



**ACTIVIDAD GENOTÓXICA Y MUTAGÉNICA DE VINAZAS PRODUCIDAS EN UNA
PLANTA PILOTO DE PRODUCCIÓN DE BIOETANOL EN FRONTINO, ANTIOQUIA.**

IVÁN MELÉNDEZ GÉLVEZ

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE DOCTORADO EN CIENCIAS
FARMACÉUTICAS Y ALIMENTARIAS UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

CARLOS ALBERTO PELAEZ, PHD EN QUÍMICA

DIRECTOR

DIEGO ALBERTO ZALAZAR MONCADA PHD EN BIOLOGÍA

CO-DIRECTOR

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y ALIMENTARIAS

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

AÑO

2023

Cita	Meléndez et al, 2024
Referencia	(1) Meléndez Gelvez I, Peláez Jaramillo C, Salazar Moncada D. ACTIVIDAD GENOTÓXICA Y MUTAGÉNICA DE VINAZAS PRODUCIDAS EN UNA PLANTA PILOTO DE PRODUCCIÓN DE BIOETANOL EN FRONTINO, ANTIOQUIA. [Tesis doctoral]. Medellín, Colombia. Universidad de Antioquia; 2024.
Estilo Vancouver/ICMJE (2018)	



Doctorado en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Cohorte L.
 Grupo de Investigación Interdisciplinario de Estudios Moleculares.



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Dedicatoria

Dedico este trabajo a tres personas excepcionales que han sido fundamentales en mi camino hacia la culminación de esta tesis:

A mi director de tesis, Carlos Alberto Peláez, por su guía experta, paciencia infinita y apoyo inquebrantable. Su sabiduría y asesoría han sido una fuente de inspiración y aprendizaje.

A mi amigo Diego Alberto Salazar, quien no me dejó desfallecer en los momentos más difíciles, fue mi motivación y mi confidente durante este arduo proceso. Las palabras de aliento, la amistad inquebrantable y el apoyo constante han guiado mi camino en los momentos más oscuros.

Por ultimo a una persona muy especial, quien fue la que sembró en mi la pasión por esta área del conocimiento, lamentablemente ella ya no está en este espacio terrenal.

A mi familia, por el apoyo incondicional en todos los momentos.

Sin la contribución de cada uno de ustedes, esta tesis no habría sido posible. Gracias por ser parte de esta importante etapa de mi vida académica y personal.

Agradecimientos

Al Grupo interdisciplinario de Estudios Moleculares (GIEM), por toda su colaboración en la infraestructura, reactivos y asesoría técnica.

A Minciencias y el ecosistema de Colombia Científica por apoyarme económicamente

Tabla de contenido

Resumen	7
Introduccion	9
CAPITULO I.....	13
Determinación de la actividad citotóxica y genotóxica en <i>Allium cepa</i> L inducida por diferentes diluciones de vinaza generada en la planta de producción de bioetanol en Frontino, Antioquia, antes y después de ser sometidas a procesos de bio-oxidación y de Fenton.	13
Introducción	13
Índice mitótico.....	14
Aberraciones cromosómicas (AC)	17
Micronucleos	19
Metodología.....	20
Obtención de la muestra	20
Procesamiento de la muestra.....	21
Evaluación del potencial citotóxico y genotóxico en raíces de <i>Allium cepa</i>	22
Análisis estadístico	24
Resultados.....	25
Análisis fisicoquímico de la vinaza	25
Potencial citotóxico y genotóxico en A. cepa.....	26
Discusión	30
Conclusiones.....	34
CAPITULO II.....	35

Evaluación de la actividad genotóxica en linfocitos humanos inducida por diferentes diluciones de vinaza generada en la planta de producción de bioetanol en Frontino, Antioquia, antes y después de ser sometidas a procesos de bio-oxidación y de Fenton.	35
Introducción	35
Ensayo Cometa	36
Metodología.....	39
Obtención de las muestras de Vinazas	39
Cultivo de los linfocitos	39
Prueba de citotoxicidad mediante la exclusión con el colorante azul de tripano.	39
Evaluación genotóxica a través de electroforesis en gel de células individuales (ensayo Cometa).....	40
Análisis estadísticos	42
Resultados.....	42
Citotoxicidad	42
Genotoxicidad.....	44
Discusión	45
Conclusiones	47
CAPITULO III.....	48
Determinación de la actividad mutagénica en <i>Salmonella typhimurium</i> inducida por diferentes diluciones de vinaza generada en la planta de producción de bioetanol en Frontino, Antioquia, antes y después de ser sometidas a procesos de bio-oxidación y de Fenton.	48
Introducción	48
Actividad mutagénica en <i>Salmonella typhimurium</i> (Test de Ames).....	49
Características de las cepas.....	50
Metodología.....	52

Preparación de las concentraciones de vinaza	52
Test de Ames	53
Resultados.....	54
Mutagenicidad evaluada por el test de Ames	54
Discusión	58
Conclusiones.....	59
Recomendaciones generales	60
Referencias bibliograficas.....	61

Lista de tablas

Tabla 1. Características físico químicas de residuos de destilerías que usan diferentes materias primas.....	11
Tabla 2. Metales pesados hallados en vinaza de caña de azúcar.....	11
Tabla 3. Resumen de los análisis fisicoquímicos de la muestra de vinaza.....	26
Tabla 4. Actividad citotóxica y genotóxica en <i>Allium cepa</i> inducida por diferentes diluciones de vinaza cruda.	28
Tabla 5. Comparación de los resultados de IM de vinaza cruda con respecto a su tratamiento con bio-oxidación con levaduras y con oxidación química.....	33
Tabla 6. Comparación de los resultados de AC de vinaza cruda con respecto a su tratamiento con bio-oxidación con levaduras y con oxidación química.....	34
Tabla 7. Comparación de los resultados de MN de vinaza cruda con respecto a su tratamiento con bio-oxidación con levaduras y con oxidación química.....	34
Tabla 8. Citotoxicidad inducida en linfocitos humanos por vinaza cruda (VC), vinaza biooxidada con levaduras (VB) y vinaza oxidada por reacción de Fenton (VO).....	43
Tabla 9. Genotoxicidad en linfocitos humanos inducida por vinaza cruda (VC), vinaza biooxidada con levaduras (VB) vinaza oxidada por reacciones de Fenton (VO).....	45
Tabla 10. Cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> comúnmente empleadas para pruebas de mutagenesis.....	52
Tabla 11. Actividad mutagénica en <i>Salmonella tipymurium</i> TA98 inducida por vinaza cruda (VC), vinaza biooxidada con levaduras (VB) vinaza oxidada por reacciones de Fenton (VO) con la adición o no de enzimas microsomales (S9).....	55
Tabla 12. Actividad mutagénica en <i>Salmonella tipymurium</i> TA100 inducida por vinaza cruda (VC), vinaza biooxidada con levaduras (VB) vinaza oxidada por reacciones de Fenton (VO) con la adición o no de enzimas microsomales (S9).....	56

