>Cadmio (Cd)</i>	228.8
<i>Cromo (Cr)</i>	357.9
<i>Hierro (Fe)</i>	248.3
<i>Plomo (Pb)</i>	283.3
<i>Cobre (Cu)</i>	324.8
<i>Zinc (Zn)</i>	213.9

4.3. Determinación de la actividad mutagénica

Se determinó el impacto mutagénico de los extractos de las aguas residuales antes, durante y después de la curtiembre, utilizando el test de Ames, planteado por Maron y Ames en 1983 (Vivas, A. et al. 2014). Se utilizó el Laboratorio de Biomogen del Departamento de Biología de la Universidad de Pamplona. Para realizar este test se usaron dos cepas modificadas de *S. typhimurium* (Cepa TA98 y Cepa TA100) las cuales se modificaron en el operón de la histidina con el fin de que se vuelvan histo-dependiente.

Este test se realizó por triplicado para cada una de las tres muestras y la muestra total, obtenidas de los dos diferentes solventes utilizados para las extracciones de estas; cada ensayo por duplicado.

Se marcaron los tubos de ensayo de la siguiente forma: Para TA 98; M₁D₁, M₁D₂, M₁D₃; M₂D₁, M₂D₂, M₂D₃; M₃D₁, M₃D₂, M₃D₃; M_TD₁, M_TD₂, M_TD₃ y C⁺, C⁻. De igual manera con TA 100 y por duplicado para cada una de las cepas. Seguidamente, se adicionó a cada uno de los tubos 500 µL de buffer fosfato; 100 µL de bacterias TA 98 y TA 100; 100 µL de las fracciones extraídas de la curtiembre; de cada una de las dosis a las diferentes concentraciones.

A los controles positivos (C⁺) de las cepas TA 98 y TA 100 se adicionó 100 µL de 4-Nitroquinolina Oxido (4-NQO); y al control negativo (C⁻), se utilizó dimetilsulfoxido (DMSO) al 12 %, se adicionó 100 µL de H₂O destilada estéril. Posteriormente, todos los tubos se llevaron a incubadora (Marca: Binder Thermo Scientific, Modelo: 3522) por 30 min a 37 °C.

Después se tomaron los tubos que contenían Top Agar y que estaban en un baño serológico (09 A Indulab) a 43 °C, se mezclaron con los tubos que cumplieron

los 30 min en incubadora y se agitó en un Vortex-Mixer (Modelo: VM-2000); donde se sirvió en las cajas de petri, previamente rotuladas con las dosis y controles respectivos; que contenían (Top Agar, sales de Vogel Bonner, solución de glucosa estéril, luego de solidificarse y estar 16 h en incubadora), se agitó, se dejó solidificar y se llevó a incubadora a 37 °C por 2 días.

4.4. Detección de daño del ADN

Se usó el ensayo cometa, para la detección de la ruptura del ADN, (Singh et al., 1988). Utilizando el método descrito por Singh y modificada por Ostling y Johanson. El daño presentado en el ADN se estableció según la longitud de la cola del cometa, provocada por la ruptura del ADN. Se determinó que había una ruptura si la longitud era superior a 26 μm .

Las concentraciones utilizadas fueron (12.5 μg , 25 μg y 50 μg), las pruebas se hicieron por triplicado para las tres fracciones y su respectiva dosis, en cada solvente. En estas pruebas cometas se analizaron 200 células individuales (linfocitos) por cada dosis, con el objetivo de identificar la fragmentación del ADN causada por la exposición a contaminantes genotóxicos. Se realizó el siguiente procedimiento: se adquirieron las células (sangre total), a continuación se fijó con agarosa en un portaobjetos, siendo expuestas a una solución de lisis con el propósito de romper su membrana celular, también, se usó una solución amortiguadora para desenrollar el ADN, por la interrupción de los enlaces por puentes de hidrógeno entre las dobles cadenas del ADN, seguidamente, se realizó una electroforesis en tampón alcalino al ADN desenrollado, donde los fragmentos cargados negativamente de ADN migran fuera de las células del núcleo en orientación al ánodo para formar un halo, observándose el rompimiento del ADN de

una modo característica análogo a un cometa; esto se puede observar por medio de un microscópico de fluorescencia y para tabular los datos y determinar el daño al material genético, se utiliza un software.

4.4.1. Extracción de linfocitos

Se usaron linfocitos de sangre periférica para realizar los ensayos de genotoxicidad. Se separaron de la sangre total de los linfocitos, usando un gradiente de ficoll hipaque. Se utilizaron 200 μ L de células, estas se mezclaron con 50 μ L del control, a continuación, se incubó a 37 °C por un tiempo de 1h, y se tomaron 75 μ L de agarosa de bajo punto de fusión, las cuales se mezclaron con 10 μ L de células tratadas para luego ser depositadas en una lámina con agarosa de punto de fusión normal, posteriormente se incubó a 4 °C, durante 6 min. Seguidamente, se retiró el cubre objeto y se adicionó otros 75 μ L de agarosa e incubó a 4 °C, por 6 min. Finalizada la incubación, las láminas base se empaparon en solución de lisis aproximadamente por 1h. Se lavaron las placas con PBS y se realizó electroforesis por media hora sin conectar a la fuente de poder y media hora conectada a 25 v y 300 mA; finalmente se lavaron las placas con solución neutralizante. Acabado el proceso se realizó la coloración con bromuro de etidio, para poder observar en el microscopio de fluorescencia Olympus U-RFKT50 con el objetivo de 25X.

4.5. Análisis estadístico

Se hizo un análisis de varianza ANOVA de un factor, con un nivel de significancia de 0,05; con el propósito de establecer si existen o no discrepancias

estadísticamente significativas entre los resultados de los diferentes metales en las muestras.

Para establecer la discrepancia significativa entre el daño del control negativo y el de cada tratamiento se usará la prueba t de students de dos colas incorporada en el programa Excel.

5. RESULTADOS Y ANALISIS

5.1. Determinación de metales pesados

En la siguiente tabla se comparan los valores máximos permitidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), con los resultados obtenidos de metales (Téllez J, 2003), estos valores son los promedios de la concentración y se presentan el ppm, las cuales se calcularon por medio de las curvas de calibración para cada uno de los metales, que se encuentran en las figuras 12, 13 y 14.

Tabla N°4. Concentraciones en partes por millón (ppm) de metales pesados permitidos en la norma de la OMS y los promedios encontradas en los diferentes puntos de muestreo, durante las tres fechas de muestreo (abril, agosto y noviembre).

<i>Metal Pesado</i>	<i>Valores máximos permitidos (ppm)</i>	<i>Punto Inicial (ppm)</i>	<i>Muestra Curtiembre (ppm)</i>	<i>Punto final (ppm)</i>
<i>Cr</i>	<i>0.05</i>	<i>0,2438</i>	<i>14,0087</i>	<i>0,4563</i>
<i>Pb</i>	<i>0,05</i>	<i>0,3589</i>	<i>0,2929</i>	<i>0,6587</i>
<i>Cd</i>	<i>0,005</i>	<i>0,0001</i>	<i>0,0002</i>	<i>0,0002</i>
<i>Fe</i>	<i>2</i>	<i>ND</i>	<i>8,6570</i>	<i>0,0835</i>
<i>Zn</i>	<i>15</i>	<i>0,1739</i>	<i>2,5690</i>	<i>0,2353</i>
<i>Cu</i>	<i>2</i>	<i>0,0217</i>	<i>0,0849</i>	<i>0,232</i>

En la siguiente tabla se presentan los promedios y desviaciones estándares de los resultados del muestreo en la curtiembre San Faustino.