Lista de figuras

Figura 1 Ciclo celular y fase de la mitosis Fuente: Conceptos de genética 5ta ed	16
Figura 2 AC observadas en células meristemáticas de <i>A. cepa</i>	19
Figura 3 Proceso para obtener etanol a partir de la melaza	22
Figura 4 Tipos de muestra de vinaza para las evaluaciones biológicas	23
Figura 5 Determinación del Índice mitótico (IM), aberraciones cromosómicas y micronúcleos e raíces de <i>Allium cepa</i> . El procedimiento se realizó por triplicado. Fuente propia.	25
Figura 6 Índice mitótico (IM) en <i>Allium cepa</i> inducida por tres tipos de vinaza. VC: vinaza cruda; VB: vinaza tratada biooxidada; VO: vinaza oxidada por reacciones de Fenton.	29
Figura 7 Aberraciones cromosómicas (AC) en <i>Allium cepa</i> inducida por tres tipos de vinaza. VC: vinaza cruda; VB: vinaza tratada biooxidada; VO: vinaza oxidada por reacciones de Fenton.	30
Figura 8 Mironucleos (MN) en <i>Allium cepa</i> inducida por inducida por tres tipos de vinaza. VC: vinaza cruda; VB: vinaza tratada biooxidada; VO: vinaza oxidada por reacciones de Fenton.	31
Figura 9 Pasos metodológicos para el ensayo cometa usando en linfocitos de sangre periférica humana.	42
Figura 10 Pasos resumidos del Test de Ames aplicados en este estudio.....	54
Figura 11 Promedio de revertantes en <i>Salmonella typhimurium</i> , inducidas por diferentes concentraciones de vinaza cruda, vinaza biooxidada y vinaza oxidada en la cepa TA98 sin S9.	57
Figura 12 Promedio de revertantes en <i>Salmonella typhimurium</i> , inducidas por diferentes concentraciones de vinaza cruda, vinaza biooxidada y vinaza oxidada en la cepa TA98 con S9.	57
Figura 13 Promedio de revertantes en <i>Salmonella typhimurium</i> , inducidas por diferentes concentraciones de vinaza cruda, vinaza biooxidada y vinaza oxidada en la cepa TA100 sin S-9.	58

Figura 14 Promedio de revertantes en *Salmonella typhimurium*, inducidas por diferentes concentraciones de vinaza cruda, vinaza tratada anaeróbicamente y vinaza oxidada por reacción de Fenton en la cepa TA100 con S-9..... 59

Siglas, acrónimos y abreviaturas

VC	Vinaza cruda
VB	Vinaza biooxidada con levaduras
VO	vinaza oxidada por reacciones de Fenton

Resumen

Una de las actividades humanas más prominentes es la producción de biocombustibles, la cual es una industria contribuyente clave de la economía mundial, pero también es una de las principales fuentes de contaminación ambiental debido a la descarga de un enorme volumen de aguas residuales de color oscuro denominadas vinazas. Estas, contienen sólidos totales muy altos, sulfatos, fosfatos, compuestos fenólicos y varios metales tóxicos, así como una demanda biológica y química de oxígeno muy alta, melanoidinas, ftalato de di-n-octilo, ftalato de di-butilo, ácido bencenopropanoico, ácido 2-hidroxisocaproico y metales tóxicos, de los cuales existe evidencia de que son genotóxicos, carcinógenos, mutagénicos y disruptores endocrinos. (García et al., 2021). Colombia cuenta con 14 ingenios azucareros donde se produce bioetanol. En el Departamento de Antioquia, se puso en funcionamiento una planta piloto de bioetanol en Frontino, como parte de un proyecto nacional que busca demostrar la viabilidad de producir biocombustibles a pequeña escala y con tecnología nacional. Es así como en esta investigación se pretende determinar la actividad mutagénica y genotóxica de vinazas producidas en la planta piloto instalada en el municipio de Frontino, Antioquia; para dicha investigación, se usó una batería de ensayos de laboratorio como la prueba de *Allium cepa*, el ensayo cometa y el test de Ames. Se encontró que las vinazas tienen un efecto citotóxico y genotóxico al afectar la división celular, producir aberraciones cromosómicas y micronúcleos en células de *A. cepa*. En linfocitos humanos la vinaza produjo citotoxicidad en concentraciones por encima de 3 % y en las dosis evaluadas hasta 3 % se presentó quiebres en las cadenas del ADN. En *Salmonella typhimurium* no hubo efecto mutagénico. Por último, los tratamientos de biooxidación y oxidación química aplicados a la vinaza cruda mostraron un efecto protector en células vegetales y animales.

Palabras clave: Etanol, Vinaza, Ensayo cometa, *Allium cepa*, Test de Ames, Biooxidación, Fenton

Abstract

One of the most prominent human activities is the production of biofuels, which is a key contributing industry to the global economy, but is also one of the major sources of environmental pollution due to the discharge of a large volume of dark-colored wastewater called "vinasse." These vinasses contain very high levels of total solids, sulfates, phosphates, phenolic compounds, various toxic metals, as well as a high biological and chemical oxygen demand, melanoidins, di-n-octyl phthalate, di-butyl phthalate, benzenepropanoic acid, 2-hydroxyisocaproic acid, and toxic metals, of which there is evidence that they are genotoxic, carcinogenic, mutagenic, and endocrine disruptors. Colombia has 14 sugar mills where bioethanol is produced. In the Antioquia Department, a bioethanol pilot plant was put into operation in Frontino as part of a national project aimed at demonstrating the feasibility of producing biofuels on a small scale with domestic technology. This research aims to determine the mutagenic and genotoxic activity of vinasse produced in the pilot plant located in the municipality of Frontino, Antioquia. For this investigation, a battery of laboratory tests such as the *Allium cepa* test, the comet assay, and the Ames test were used. It was found that vinazas have a cytotoxic and genotoxic effect by affecting cell division, producing chromosomal aberrations, and micronuclei in *A. cepa* cells. In human lymphocytes, vinasse produced cytotoxicity at concentrations above 3%, and at the evaluated doses of up to 3%, there were DNA strand breaks. There was no mutagenic effect on *Salmonella typhimurium*. Finally, biooxidation and chemical oxidation treatments applied to raw vinasse showed a protective effect on plant and animal cells.

Keywords: Ethanol, Vinasse, Comet assay, *Allium cepa*, Ames test, Oxidation, Fenton.

Introducción

La producción de biocombustibles esta en auge en todo el mundo y representa una industria que contribuye en la economía mundial. Colombia cuenta con 14 ingenios azucareros donde se produce bioetanol, la mayoría de ellos ubicados en el valle del río Cauca (UDME, 2015). En el Departamento de Antioquia, el Ministerio de Agricultura, puso en funcionamiento una planta piloto de bioetanol en Frontino, esta planta produce 5.400 litros diarios de etanol y demanda la producción de 350 hectáreas de caña de azúcar para su abastecimiento (CORPOICA, 2008)

La vinaza es un residuo acuoso generado por la destilación de mosto alcohólico durante el proceso de producción de etanol, con una proporción entre el etanol y las vinazas de 1:13. Proviene de la caña de azúcar y se obtiene de la fermentación y destilación de las melazas. Es un líquido de color café con pH bajo, olor dulce y alto contenido de materia orgánica disuelta y en suspensión (Gamboa et al, 2011; Christofolletti et al 2013; Kumar, S & Gopal, K., 2001)

La composición química de las vinazas es variable y depende del método de fermentación alcohólica, las especies de levaduras utilizadas, la relación fondaje-vinaza y de la materia prima utilizada en la destilación, la cual puede proceder de 3 fuentes como melaza (concentrada), directamente del jugo de los molinos, y mixta (mezcla de jugo y melaza). Independientemente de la materia prima utilizada en su producción, el componente principal de la vinaza es la materia orgánica en forma de ácidos orgánicos y cationes, como potasio, calcio y magnesio. En general, la vinaza, tiene un color oscuro y consiste principalmente de agua (93%) y sólidos orgánicos y minerales (7%). A pesar de tener altos niveles de materia orgánica, tiene bajos niveles de nitrógeno y fósforo (Laime et al, 2011; Chowdhary, et al 2017).

Las diferentes caracterizaciones físicas y químicas reportadas en la literatura (Tabla 1) muestran que es un producto ácido (pH 3,5 - 5), con alta en carga orgánica representada por una alta demanda química de oxígeno – DQO- (hasta 140 g/L), un color marrón oscuro debido a la presencia de melanoidinas (Laime et al, 2011; Chowdhary, et al 2018) y un olor desagradable. Contiene nutrientes como nitrógeno (hasta 4,2 g/L), fósforo (hasta 3,0 g/L) o potasio (hasta 17,5 g/L).

Tabla 1

Características físico químicas de residuos de destilerías que usan diferentes materias primas.

Materia prima	Melaza de caña de azúcar	Jugo de caña de azúcar	Maíz	Melaza de remolacha
pH	3,9 - 4,3	4,04	3,3 - 4	5,35
COD g/L	104 -134,4	30,4	59,4 - 64,5	91,1
BOD g/L	46,1- 96	16,7	26,9 - 43,1	44,9
N g/L	1,66 - 4,2	0,63	0,546 - 0,755	3,57
S g/L	3,24 - 3,42	1,35	2,99	3,71
P g/L	0,22 - 3,03	0,13	0,228 - 1,170	0,16
K g/L	9,6 – 17,47	1,95	Nd	10,0
Referencia	Mahimairaja S. N.S. Bolan, 2008	Wilkie et al., 2000	Wilkie et al., 2000	Wilkie et al., 2000

De igual manera, se ha determinado que las vinazas pueden contener metales pesados (Tabla 2) y dado su alto volumen de producción, es considerada como un agente contaminante.

Tabla 2

Metales pesados hallados en vinaza de caña de azúcar (Christofolletti et al, 2013)

Elemento	Concentración mg/L
Ba	0,41

Cr	0,04
Cu	0,35
Hg	0,0019
Mo	0,008
Ni	0,03
Zn	1,66

Cuando es utilizada como fertilizante en terrenos de cultivo, sin un tratamiento adecuado, provoca la inhibición en la germinación de semillas y el agotamiento de la vegetación al reducir la alcalinidad del suelo y la disponibilidad de manganeso.

Dado la alta carga de materia orgánica de las vinzas, existen métodos para su tratamiento. Por ejemplo, la bio-oxidación que consiste en un proceso biológico que busca reducir la carga contaminante que convierte los compuestos orgánicos en productos menos tóxicos. La bio-oxidación es un proceso efectivo para el tratamiento de vinazas, pero su éxito depende de la selección adecuada de microorganismos, condiciones de operación y monitoreo constante. Inicialmente la vinaza se recoge de la destilería y se somete a un proceso de clarificación y filtración para eliminar sólidos suspendidos y partículas gruesas, luego se adicionan microorganismos específicos, como bacterias y hongos, que son capaces de degradar los compuestos orgánicos presentes en la vinaza. Las muestras deben ser agitadas constantemente para favorecer el crecimiento y actividad de los microorganismos, ya que muchos de ellos son aerobios y requieren oxígeno para su metabolismo. Los microorganismos descomponen el material orgánico complejo que pueden ser tóxico o dañino para el medio ambiente, reduciendo así la carga contaminante de la vinaza tratada y originan como producto dióxido de carbono, agua y biomasa microbiana. (Jiang et al., 2020)

Otro método para tratar la materia orgánica, es conocido como la reacción de Fenton, que implica la generación de radicales libres altamente reactivos, como el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), este se forma cuando reaccionan el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y un catalizador de hierro (Fe^{2+}). Este radical, en el tratamiento de vinazas podría tener como objetivo reducir la carga orgánica y la contaminación antes de su descarga o reutilización. La aplicación de la reacción de Fenton puede generar cambios químicos y físicos en la muestra, lo que podría afectar sus propiedades y características originales. (Fagiano et al 2023)

Por otro lado, se ha demostrado que las vinazas contienen compuestos fenólicos, metales, melanoidinas, ptalatos, ácido bencenopropanoico, ácido 2-hidroxisocaproico que presentan actividad genotóxica, carcinogénica, mutagénica y disruptores endocrinos (Santal et al., 2016; Zhang et al., 2018; Kumar and Sharma, 2019). Dentro de las pruebas más utilizadas para el estudio de la genotoxicidad y mutagenicidad se encuentran micronúcleos, intercambio de cromátidas hermanas, electroforesis en gel de células individuales (ensayo cometa) y el test de Ames, entre otros (Ames et al, 1975; Singh et al, 1988; Perry, P., & Evans, H. J. 1975; Schmid 1975).

Este estudio contribuye con la investigación en nuestro país, teniendo en cuenta que aún son incipientes los estudios que se han realizado al respecto y que este tipo de industria día a día tiende a incrementarse; por lo tanto, el objetivo es determinar la actividad mutagénica y genotóxica de las vinazas producidas en la planta piloto instalada en el municipio de Frontino, Antioquia.

Esta investigación se abordará en tres capítulos, donde en el primero se evalúa la genotoxicidad en *Allium cepa*, el segundo la genotoxicidad en el ensayo Cometa y por último, se estudia la mutagenicidad en *Salmonella typhimurium*, conocido como el Test de Ames.

1 CAPITULO I

1. 1 Determinación de la actividad citotóxica y genotóxica en *Allium cepa* L inducida por diferentes diluciones de vinaza generada en la planta de producción de bioetanol en Frontino, Antioquia, antes y después de ser sometidas a procesos de bio-oxidación y de Fenton.