Tabla N°5. Promedios y desviaciones estándares de las concentraciones en partes por millón (ppm) de metales pesados encontradas en los diferentes puntos de muestreo, durante las tres fechas de muestreo (abril, agosto y noviembre).

Metal pesado		Cr	Pb	Cd	Fe	Zn	Cu
Concentración muestra (ppm)	<i>M₁</i>	0,2438	0,3589	0,0001	ND	0,1739	0,0217
	<i>M₂</i>	14,0087	0,2929	0,0002	8,6570	2,5690	0,0849
	<i>M₃</i>	0,4563	0,6587	0,0002	0,0835	0,2353	0,2320
Desviación estándar	<i>M₁</i>	0,0093	0,0165	5,7735x10 ⁻⁵	0	0,0157	0,0025
	<i>M₂</i>	0,9703	0,0315	1,5275x10 ⁻⁵	0,5857	0,5184	0,0056
	<i>M₃</i>	0,0067	0,0085	6,0828x10 ⁻⁵	0,0057	0,0053	0,0233

Los elementos de cromo, plomo y el hierro; exceden los límites permitidos, en las aguas de los diferentes puntos de muestreo; siendo el cromo el metal que mostró las concentraciones más altas de metales pesados, con concentraciones que fluctúan entre 0,2438 hasta 14,0087 ppm siendo un valor muy alto, ya que el valor permitido para este metal es de 0,05 ppm. En cuanto a los puntos de muestreos donde mayor se encontró las concentraciones de metal pesados fue en el vertimiento de la curtiembre, este comportamiento lo presentaron el cromo y el hierro, siendo el cromo el de mayor concentración, con un valor de 14,0087 ppm muy por encima de los valores permitidos por la OMS. En el punto de muestreo inicial, se observa con preocupación que las concentraciones para el cromo y el plomo sobrepasan los valores de 0,05 ppm que son permitidos, con valores de 0,2438 ppm para el cromo y 0,3589 ppm para el plomo y en el punto final de muestreo las concentraciones presentadas son mayores que la que se encuentran inicialmente de 0,4563 y 0,6587 ppm, respectivamente. Indicando que, a lo largo de la ciudad el río se ha ido contaminando, sin embargo, se observa con alarma que conforme el río cruza la zona industrial de las curtiembres la concentración de cromo incrementa

de manera abrumadora de 0,2438 a 14,0087, siendo ya alta en el punto inicial, en el vertimiento se observan valores muy altos.

Las concentraciones de metales pesados encontrados, es atribuida a las descargas residuales de las curtiembres; debido a los desechos que en ellas se generan. Por tal motivo esta fuente hídrica representa un peligro para la comunidad y el medio ambiente, por presentar altos estados de contaminado por cromo, plomo y el hierro, según los valores máximos permitidos, principalmente del cromo. Como lo evidencian los estudios de Colorado Guerrero, 2018, quien afirma que las propiedades químicas del cromo, se acumulan en los sedimentos, se transforman y se integran al agua. Este metal es considerado perjudicial para los organismos que habitan el ecosistema (flora-fauna) y nocivo para los seres humanos, se clasifica como un agente tóxico, mutagénico y cancerígeno, cuando se encuentra en forma de Cr^{+6} .

En las figuras 12, 13 y 14 se presentan las curvas de calibración para cada uno de los metales, utilizadas para hallar las concentraciones de los metales.

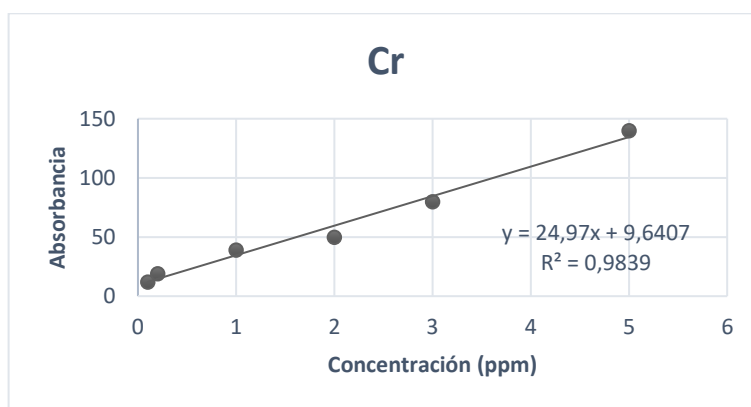


Figura N°12. Curva de calibración para la determinación de niveles de cromo en una muestra de aguas de curtiembre San Faustino, Cúcuta Norte de Santander

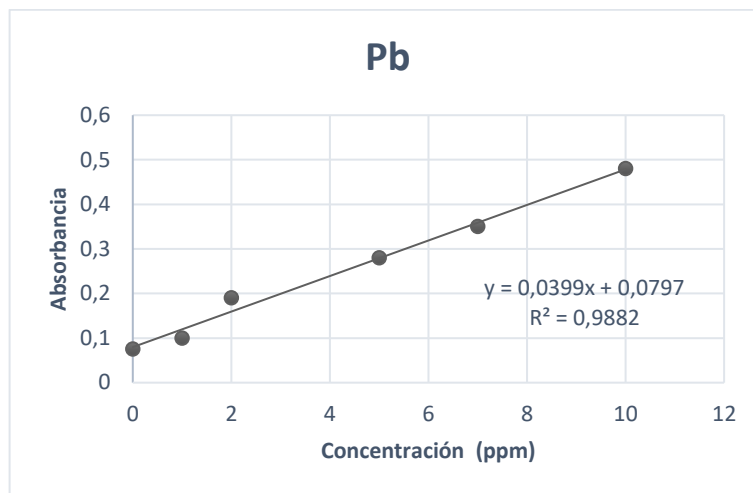


Figura N°13. Curva de calibración para la determinación de niveles de plomo en una muestra de aguas de curtiembre San Faustino, Cúcuta Norte de Santander

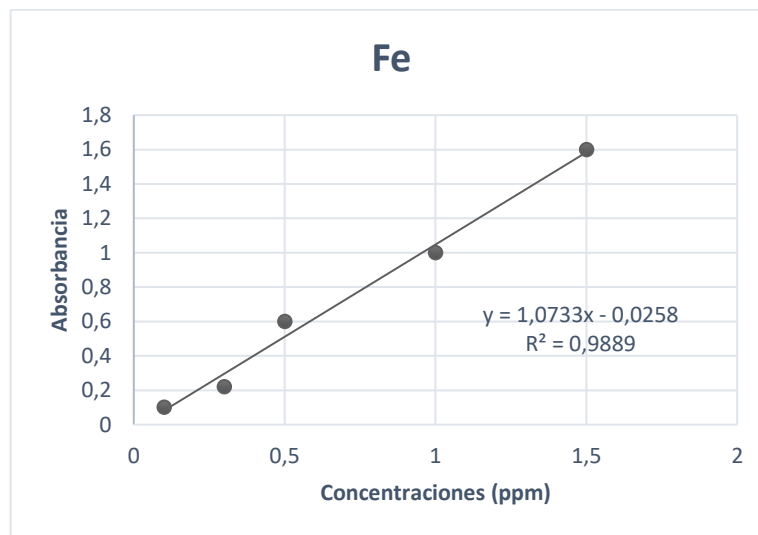


Figura N°14. Curva de calibración para la determinación de niveles de hierro en una muestra de aguas de curtiembre San Faustino, Cúcuta Norte de Santander

5.2. Determinación de la actividad mutagénica

Se determinó el daño de mutagenicidad de los extractos de las aguas residuales de los puntos de muestreo de la curtiembre San Faustino, por medio del ensayo de Ames. En este test la señal de mutación es la reversión de his^- a his^+ , los que crecen en medio mínimo sin histidina son los revertantes. El test de Ames se realizó para los tres puntos de muestreo (M_1 , M_2 y M_3), utilizando dos cepas de *Salmonella thypimurium*, la cepa TA98 en la que se produce la reversión a his^+ por ganancia en un par de bases en el gen mutado y la cepa TA100 en la cual se origina la reversión por sustitución de un par de bases.