1.1.1 Introduccion

Al rededor del mundo, existen pocos estudios que soportan la genotoxicidad y mutagenicidad de las vinazas. La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño que puede ser detectado (Repetto, 2002); con base a esto, diferentes autores han desarrollado pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de drogas y compuestos químicos, utilizando como modelos experimentales cultivos primarios u órganos aislados como líneas celulares establecidas (Arrebola, et al., 2003). Para evaluar la proliferación celular y la citotoxicidad, una prueba *in vitro* debe tener como características principales: ser simple, rápida, eficiente, económica, reproducible, sensible, segura, efectiva en la medida de la población celular viable y que no muestre interferencia con el compuesto a evaluar (Anoopkumar-Dukie, et al., 2005).

Dentro de los ensayos más conocidos y ya validados se encuentran el ensayo de captación del rojo neutro, enlazamiento al azul de kenacid, el ensayo colorimétrico de reducción del Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT) que mide la función metabólica celular usando las sales de tetrazolio, el cual es ampliamente usado para evaluar la citotoxicidad de líneas celulares cancerígenas (Escobar y Rivera, 2010), el ensayo de exclusión con azul de tripano y el ensayo de *Allium cepa*.

El ensayo de *Allium cepa*, por involucrar plantas superiores, presenta características que lo convierte en un excelente modelo genético para evaluar los contaminantes ambientales y con

frecuencia se usa en estudios de monitoreo (Fiskesjo 1985, Oudalova, 2017). Esta característica no solo se debe a la sensibilidad para detectar mutágenos en diferentes ambientes, sino también a que a través de ellas se pueden evaluar varios trastornos cromosómicos en la mitosis, debido a que sus cromosomas son grandes y se presentan en un número diploide reducido ($2n = 16$) (Fiskesjo, 1985). Se ha utilizado hasta la fecha para evaluar una gran cantidad de agentes químicos, lo que contribuye a su creciente aplicación en el monitoreo ambiental. El ensayo con *A. cepa* se caracteriza por ser de bajo costo, se maneja fácilmente y tiene ventajas sobre otras pruebas a corto plazo que requieren preparaciones previas de muestras analizadas, así como la adición de un sistema metabólico exógeno. Las plantas superiores poseen enzimas oxidasas que las hacen de interés en este tipo de estudios, ya que han presentado resultados consistentes que sirven como una advertencia para otros sistemas biológicos, dado que la molécula blanco es el ADN, común a todos los organismos (Fiskesjo, 1985, Rank 2003, Oudalova et al, 2017, Fatima RA, & Ahmad M., 2006)

1.1.2 Índice mitótico

El índice mitótico (IM) y algunas anomalías nucleares se utilizan para evaluar la citotoxicidad y el análisis de micronúcleos, sirve para determinar la mutagenicidad de diferentes sustancias químicas (Fatima RA, & Ahmad M., 2006, Fernandes et al 2007, Hoshina 2005). El IM es definido como el número de células en división o en mitosis sobre el número total de células. El ciclo celular en células somáticas consta de dos etapas, la interfase y la mitosis, esta última, a su vez consta de profase, metafase, anafase y telofase (Figura 1). Los niveles de citotoxicidad de un agente puede ser determinado por el incremento o disminución del IM (Fernandes et al., 2007). Cuando el IM es más bajo que el control negativo, indica que existen

alteraciones en el crecimiento y desarrollo del tejido expuesto debido a la acción del compuesto; por el contrario, cuando el IM es mayor al control negativo, resulta en un incremento de la división celular, el cual puede ser peligroso debido a los desórdenes en la proliferación celular e incluso por la formación y promoción de tumores (Leme and Marin-Morales, 2009).

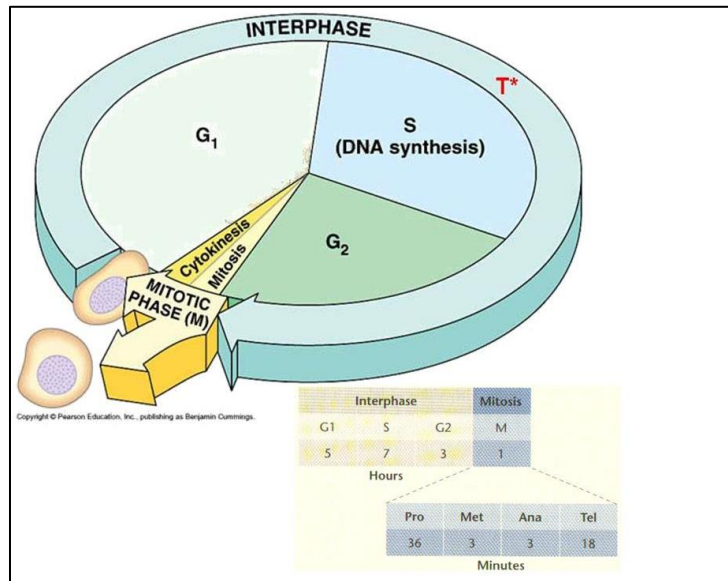


Figura 1 Ciclo celular y fase de la mitosis Fuente: *Conceptos de genética 5ta ed*

Por otro lado, *A. cepa* nos brinda información importante para evaluar los mecanismos de acción de un agente sobre material genético como efectos clastogénicos y/o aneugénicos. Por ejemplo, la detección de pesticidas en raíces de *A. cepa* con estas alteraciones (Chauhan et al., 1998, Ateeq et al., 2002, Bolle et al., 2004, Chauhan L. & Gupta SK 2005, Fernandes et al., 2007, Srivastava K & Mishra K.), así como metales en aguas de consumo (Fiskesjo 1981, Inceer et al., 2000, Steinkellner et al., 1998, Matsumoto et al., 2006, Yi H., et al., 2007, Seth et al., 2008), hidrocarburos aromáticos (Leme D.M & Marin-Morales M.A, 2008a, Leme D.M & Marin-Morales 2008b, Fiskesjo G. & Lassen C 1982), efuentes industriales (Migid et al., 2009, Sudhakar et al., 2001, Carita´ R.& Marin-Morales M.A. 2008, Smaka-Kincl et al., 1996, Migid et

al., 2007, Grover I.S. & Kaur 1999, Chandra et al., 2005) y productos usados en la desinfección del agua (Feretti et al., 2008, Melnick et al., 1994, Boorman 1999, Monarca et al., 2003, Crebelli et al., 2005).