Se utilizó control negativo y positivo para cada muestra y se analizaron 107 bacterias, en ausencia de enzimas microsomales. Se toman los resultados como positivos, aquellos que mostraron un incremento significativo de la mutación con respecto al control negativo. Para verificar la reproducibilidad de los resultados se hicieron tres experimentos independientes, cada uno por duplicado. Para el control negativo se utilizó dimetilsulfoxido (DMSO) al 12 % y como control positivo se usó 4 –nitroquinolina oxido (4-NQO).

Se preparó un cultivo de estas bacterias en una placa con una cantidad muy limitada de histidina y concentraciones de 25, 50 y 100 μg . Demostrándose que es mutágeno, ya que provoca mutaciones en el código genético de las bacterias de forma aleatoria, haciendo que algunas de ellas reviertan el error que les impedía sintetizar histidina, siendo estas visibles al comenzar una nueva colonia, como se muestra en la siguiente figura.

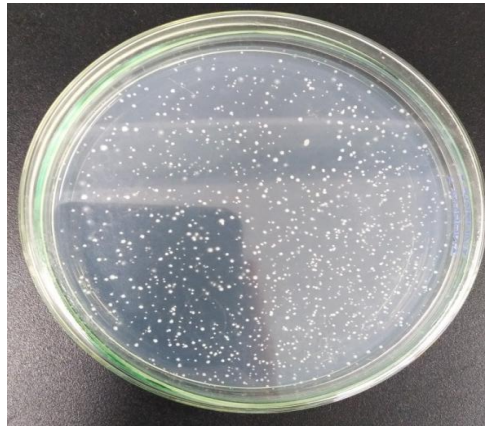


Figura N°15. Revertantes observadas.

Fuente: Propia

De acuerdo a las revertantes observadas (Figura N°15), se realizó el análisis del carácter mutagénico a cada muestra; considerándose positiva todas las muestras, principalmente las muestras (M_2 y M_3) en las dos cepas, puesto que hay una relación de dosis de respuesta entre los revertantes inducidos y las concentraciones; esto se determinó utilizando la metodología sugerida por Sandoval (Sandoval, 2007), con el índice de mutagenicidad (Ecuación N°1), se toma como muestra mutagénica cuando el número de revertantes en la colonias es ≥ 2 . Los datos se ven reflejados en las tablas N°5 y 6.

Tabla N°6. Promedios y desviaciones estándares de la mutagenicidad inducida en *Salmonella typhimurium* TA98 por las muestras tomadas antes, durante y después de los vertimientos de la curtiembre San Faustino de la ciudad de Cúcuta.

Cepa TA-98			
Muestra	Dosis	Promedio ($\bar{x}$)	Desviación estándar (σ)
M_1	D_1	31,666	1,118
	D_2	79,000	1,732
	D_3	63,111	1,054
M_2	D_1	33,333	1,000
	D_2	83,333	2,000
	D_3	63,777	1,641
M_3	D_1	29,444	1,0137
	D_2	79,555	4,4752
	D_3	66,777	3,666

Con base a los datos del promedio de la tabla N°5 se elaboró la figura N°16.

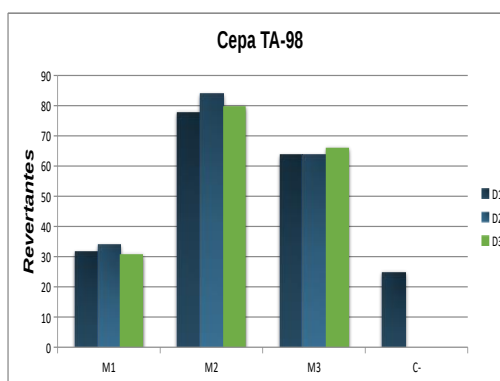


Figura N°16. Promedio de mutagenicidad inducida en *Salmonella typhimurium* TA98 por extractos de aguas residuales de la curtiembre San Faustino de la ciudad de Cúcuta

Fuente: Propia

En las siguientes figuras se observan los resultados de mutagenicidad inducida en cepa TA98 por la muestra tomada antes, durante y después de los vertimientos de la curtiembre San Faustino, durante los tres muestreos realizados en el año (abril, agosto y noviembre), donde se observa un comportamiento similar entre ellos

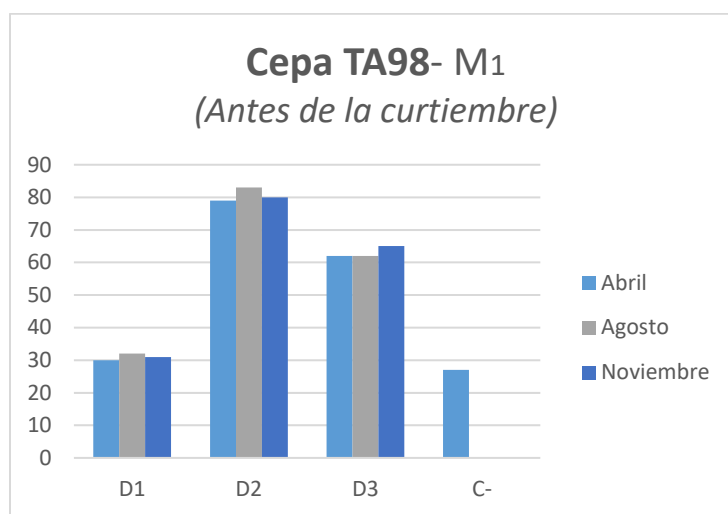


Figura N°17. Mutagenicidad inducida en *Salmonella typhimurium* TA98 por la muestra tomada antes de la curtiembre San Faustino de la ciudad de Cúcuta, durante los tres muestreos realizados en el año.

Fuente: Propia

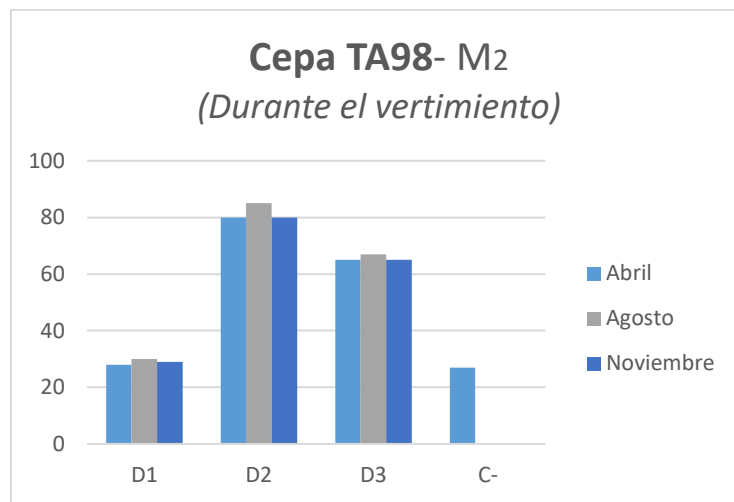


Figura N°18. Mutagenicidad inducida en *Salmonella typhimurium* TA98 por la muestra tomada durante los vertimientos de la curtiembre San Faustino de la ciudad de Cúcuta, durante los tres muestreos realizados en el año.

Fuente: Propia

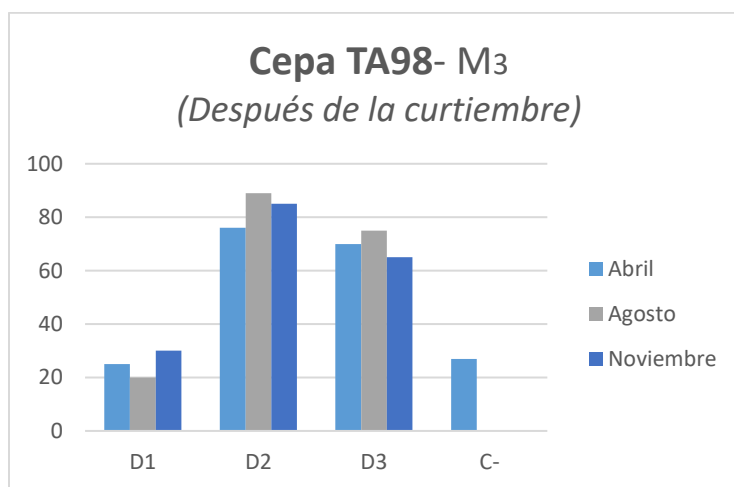


Figura N°19. Mutagenicidad inducida en *Salmonella typhimurium* TA98 por la muestra tomada después de los vertimientos de la curtiembre San Faustino de la ciudad de Cúcuta, durante los tres muestreos realizados en el año.

Fuente: Propia

En la figura N°16 y 20 se muestra el promedio la mutagenicidad en todos los puntos de muestreo de aguas del río, teniendo en cuenta la tabla N°5,

principalmente en las aguas residuales de la curtiembre y posterior a ella (M_2 y M_3 , respectivamente); para la cepa TA98 se muestra que cada una de las dosis sobrepasa el valor del control negativo, en el punto de muestreo antes del vertimiento de la curtiembre (M_1) se observa un crecimiento leve con respecto al C^- , en la M_2 casi se triplica el control negativo y en la M_3 presenta más del doble del control negativo y para la cepa TA100 se muestra un incremento significativo de la mutagenicidad en las aguas residuales de la curtiembre y posteriores a ella, indicándonos que los residuos vertidos por la industria curtiembre provocan mutación por pérdida o ganancia de bases y por sustitución de bases.

Tabla N°7. Promedios y desviaciones estándares de la mutagenicidad inducida en *Salmonella typhimurium* TA100 por las muestras tomadas antes, durante y después de los vertimientos de la curtiembre San Faustino de la ciudad de Cúcuta.

Cepa TA-100			
<i>Muestra</i>	<i>Dosis</i>	<i>Promedio</i> <i>($\bar{x}$)</i>	<i>Desviación estándar</i> <i>(σ)</i>
M_1	D_1	81,555	1,878
	D_2	88,888	1,691
	D_3	83,333	2,598
M_2	D_1	190,777	3,192
	D_2	268,444	2,877
	D_3	224,000	3,464
M_3	D_1	180,333	4,415
	D_2	199,666	2,179
	D_3	182,222	3,9299

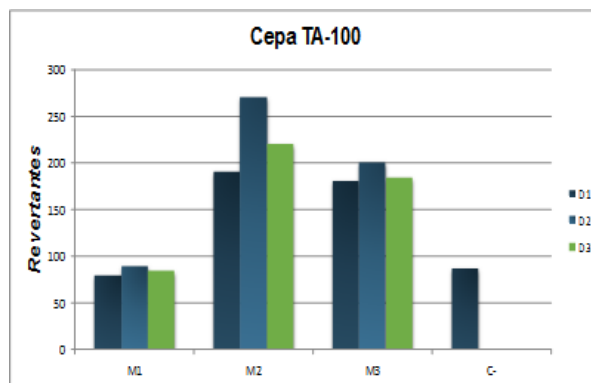


Figura N°20. Promedio de mutagenicidad inducida en *Salmonella typhimurium* TA100 por extractos de aguas residuales de la curtiembre San Faustino de la ciudad de Cúcuta

Fuente: Propia

En las figuras 17, 18 y 19 se observan los resultados de mutagenicidad inducida en cepa TA98 por la muestra tomada antes, durante y después de los vertimientos de la curtiembre San Faustino, durante los tres muestreos realizados en el año (abril, agosto y noviembre), donde se observa un comportamiento similar entre ellos

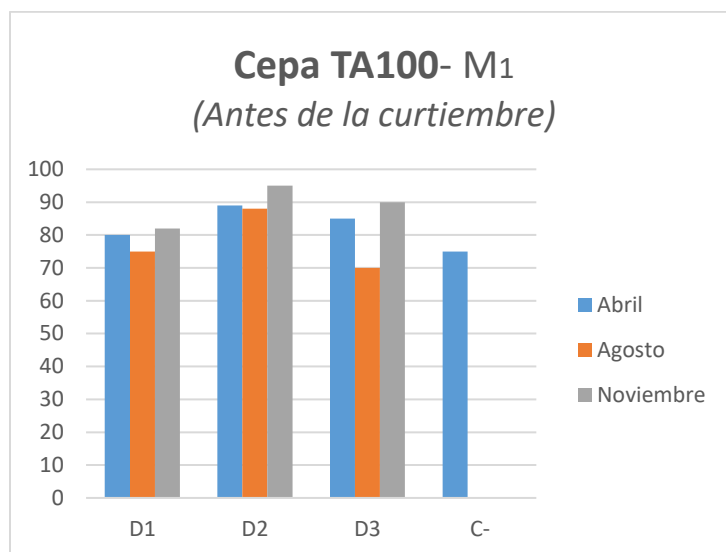


Figura N°21. Mutagenicidad inducida en *Salmonella typhimurium* TA100 por la muestra tomada antes de la curtiembre San Faustino de la ciudad de Cúcuta, durante los tres muestreos realizados en el año.

Fuente: Propia

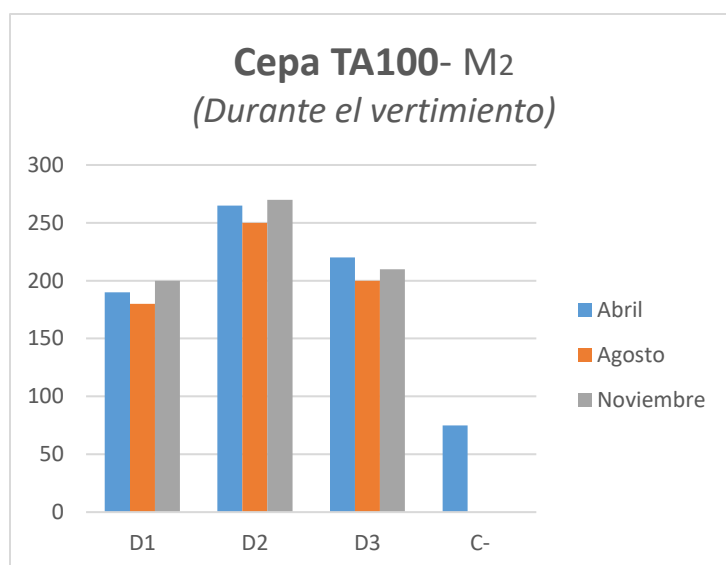


Figura N°22. Mutagenicidad inducida en *Salmonella typhimurium* TA100 por la muestra tomada durante los vertimientos de la curtiembre San Faustino de la ciudad de Cúcuta, durante los tres muestreos realizados en el año.