Con respecto a la evaluación de la genotoxicidad de vinazas diversos estudios han mostrado la eficacia de las pruebas en *A. cepa*. Por ejemplo, (Srivastava y Jain 2010) evaluaron el efecto de la vinaza sin tratar, la vinaza digerida y la vinaza digerida diluida (1:5 v/v); la vinaza cruda y la vinaza digerida presentaron un efecto sobre el índice mitótico, así como la generación de cromosomas pegajosos y rezagados, C-metafases, multipolaridad, células bi y multinucleadas y efectos mutagénicos como roturas de cromosomas y micronúcleos. Según estos autores, estas alteraciones fueron causadas por altas concentraciones de K, P, S, Fe, Mn, Zn y Cu y metales pesados como Cd, Cr, Ni y Pb. Posteriormente, (Souza et al. 2013) analizaron *A. cepa* expuestas a vinaza y observaron principalmente puentes cromosómicos, adherencias y roturas cromosómicas. Una evaluación más amplia, fue realizado por Christofolletti et al, (2013) donde se analizaron los efectos citotóxicos, genotóxicos y mutagénicos en células meristemáticas de *A. cepa* después de tratarla con efluentes de vinaza. Se observó que la muestra de vinaza de caña de azúcar presentó efectos genotóxicos en las células meristemáticas de *A. cepa*, incluso después del procesamiento de este residuo por invertebrados terrestres. En bioensayos de laboratorio, (Anacleto et al 2017; Bhat et al. 2016b) analizaron el efecto toxicológico de las aguas de desecho de la industria de la caña de azúcar y evidenciaron que muestras tomadas al poco tiempo mostraron más actividad genotóxica y mutagénica que las muestras que fueron tomadas en tiempos tardios. En otro estudio, evaluaron el potencial genotóxico, con *A. cepa*, proveniente de vinazas de dos sustratos, como la caña de azúcar y la naranja (García et al. 2017). Se encontró que

ambos tipos de vinaza son capaces de inducir aberraciones cromosómicas en células meristemáticas, principalmente puentes nucleares y anafásicos.

1.1.3 Aberraciones cromosómicas (AC)

Las aberraciones cromosómicas (AC) se caracterizan por cambios en la estructura o en el número total de cromosomas, pueden ocurrir espontáneamente o como resultado de la exposición a agentes químicos (Białas et al., 2009). Las AC numéricas son aneuploidías y poliploidías, se originan por alteraciones en la segregación de los cromosomas y puede ocurrir espontáneamente o por la acción de agentes aneugénicos (Zhang et al., 2010).

En la evaluación de AC, usando la prueba de *A. cepa*, se tienen en cuenta varios tipos de aberraciones en las diferentes fases de la célula en división (profase, metafase, anafase y telofase). Sin embargo, este análisis no es sencillo de realizar, ya que requiere un conocimiento preciso de las fases de división celular y sus posibles anomalías. Considerando este problema, Rank & Nielsen 1994, adaptaron la prueba de *A. cepa* para facilitar los análisis para personas que no trabajan en el área de citología; estos autores, propusieron el análisis sólo en anafase y telofase. Sin embargo, el análisis de los diferentes tipos de AC, en todas las fases de el ciclo celular, propuesto inicialmente por Fiskesjo 1981, permite una evaluación integral y precisa. Las AC, tales como puentes cromosómicos y roturas, son indicadores de una acción clastogénica, mientras que las pérdidas cromosómicas, los retrasos, la adherencia, la multipolaridad y las c-metafases resultan de efectos aneugénicos. En la figura 2, se muestran algunas de las AC que pueden observarse en *A. cepa* después de la exposición a agentes químicos.

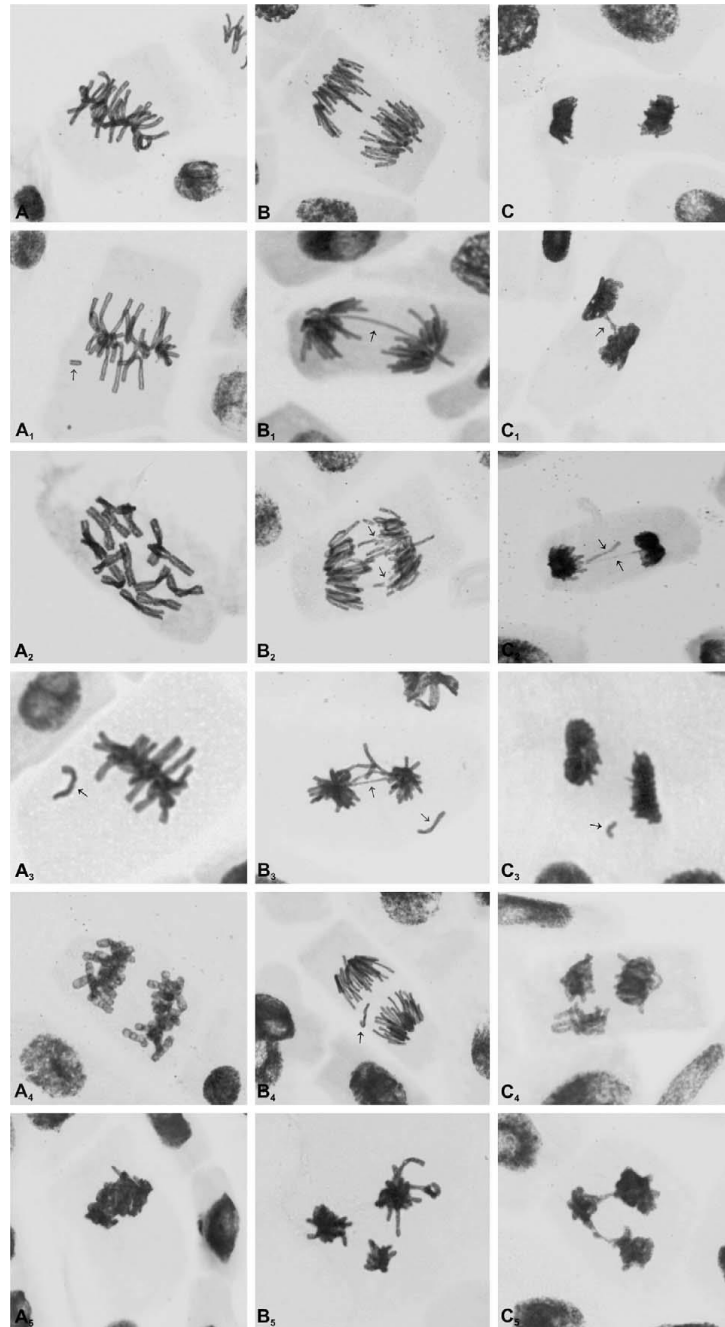


Figura 2 AC observadas en células meristemáticas de *A*

Fig 2. AC observadas en células meristemáticas de *A. cepa* expuestas a agentes químicos. (A) Metafase normal; (A1) Metafase con rotura cromosómica; (A2) C-metafase; (A3) Metafase con pérdida cromosómica; (A4) Célula binucleada en metafase; (A5) Metafase con adherencia cromosómica; (B) Anafase normal; (B1) Anafase con puente cromosómico; (B2) Anafase con

rupturas cromosómicas; (B3) Anafase con puente y pérdida de cromosomas; (B4) Anafase con pérdida de cromosomas; (B5) Anafase multipolar; (C) Telofase normal; (C1) Telofase con puente cromosómico; (C2) Telofase con puente y pérdida de cromosomas; (C3) Telofase con ruptura cromosómica; (C4) Telofase multipolar; (C5) Telofase multipolar con puente cromosómico. Tomado de Leme et al, 2008.