Fuente: Propia

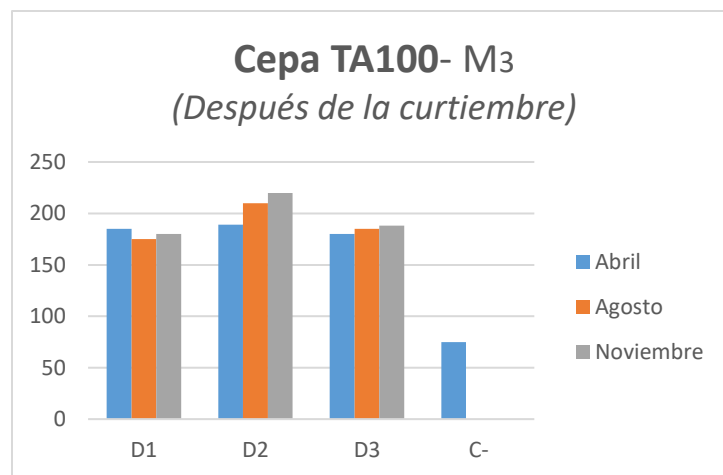


Figura N°23. Mutagenicidad inducida en *Salmonella typhimurium* TA98 por la muestra tomada después de los vertimientos de la curtiembre San Faustino de la ciudad de Cúcuta, durante los tres muestreos realizados en el año.

Fuente: Propia

Al aumentar el valor de la concentración de metales pesados, el promedio del índice de mutagenicidad para cada cepa aumentó su magnitud, siendo mayor para la cepa TA100 y disminuyendo para la cepa TA98, indicando una mayor sensibilidad al aumento de las concentraciones, coincidiendo con estudios donde se afirma que la cepa TA100 es más propensa a la toxicidad por la presencia de metales pesados, aumentando los valores promedio al estar en presencia de la mezcla S9. Esto se debe a que, al reducir la biodisponibilidad de los iones metálicos, se disminuye su efecto tóxico sinérgico, permitiendo una mayor sobrevivencia de la población bacteriana y, por ende, una mayor capacidad de respuesta (Jurado, J.; Durán, E. A.; Pueyo, C, 1993). Para la cepa TA98, en presencia del activador enzimático S9 resta biodisponibilidad y permite que las bacterias tengan una menor interacción con los iones metálicos.

Esto indica que la elevada concentración de metales pesados desencadenó mutaciones de cambio de lectura, (detectados por la TA98), y de mutágenos de

sustitución de pares de bases (detectados por la TA100) (Mortelmans, K.; Zeiger, E. 2000), situación que coincide con muchos estudios de aguas realizados a nivel mundial, como se evidencia estudios realizados en una población expuesta a las actividades de curtiembres en Bogotá-Colombia, donde se encontró alteraciones en la salud de un 6,3% de la muestra (827 personas), debido a los altos niveles de cromo, superiores 10 µg/L (Suárez et al., (2012). En otro estudio de metales realizado a aguas, se identificó que los contaminantes más abundantes son el cromo y el plomo y que estos causan mayores repercusiones en la calidad del recurso hídrico y la flora y fauna acuática, gracias a su capacidad de bioacumulación (Molina, Aguilar, & Codovez, 2010).

En otro estudio realizado a las aguas proveniente del río Bogotá, los autores explican que el ser humano también se ve afectado de forma indirecta, debido al consumo de productos cárnicos, peces, hortalizas y/o verduras expuestas con contenido de contaminantes, principalmente metales pesados. Ya que estos tienden a distribuirse en diferentes órganos, tejidos, huesos y dientes, acumulándose con el paso del tiempo y variando de acuerdo con la edad y el nivel de exposición de un individuo (Reyes, Vergara, Torres, Díaz, & Gonzales, 2016). Según la evidencia, el órgano más afectado por este metal pesado es el riñón, debido a que produce cambios en las mitocondrias e inflamación de las células del epitelio, causando serias alteraciones funcionales que provocan aminoaciduria y siendo precursor del síndrome de Fanconi. (Santoyo, 2009).

El marco del Programa Nacional de Toxicología realizó un estudio en el año 2008, en el cual se demuestra que la presencia de metales pesados en el agua es el causante de cáncer en ratas y ratones de laboratorio. Esta y otras investigaciones llevaron a la Oficina de Evaluación de Riesgos y Salud Ambiental de California a la conclusión de que también causa cáncer en los seres humanos (ATSDR, 2012).

5.3. Detección de daño del ADN

Se halló que las dosis analizadas contribuían al daño al ADN en linfocitos humanos expuestos a los compuestos presentes en las aguas residuales de curtiembres, como se muestra en la Figura N°24, donde se observan fotografías de algunos linfocitos, tomadas mediante el microscopio de fluorescencia, durante los ensayos cometas.

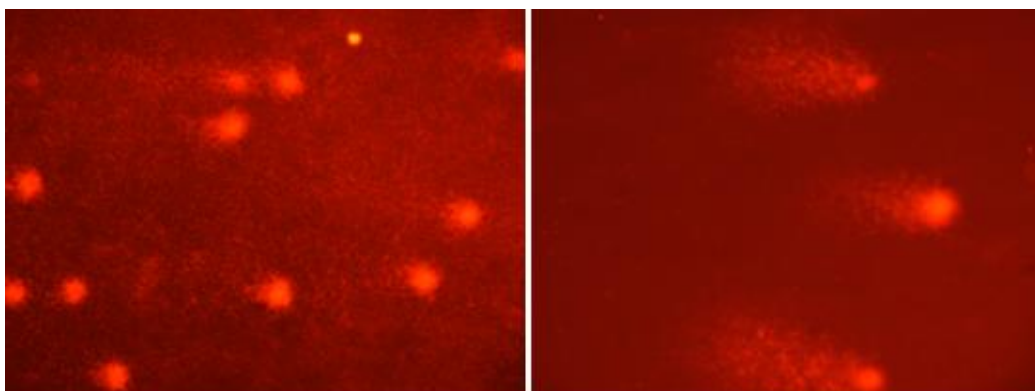


Figura N°24. Cometas observados en los ensayos.

Fuente: Propia

Estos “cometas” observados, corresponden a un incremento de fragmentos del ADN que migran fuera de las células del núcleo; generados por rompimientos del ADN; ya que la longitud de la cola y el contenido de ADN son directamente proporcionales al daño en el ADN. Se ha demostrado que, si el daño en el ADN observado por medio de esta técnica incrementa, la migración de los fragmentos es mayor (Mitchelmore y Chipman, 1998; Zapata et al., 2014); es por esta razón que la longitud de la cola del cometa indica el grado de actividad genotóxica (Zapata et al., 2014), muy probablemente esta actividad genotóxica se deba a la presencia de metales pesados, puesto que muestra relación con la sensibilidad de las cepas TA98 y TA100, en el ensayo de *Salmonella* para detectar la actividad mutagénica.

Se realizó un promedio de tres experimentos individuales y, en cada uno de ellos, se analizaron 200 células, para así determinar, con base en la longitud en μm , la migración de los fragmentos del ADN, como se puede ver en la siguiente tabla. De acuerdo a los valores obtenidos en cada una de las dosis y comparados con el control negativo, se notó una tendencia creciente de daño genotóxico según el aumento de la concentración, conllevando a un incremento de las lesiones primarias sobre el ADN, lo cual, está directamente relacionado con el aumento en las alteraciones genéticas celulares.

Tabla N°8. Daño del ADN en la sangre periférica humana (linfocitos) inducida por el extracto orgánico del agua de curtiembres.

Dosis (μg)	X promedio (μm)
D_1	57
D_2	83
D_3	95
PBS	20
H_2O_2 50 mM	120

Como control positivo se usó peróxido de hidrógeno (H_2O_2 50 mM), como control negativo se utilizó PBS. Se determinó la longitud promedio de cola de un total de 200 células.

Los resultados los podemos explicar teniendo en cuenta que se ha demostrado que la carcinogenicidad del cromo puede ser promovida a través de varios mecanismos, incluyendo la reducción metabólica intracelular del (Cr^{+6}), produciendo especies de cromo capaces de interactuar con el ADN, las cuales son las responsables de los efectos mutagénicos y genotóxicos (Téllez J, Carvajal R,

Gaitán A, 2004). El cromo también induce aberraciones cromosómicas, rupturas de cadenasimple, aductos, sitios AP, oxidación de bases, entrecruzamientos, daño al enlace fosfodiester, daño en los sistemas de reparación, sustitución y delección de bases (Quijano Parra, A., Castillo T, C., & Meléndez Gélvez, I. 2015). El daño encontrado, se puede atribuir no sólo a la presencia del cromo, sino a metales como el plomo, cadmio, hierro, zinc y cobre, debido a su alta actividad mutagénica, según lo permitidos por las organizaciones que rigen estos valores. Se observó una tendencia creciente de daño celular según el aumento de la concentración, indicando un daño de manera progresiva en las diferentes concentraciones evaluadas. Además, se puede observar que los fenómenos de emanación de tóxicos ambientales en las industrias curtiembres, provoca posterior bioacumulación y biomagnificación de metales pesados, ya que, se observa aumento del daño genético posterior al vertimiento de la curtiembre.

5.4. Correlación entre la presencia de metales pesados con el daño genotóxico y mutagénico del ADN

A nivel químico la principal causa del elevado nivel de toxicidad de los metales pesados es que poseen una gran capacidad para unirse con moléculas orgánicas. Estos efectos tóxicos en sistemas biológicos dependen de reacciones con ligandos que son esenciales para su asimilación, y a su vez, los ligandos están presentes en gran abundancia en la célula, ya sea formando parte de moléculas de mayores dimensiones o como moléculas aisladas. Los metales pesados presentan gran afinidad como principales ligandos, por grupos sulfidrilo, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo. El resultado de estas uniones ligando metal puede ser muy perjudicial para la célula, destacando en este aspecto sobre otros fenómenos como:

- *La acción genérica sobre proteínas por inhibición de la actividad o por disrupción en la estructura de las mismas*

- El desplazamiento de elementos esenciales de su metabolismo estándar, produciendo efectos de deficiencia

- La catálisis de reacciones de generación de moléculas ROS (Reactive Oxygen Species) o radicales libres que provocan fenómenos de estrés oxidativo

Por lo tanto, la toxicidad por metales pesados puede ser explicada por la capacidad de inducir estrés oxidativo en las células (Gurer-Orhan y Nukhet, 2001; Carmona, 2009; Ercal, Gurer-Orhan y Nukhet, 2001). Los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno generados por los metales pueden promover distintos tipos de daño en el ADN, tales como roturas de cadena simple y modificaciones en sus bases nitrogenadas. Los metales también pueden inducir genotoxicidad por su habilidad para inhibir los mecanismos de reparación del ADN. Se ha demostrado que los metales pesados afectan la fidelidad en la replicación del ADN pues están capacitados para inhibir las enzimas involucradas en este proceso, de igual forma, pueden producir alteraciones en los procesos de metilación (Wedrychowski, Schmidt y Hnilica, 1986; Singh y Snow, 1998; Vaisman, Warren y Chaney, 2001; Carmona, 2009).

Los principales daños que provoca el estrés son;

- Inactivación de proteínas y enzimas, fundamentalmente por la oxidación de los grupos sulfidrilo, dando lugar a puentes disulfuro que causan la interrupción del funcionamiento normal de la proteína o enzima.

- Peroxidación lipídica de membranas, causando rupturas y subproductos de las cadenas hidrocarbonadas.

- *Efectos de daño sobre el ADN, estos pueden ser desperfectos genotóxicos: mutaciones, aberraciones cromosómicas, alteraciones en la síntesis y reparación de ácidos nucleicos y transformaciones celulares.*

El estudio del comportamiento oxidativo de los metales pesados en el interior de la célula de un organismo viene determinado en gran medida por dos tipos de reacciones químicas, causantes a su vez de dos elementos ROS (*Reactive Oxygen Species* clave: H_2O_2 y O_2^-).

- *Reacción de Fenton*

Consiste en la descomposición del peróxido de hidrógeno mediante la adición de sales de hierro, para formar un radical $\text{OH}\cdot$.

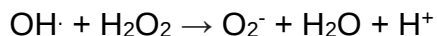


Ecuación N°2. Reacción de Fenton

Radicales formados por el radical $\text{OH}\cdot$, generando otros radicales, oxidando o reduciendo especies químicas presentes en el medio.

- *Reacción de Haber – Weiss*

Es un ciclo de dos reacciones. La primera aprovecha el radical $\text{OH}\cdot$ producido por la reacción de Fenton para reaccionar con más peróxido y originar un elemento crucial en las reacciones de óxido reacción elaboradas en la célula, el radical superóxido:



Ecuación N°3. Primera reacción de Haber – Weiss

El radical superóxido recién producido va a reaccionar entonces con más peróxido de hidrógeno, para volver a dar los productos no metálicos de la reacción de Fenton.



Ecuación N°4. Segunda reacción de Haber – Weiss

El resultado final es que el hierro se ha oxidado (en Fenton), y el aceptor final de electrones es el oxígeno (reacción de Haber-Weiss), que se libera en forma de oxígeno molecular, cerrando el proceso de cesión de los electrones por oxidación del metal. Acoplado a todo el sistema formado por las distintas reacciones, se producen radicales $\text{OH}\cdot$ que, como se ha mencionado anteriormente, pueden seguir desarrollando un mecanismo en cascada de consecuencias importantes para el equilibrio interno de la célula. Además, estos $\text{OH}\cdot$ inducen daños sobre el ADN, lo que puede conducir a carcinogénesis por alguna de estas rutas:

- *Alteraciones producidas en oncogenes y factores de crecimiento*
- *Alteraciones en los genes supresores de tumores*
- *Alteraciones en los genes reguladores del crecimiento.*

Como ha quedado descrito, en este conjunto de reacciones participan dos elementos ROS (O_2^- y H_2O_2) que han demostrado jugar un papel esencial en la interacción de los metales pesados con las células de los seres vivos.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos a partir de la presente investigación, permitieron determinar que las aguas del río Pamplonita en el sector de San Faustino de la ciudad de Cúcuta, presentan altas concentraciones de metales pesados, tales como cromo, hierro y plomo; sobrepasando los límites de los valores permitidos por la Organización Mundial de la Salud. La mayor concentración de estos metales la presentó el cromo, después del vertimiento de la industria curtiembre, debido a los desechos que en ellas se generan.

Las industrias curtiembres de la ciudad de Cúcuta, aportan a las aguas del río Pamplonita compuestos que inducen mutagenicidad en las cepas de *S. typhimurium* TA-98 y TA100, dicha mutagenicidad se puede atribuir a la presencia de compuestos mutagénicos como metales pesados que pueden causar desplazamiento del marco de lectura o pérdida o ganancia de bases.

La genotoxicidad es un indicador importante del impacto de los contaminantes, ya que pueden estar asociados con efectos en la salud de la población. Se evidenció por medio del ensayo cometa que las muestras de agua del río Pamplonita en el sector de las industrias curtiembres de San Faustino, presentan aumento del daño genético, debido a los vertimientos de estas industrias, que desechan sus contaminantes y estos pueden afectar la constitución genética produciendo mutaciones génicas o variaciones cromosómicas.