1.1.4 Micronucleos (MN)

Desde 1959, los MN han sido propuestos como marcadores de daños citogenéticos (Kirsch-Volders et al, 2003). Sin embargo, el análisis de la frecuencia como una prueba de citogenética solo fue propuesto en 1970 por Boller y Schmid (Boller K & Schmid W 1970) y luego se empleó en eritrocitos policromáticos de médula ósea (Heddle 1973) y linfocitos (Countryman P. & Heddle J.1976). El ensayo se ha utilizado ampliamente en estudios de genotoxicidad (Sutiakova ET AL., 2014, Norppa H, Falck G., 2003, OECD, 2003); además, se puede aplicar a cualquier célula eucariota siendo preferible usarla en sustitución de la prueba de aberraciones cromosómicas, ya que no requiere análisis de cariotipo (Fenech M. & Morley A. 1985, Albertini et al., 1987, Miller et al., 1997, Semmes et al, 1996).

Los micronúcleos (MN) son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos, que espontáneamente o por causa de agentes genotóxicos, quedan fuera del núcleo durante la división celular. En hematología, los MN se conocen como cuerpos de Howell-Jolly y su forma es generalmente redonda o almendrada alcanzando un diámetro entre 0,4 a 1,6 micras (Heddle et al, 1991, Schmid W. (1975, Fuic A, Mijic A. 1999). La prueba de MN permite detectar agentes clastogénicos como son las radiaciones y algunos medicamentos antineoplásicos (bleomicina, mitomicina c, ciclofosfamida, entre otros) que inducen daños en el ADN, como quiebras de hebras y daño cromosómico, lo que contribuye a la formación de micronúcleos. Los agentes

aneugénicos (colchicina, vincristina y vinblastina) se caracterizan por bloquear la polimerización de microtúbulos durante la formación del huso mitótico, originando rezagos de cromosomas completos, que no se incluyen en los núcleos hijos, formados durante la transición de metafase/anafase de la mitosis. Los compuestos aneugénicos causan MN más grandes que los producidos por los agentes clastogénicos (Hatanaka et al, 1992), dado que se han identificado presencia de centrómero y/o cinetocoro detectados por la técnica citometría de flujo (Dorothea et al, 1998).

Este capítulo tiene como objetivo general determinar la actividad citotóxica y genotóxica en *A. cepa* inducida por diferentes diluciones de vinaza generada en la planta de producción de bioetanol en Frontino, Antioquia, antes y después de ser sometidas a procesos de bio-oxidación y de Fenton. Para lograr esto, se plantearon tres objetivos específicos como fue evaluar la toxicidad de los diferentes tipos de vinaza en la división celular en células de raíz de *A. cepa*; adicionalmente, se consideró determinar en este mismo bioensayo la genotoxicidad registrando las aberraciones cromosómicas y los micronúcleos.

1.2 Metodología

1.2.1 Obtención de la muestra

Se obtuvo melaza proveniente de la planta productora de bioetanol ubicada en el municipio de Frontino (Antioquia) a 172 Km de Medellín, específicamente en las coordenadas 6°46'43"N, 76°07'53"O. El proceso para obtener etanol a partir de la melaza implica dos etapas como son la fermentación y la destilación. En la primera, la melaza fue filtrada y diluida con agua para facilitar el proceso de fermentación, usando un recipiente con levadura, las cuales consumen los azúcares y producen etanol, agua, CO₂ y otros compuestos. En la segunda etapa, el producto

resultante de la fermentación se calienta en un alambique o destilador y el etanol se separa mediante evaporación y condensación, la fracción no destilada corresponde a la vinaza (Figura 3).

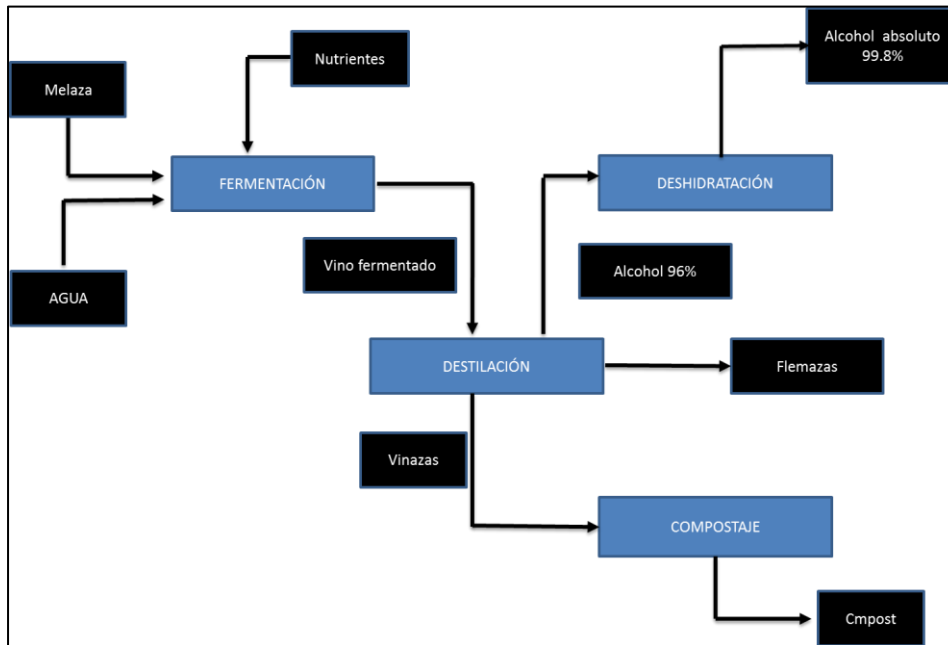


Figura 3 Proceso para obtener etanol a partir de la melaza

Se recolectaron 5 L de vinaza, se realizó un análisis físico - químico para medir la relación C/N, porcentaje de carbono, sólidos y metales pesados; a los tres tipos de muestra se midieron las variables como pH y demanda química de oxígeno (DQO).

De igual manera, con los tres tipos de muestra se realizaron los tratamientos químicos que reducen la materia orgánica y las evaluaciones biológicas.