Por lo que el agua de este río representa riesgo para la población y el medio ambiente, ya que puede considerarse como altamente mutagénico y genotóxico, debido a que presentan elevadas concentraciones de metales pesados y estos causan un elevado nivel de toxicidad, ya que poseen una gran capacidad para

unirse con moléculas orgánicas y pueden inducir estrés oxidativo en las células, esto puede ocasionar distintos tipos de daño en el ADN, tales como roturas de cadena simple y modificaciones en sus bases nitrogenadas. Los metales también pueden inducir genotoxicidad por su habilidad para inhibir los mecanismos de reparación del ADN.

7. RECOMENDACIONES

Es prioritario que el personal involucrado en las industrias curtiembre se concienticen por proteger y conservar el ambiente, antes de que sea demasiado tarde, por ello se requiere con urgencia, que se busquen estrategias y métodos para disminuir las cantidades de metales pesados en estas industrias y los posteriores procesos de vertimientos.

Asimismo, se recomienda que las autoridades ambientales y la administración municipal, ejerzan mayor control con todas las actividades que estén afectando la calidad natural del recurso hídrico, ya que es un efluente hídrico importante de la región.

Se considera pertinente unir esfuerzos por parte de las universidades y centros de investigación de la región, con el fin de adelantar trabajos de investigación, que permitan ampliar los conocimientos de los contaminantes en las fuentes hídricas y posibles soluciones a estos, que minimicen el impacto en el medio ambiente y las posibles complicaciones de salud que esto conlleva.

8. REFERENCIAS

- Alfonso Quijano Parra, Carol Castillo T, I. M. G. (2015). Potencial mutagénico y genotóxico de aguas residuales de la curtiembre tasajero en la ciudad de Cúcuta, Norte de Santander, Colombia. *U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 18, N.1, 13–20. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S012342262015000100003&script=sci_abstract&tlng=pt
- ACGHI. American Conference Gubernmental Hygients Industrials. “TLVs and BEIs”. Cicinatti. E.U. 2002
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). 2012. Reseña Toxicológica del Cromo (en inglés). Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública. <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxFAQs>
- Ana María Sandoval Villasana. (n.d.). *Ensayo de mutagenicidad con la bacteria Salmonella typhimurim. Prueba de Ames*. 319–344.
- Aranda Salazar, E. M., & Orrellando Angulo, L. F. (2016). Ingeniero Ambiental. Influencia de la Concentracion del Ácido Formico y Peroxido de Hidrogeno en la recuperacion de cromo (III) presenta en la viruta de cuero curtido. Universidad Nacional de Trujillo -Facultad de Ingeniería Química-Escuela de ingeniería de Ambiental, Trujillo, Perú. Obtenido de <http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/1838/Aranda%20Salazar%20C%20Edson%20Manuel.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Azario, Ricardo R, Salvarezza, Susana A, Ibarra, Alexis, & García, María del C. (2010). Efecto del Cromo Hexavalente y Trivalente sobre el Crecimiento de Escherichia coli ATCC 35218. *Información tecnológica*, 21(1), 51-56. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642010000100009>
- B. N. Ames, F. Jacob, P. E. Hartman, Chromosomal alterations affecting regulation of histidine biosyntetic enzymes in Salmonella, *Journal of Molecular Biology* 7, 1963, 23-28
- Boffetta P. “Carcinogenety of trace elements with reference to evaluation made by international agency for research on cancer. *Scandinavian Journal Working Environmental Health*. Vol. 19, suppl. 1. Pgs 67-70. 1993
- Bonassi, S. & W.W. Au. 2002. Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutat. Res*. 511: 73-86.
- Caracol Radio. (2018). Caracol.com.co. Obtenido de Contaminación: http://caracol.com.co/emisora/2018/09/27/bogota/1538050909_394544.html
- Colorado Guerrero, G. (2018). Actividad mutagénica asociada a la contaminación

- por efluentes de curtiembres en aguas y sedimentos del río Cerrito [recurso electrónico]. [online] Colombia: Universidad de Valle. From: <http://hdl.handle.net/10893/15315>
- Collins AR. The Comet Assay for DNA Damage and Repair. Principles, Applications, and Limitations. *Mol Biotechnol*. 2004; 6: 249-59.
- Corporación Autónoma Regional de la Frontera Nororiental CORPONOR. (n.d.). Evaluación y análisis de la calidad del Río Pamplonita. *Norte de Santander*.
- Covington A. Modern tanning chemistry. *Chemical Society Reviews*.(1997), 111 - 126.
- CUBEROS Esther; RODRÍGUEZ Alba; PRIETO Edgar. Niveles de Cromo y alteraciones de salud en una población expuesta a las actividades de curtiembre en la ciudad de Bogotá, Colombia. *Rev. Salud pública*. Vol. 11, 2009.
- Cuenca, Patricia, & Ramírez, Vanessa. (2004). Mutagénesis ambiental y el uso de biomarcadores para predecir el riesgo de cáncer. *Revista de Biología Tropical*, 52(3), 585-590. Retrieved April 12, 2022, from: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003477442004000300020&lng=en&tlng=es.
- Chunxiao Zhang, Jiang Lina, Xinju Jia, B. P. (2016). A salt-free and chromium discharge minimizing tanning technology: the novel cleaner integrated chrome tanning process. *Journal of Cleaner Production*, 112(1), 1055–1063. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.07.155>
- Domingo J. "Metal – induced developmental toxicity in mammals: a review". *Journal of Toxicology and environmental Health*, 42: 123-141, 1994
- Flaherty E. "Chromium as an essential and toxic metals". *Scandinavian Journal Working Environmental Health*. Vol. 19, suppl. 1. Pgs 124-125. 1993
- Gil Tocados G., Manrique Plaza A, Fernández JM. "Dermatitis de contacto por cemento. Toxicocinetica del cromo. Fuentes de exposición" Facultad de Medicina. Universidad de Cadiz. España. 2003.
- Gil Tocados, 2003; Oflaherty, Kerger, Hays & Pasteunbach, 2001. Citado por: Montoya, Nancy; Casas, Patricia; Wandurraga. Plomo, Cromo III y Cromo VI y sus efectos sobre la salud humana. En: *Ciencia & Tecnología para la Salud Visual y Ocular*. Junio 2010. Vol. 8, No. 1 / pp. 77-88 32 TÉLLEZ, Op cit, P. 50.
- Jurado, J.; Durán, E. A.; Pueyo, C. Genetic differences between the standard Ames tester strains TA100 and TA98. *Mutagenesis*. 1993. 8(6): 527 – 532.
- Kremenutzky, E., & Vásquez, A. (2015). *Guía de Genética Mutaciones*. Retrieved from: http://alevazquez.com.ar/archivos/pdfs/G15_01.pdf
- Langard S. "Rol of chemical species and exposure characteristics in cancer among