1.2.2 Procesamiento de la muestra

La muestra de vinaza obtenida fue sometida al tratamiento de bio-oxidación, llevado a cabo in batch con un pH de las vinazas entre 6,5-7,5; luego, se tomaron 10 mL de vinaza y se mezclaron con 182 g de inóculo de lodo y se aforo a 500 mL con agua del grifo. Posteriormente,

se llevo al baño maria a 37°C durante 10 días. Se determinó la demanda química de oxígeno (DQO) y pH a la muestra resultante, siguiendo el protocolo para Colombia NTC 3629 y NTC 5167 respectivamente.

Una vez finalizado el proceso de bio-oxidación de la muestra, a una porción de esta se aplicó el tratamiento Fenton. Para esto, se ajustó el pH a 4,0; luego, se añadió una mezcla de 8 g de FeSO₄ y 80 mL de H₂O₂ (50%) por cada litro de vinaza (Beltrán de Heredia Alonso, 2005) y se ajustó el pH del efluente final a 6,5 para precipitar las sales de hierro (Novelo et al., 2010).

Al final del procesamiento de la muestra, se obtienen tres tipos de muestra (figura 4) con los cuales se realizaron, posteriormente, las evaluaciones biológicas.

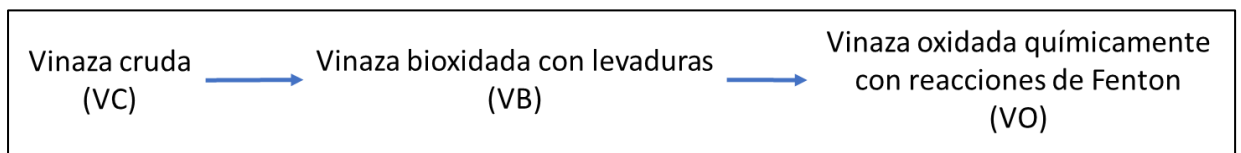


Figura 4 Tipos de muestra de vinaza para las evaluaciones biológicas

1.2.3 Evaluación del potencial citotóxico y genotóxico en raíces de *Allium cepa*.

Previo a realizar el experimento, se determinó la toxicidad de las muestras para establecer las concentraciones en las evaluaciones biológicas. Se tomaron bulbos de cebollas sanas, con presencia de raíces para evaluar las tres tipos de muestras obtenidas de vinazas. La zona radicular de los bulbos se limpió cuidadosamente con el fin de no despojar totalmente las células meristemáticas, estos bulbos fueron depositados en agua potable, a temperatura ambiente y en oscuridad por 72 h, renovando el agua cada 24 h, para evitar pudrición. En este sentido, se pusieron los bulbos de cebolla a crecer en concentraciones crecientes (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 5,0; 10; 50 y 100 %); posteriormente, se tuvieron en cuenta las raíces cuyos

tratamientos presentaron una longitud entre 1,5 y 2,0 cm, que correspondieron a las concentraciones inferiores o iguales 3,0 %; las concentraciones superiores no mostraron crecimiento radicular por el efecto tóxico.

El procedimiento para el experimento contempló el procesamiento de los bulbos como se mencionó anteriormente. Luego, los bulbos se sometieron a los diferentes tratamientos experimentales en la oscuridad por 44 h, tiempo en el cual se completan 2 ciclos celulares (Rank, 2003). Los tratamientos fueron: agua destilada (control negativo), 10 mg/L de metil metano sulfonato (MMS) como control positivo y 8 diluciones (0,25 %; 0,5 %; 0,75 %; 1,0 %; 1,25 %, 1,75 %; 2,0 % y 3,0%) para cada tipo de muestra. Todos los tratamientos fueron renovados cada 24 h. Transcurrido el tiempo de exposición, las raíces se cortaron y se fijaron en 3 mL de solución fijadora de Carnoy (metanol: ácido acético; 3:1). Para cada evaluación, se toman tres raíces fijadas por bulbo de cada tratamiento y se someten a un proceso de hidrólisis para degradar pared celular, la cual consistió en usar una solución 1 N de HCl a 55 °C por 6 minutos; después de este proceso se cortó 1 mm del ápice terminal para evaluar las aberraciones cromosómicas y el índice mitótico (IM). De esta raíz, se corta el siguiente milímetro para analizar la formación de micronúcleos. Para ambos casos, las muestras se disponen en un portaobjetos, se macera con un bisturí y se tiñen con el colorante orceína acética al 2,0 % por un tiempo entre 8 a 10 minutos. Luego, se hizo presión con una toalla absorbente cuidadosamente sobre el cubreobjetos para expandir y eliminar el exceso de colorante. Por último, se realiza el montaje en un microscopio óptico de luz (Olympus) para hacer las observaciones a 40 X (Figura 5).

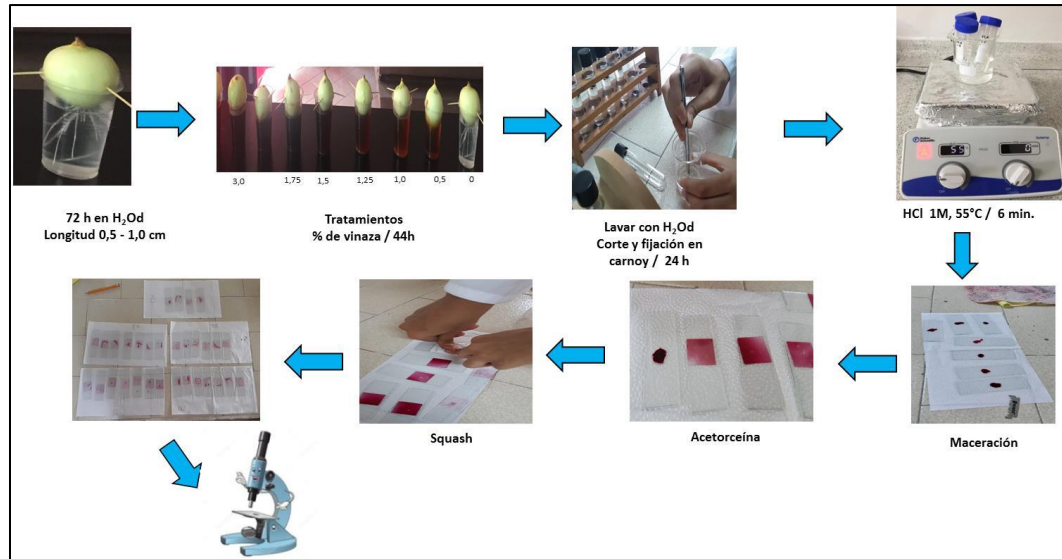


Figura 5 Determinación del Índice mitótico (IM), aberraciones cromosómicas y micronúcleos e racices de *Allium cepa*. El procedimiento se realizó por triplicado. Fuente propia.

Para determinar el Índice Mitótico se contaron 2.000 células por placa (6.000 en total), de acuerdo con la metodología de Fiskesjo, 1997; para esto el $IM (\%) = CA/CB \times 100$, donde: CA = Número total de células en división por tratamiento; CB = Número total de células contadas por tratamiento. Para evaluar las Aberraciones Cromosómicas y los Micronúcleos, se contaron 500 células por cada placa (1500 en total) y se determina la frecuencia de células con estas alteraciones sobre el total de células sanas.