- persons occupationally exposed to chromium compounds". Scandinavian Journal Working Environmental Health. Vol. 19, supl. 1. Pgs 81-89. 1993.
- Ledesma, D., López, A., Ramírez, S., & Triana, D. (2017). Calidad de vida y efectos en salud asociados a la generación de olores ofensivos por industrias de curtiembres en los habitantes de dos veredas de Villapinzón durante el 2017-I (tesis de pregrado). Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, Bogotá. <https://repository.udca.edu.co/bitstream/11158/865/1/proyecto%20calida%20de%20vida%20final%2012.pdf>
- Lenntech BV. Efectos del Cromo sobre la salud. [En línea] Disponible en internet: <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/cr.htm#ixzz4VBeFJ9OL> 30 EPA: Environmental protection agency de los EEUU.
- Mario González, J. (2012). Mecanismos de nitrosación de sustratos complejos bioactivos. Tesis Doc. Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Física, Universidad de Salamanca. España. Retrieved from file: [https://C:/Users/Windows%2010/Downloads/DQF_marioglzjim_nitrosbioact%20\(1\).pdf](https://C:/Users/Windows%2010/Downloads/DQF_marioglzjim_nitrosbioact%20(1).pdf)
- Martínez, S., & Romero, J. (2018). Revisión del estado actual de la industria de las curtiembres en sus procesos y productos: un análisis de su competitividad. Revista Facultad de Ciencias Económicas, xxvi(i)113-124. <https://doi.org/10.18359/rfce.2357>.
- Miller S., GangnetA, Worden R., Reporte técnico para la industria de Curtiembres en el Peru. Informe para el ministerio de industria, turismo, integración y comercio internacional (MITINCI). [Internet]. 2017 [01 de marzo de 2017]; Pag 5-18. Disponible en: 7-15. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsars/e/fulltext/conam/conam.pdf>
- Ministerio de Trabajo y Seguridad Social. "Decreto 1295 de 1994. Sistema General de Riesgos Profesionales". Bogotá, Colombia.
- Mortelmans, K.; Zeiger, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. Mut. Res. 2000. 455: 29-60.
- Olive PL, Banáth JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. Radiat. Res. PubMed. 1990 Apr;122(1):86-94.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (1985). Environmental health. Criteria 51.

- Ostling O, Johanson KJ. Microeletrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1984;123(1):291-8.
- Páez Pacheco, H. Y., & Rincón Castro, L. A. (2019). Uso del óxido de grafeno como adsorbente en la remoción de cromo en una matriz acuosa con características de agua residual producto de la actividad de curtido. Retrieved from https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_ambiental_sanitaria/781
- Quijano Parra, A., Castillo T, C., & Meléndez Gélvez, I. (2015). Potencial mutagénico y genotóxico de aguas residuales de la curtiembre Tasajero en la ciudad de Cúcuta, Norte de Santander, Colombia. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 18(1), 13–20. <https://doi.org/10.31910/rudca.v18.n1.2015.449>
- Reddy, E.P., R.K. Reynolds, E.Santos & M. Barbacid. 1982. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 300: 149-152.
- Revista Virtual Pro. (2007). *revistavirtualpro.com*. Obtenido de Industria de cuero y las curtiembres: <https://www.revistavirtualpro.com/revista/industria-del-cuero-y-lascurtiembres/14>
- Rey de Castro Rosas, A. C. (2013). *Recuperación de cromo (III) de efluentes de curtido para control ambiental y optimización del proceso productivo*. Lima.
- Ryberg B and KJ Johanson. Estimation of DNA Strand Breaks in Single Mammalian Cells. In: Hanawalt, P.C., E.C. Friedberg and C.F. Fox, (Eds.), *DNA Repair Mechanisms*. NY Academic Press; 1997; p. 465-468.
- Sandoval, A. M. (2007). Ensayo de mutagenicidad con la bacteria *Salmonella typhimurim*. Prueba de Ames. Instituto Nacional de Ecología, 319–344. <https://micrositios.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/573/cap21.pdf>
- Secretaria Distrital de Ambiente. (2016). *ambientebogota.gov.co*. Recuperado el 2018, de Guía de Producción más limpia en la Industria de Curtido: <http://www.ambientebogota.gov.co/documents/24732/3987253/Gu%C3%ADa+de+producci%C3%B3n+m%C3%A1s+limpia+para+el+sector+curtiembres+de+Bogot%C3%A1.+Enfoque+en+vertimientos+y+residuos.pdf>
- SINGH, N.P; McCOY, M.T ;TICE, R,R; SCHNEIDER, E.L.1998.A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells.*Exp.Cell Res*.75(1):184-91
- Sundar, V. J., Raghavarao, J., Muralidharan, C., y Mandal, A. B. (2011). Recovery and utilization of chromium-tanned proteinous wastes of leather making: a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 41(22), 2048–2075. doi:10.1080/10643389.2010.497434
- Sundar, R., Jain, M. R., & Valani, D. (2018). *Mutagenicity Testing*. *Mutagenicity*:

Assays and Applications. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809252-1.00010-9>

- Téllez J, Gutiérrez M, Patiño N. "Memorias Del Curso Taller Aspectos Toxicologicos de Plaguicidas Y Metales Pesados". Departamento de Toxicología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Julio de 2003.
- Téllez, J., Roxs, M. C., & Gaitán, A. M. (2004). Aspectos toxicológicos relacionados con la utilización del cromo en el proceso productivo de curtiembres. *Revista de la Facultad de Medicina*, 52(1), 50-61.
- Tenorio Rivas, G. 2006. Caracterización de la biosorción de cromo con hueso de aceituna. Tesis Doc. Granada, España, Universidad de Granada. 28 p.
- Trossero, C., Caffarena, G., Hure, E., & Rizzotto, M. (2006). Detección de mutagenicidad en compuestos N-nitroso con el Test de Ames. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 25(1), 139–144. http://www.latamjpharm.org/trabajos/25/1/LAJOP_25_1_5_1_AHEJ519796.pdf
- Vidal Ledo, María Josefina, Alfonso Sánchez, Ileana, Zayas Mujica, Roberto, Borrell Saburit, Arelys, Castellanos Gallardo, Inalvis, & Rodríguez Perojo, Keilyn. (2013). Biblioteca virtual en salud. *Educación Médica Superior*, 27(2), 294-310. Recuperado en 09 de marzo de 2022, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S086421412013000200016&lng=es&tlng=es
- VARGAS, V.; MIGLIAVACCA, S.; MELO, A.; HORN, R. 2001. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mut. Res.* 490:141-158.
- Venitt, A & D. Phillips. 1995. The importance of environmental mutagens in human carcinogenesis and germ-line mutation. pp 1-17. In D.H. Phillips & S. Venitt (eds.). *Environmental mutagenesis*. Bios Scientific, Londres.
- W. Szybalski, Special microbiological systems: 2. Observations on chemical mutagenesis in microorganisms, *Annals of the New York Academy of Sciences* 76, 1958, 475-489
- Wang X, Z. S. Distribution Characteristics and Ecological Risk Assessment of Toxic Heavy Metals and Metalloid in Surface Water of Lakes in Daqing Heilongjiang Province, China. *Ecotoxicology* 2014, 23, 609–617.
- Watson, J., Gann, A., Baker, T., Levine, M., Bell, S., Losick, R., & Harrison, S. (2014). *Molecular Biology of The Gene* (7th editio). New York: Pearson. <https://doi.org/10.2142/biophys.17.240>
- Yulieth Reyes, Inés Vergara, Omar Torres, Mercedes Díaz-Lagos, E. E. G.-J. Contaminación Por Metales Pesados: Implicaciones En Salud, Ambiente Y Seguridad Alimentaria. *UPTC* 2016, 16, N.2, 66–77.

- Zabala. (2012). NUEVAS EVIDENCIAS DE CONTAMINACIÓN DE CURTIEMBRES EN LA CUENCA MATANZA-RIACHUELO. *GREENPEACE*. <http://www.greenpeace.org/argentina/es/informes/La-contaminacion-viste-a-la-moda/>
- Zapata, L. M., Bock, B. C., y Palacio, J. A. (2014). Mercury concentrations in tissues of colombian slider turtles, *Trachemys callirostris*, from northern Colombia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 92(5), 562–566. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/s00128-014-1198-5>