1.2.4 Análisis estadístico

En el presente estudio, se efectuó un análisis estadístico de los datos recabados referentes a las variables como son el índice mitótico, aberraciones cromosómicas y micronúcleos. Primero, se procedió con una estadística descriptiva; para ello, se calculó la media aritmética y la desviación de los resultados de tres ensayos independientes para cada una de las mencionadas variables, proporcionando una representación central de los datos.

Posteriormente, con el objetivo de explorar la relación potencial entre las variables y determinar la naturaleza y fortaleza de estas relaciones, se aplicó una regresión lineal entre índice mitótico, aberraciones cromosómicas y micronucleos vs concentraciones de los diferentes tipos de vinaza: vinaza cruda, vinaza bioóxidada con levadura y vinaza oxidada con reacción de Fenton. El criterio convencionalmente aceptado en la literatura científica es que una relación es considerada estadísticamente significativa si el valor de p (probabilidad) es inferior a 0,05. En consecuencia, cualquier relación con un valor menor a este umbral se interpretó como un indicativo de una correlación no aleatoria entre las variables en cuestión.

1.3 Resultados

1.3.1 Análisis fisicoquímico de la vinaza

El análisis fisicoquímico de la vinaza fue realizado por el grupo interdisciplinario de estudios moleculares (GIEM), donde se analizaron los siguientes parámetros: pH, conductividad, relación carbono nitrógeno, DQO (demanda química de oxígeno), y los metales cadmio (Cd), plomo (Pb), cromo (Cr), mercurio (Hg), níquel (Ni) y arsénico (As) (Tabla 3).

Tabla 3

Resumen de los análisis fisicoquímicos de la muestra de vinaza. VC: vinaza cruda; VA: vinaza bioóxidada con levaduras; VO: vinaza oxidada por Fenton; DQO: demanda química de oxígeno; ND: no detectado

Parámetro	VC	VB	VO	Norma
pH	3,84	6,3	6,51	NTC5167
DQO (mg/L)	30.420	11.000	6.860	NTC3629
Relación C/N	192,60	-	-	NTC5168
% CO	9,9	-	-	NTC5168
% Sólidos				NTC897
Totales	55,78	-	-	

% Sólidos volátiles	96,73	-	-	NTC897
%Sólidos fijos (mg)	3,27	-	-	NTC897
Cd (ppm)	ND	-	-	SM 3111B
Cr (ppm)	ND	-	-	SM 3111B
Ni (ppm)	ND	-	-	SM 3111B
Pb (ppm)	ND	-	-	SM 3111B
Hg (ppm)	ND	-	-	SM 3112 ^a
As (ppm)	ND	-	-	SM 3114C

Como se puede observar en la tabla 3, la vinaza mostró un pH ácido 3,84 para VC, 6,3 para VB y 6,5 para VO; estos valores de pH son característicos de este tipo de muestra; de igual manera, la muestra presentó un alto contenido de material orgánico representado por una DQO de 30.420 mg/L para VC, 11.000 mg/L para VA y 6.860 mg/L para VO. Se observa una remoción de materia orgánica en términos de DQO para la vinaza tratada anaeróbicamente o por biooxidación de 63,8 % y para la vinaza tratada con la oxidación química o reacción de Fenton se registró un 77,4 %. No se detectaron los metales Cd, Cr, Ni, Pb, Hg y As en la muestra de vinaza cruda. Por último, el resultado de la relación C/N 192.6, indica poca cantidad de nitrógeno en la muestra.

1.3.2 Potencial citotóxico y genotóxico en *A. cepa*

Los resultados de las diferentes evaluaciones en los tres experimentos en *A. cepa* son registrados en la tabla 4.

Tabla 4

Actividad citotóxica y genotóxica en Allium cepa inducida por diferentes diluciones de vinaza cruda. VC: vinaza cruda; VB: vinaza biooxidada con levaduras; VO: vinaza oxidada por Fenton.

Los datos corresponden a tres experimentos de manera independiente.

Vinaza (%)	Indice Mitótico (IM)			Frecuencia de Aberraciones cromosómicas			Frecuencia de Micronucleos		
	VC	VB	VO	VC	VB	VO	VC	VB	VO
0%	11,8 ± 0,4	12,6 ± 0,6	13,5 ± 0,4	0,2 ± 0,4	0,1 ± 0,0	0,04 ± 0,1	0,04 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,03 ± 0,1
0,25%	10,8 ± 0,6	11,5 ± 0,1	12,6 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0,04 ± 0,0	0,02 ± 0,0	0,03 ± 0,0
0,5%	10,3 ± 0,6	10,9 ± 0,6	11,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,04 ± 0,1	0,02 ± 0,0	0,03 ± 0,0
0,75%	9,6 ± 0,4	9,9 ± 0,3	10,9 ± 0,3	1,4 ± 0,3	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,11 ± 0,0	0,04 ± 0,0	0,05 ± 0,1
1%	9,1 ± 0,5	9,2 ± 0,8	10,2 ± 0,3	1,8 ± 0,6	0,7 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,04 ± 0,0	0,04 ± 0,0	0,05 ± 0,1
1,25%	8,0 ± 0,5	8,1 ± 0,4	9,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1	0,7 ± 0,4	0,6 ± 0,2	0,20 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,07 ± 0,1
2%	5,7 ± 0,4	6,9 ± 0,6	8,4 ± 0,4	2,3 ± 0,4	1,0 ± 0,3	0,7 ± 0,2	0,11 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,09 ± 0,1
3%	3,6 ± 0,1	5,5 ± 0,4	7,6 ± 0,6	2,5 ± 0,6	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,09 ± 0,1

En la figura 6 y la tabla 4 se observa que el IM tanto de VC, VB y VO disminuye a medida que aumenta la concentración, con un coeficiente de correlación de -0,97, -0,96 y -0,98 respectivamente. Para los 3 tipos de vinaza se observa un comportamiento de linealidad de los datos con un valor significativo menor a 0,05. En este sentido, la comparación de los valores para el control negativo con respecto a los valores de las concentraciones se observa que para VC y VB hay diferencias significativas a partir de la concentración de 0,5 % y para VO de 0,25 %; En general, se observa que para todas las concentraciones en los diferentes tipos de vinaza (VC, VB, VO) hay un menor daño como consecuencia del tratamiento de la vinaza con la biooxidación y la oxidación química (Tabla 4). Específicamente, en la concentración 3 % el IM correspondió a 3,63, 5,52 y 7,62 para VC, VB y VO respectivamente lo que indicaría un restablecimiento de la división celular dado el proceso biológico de la vinaza con levaduras o químico con las reacciones de Fenton.

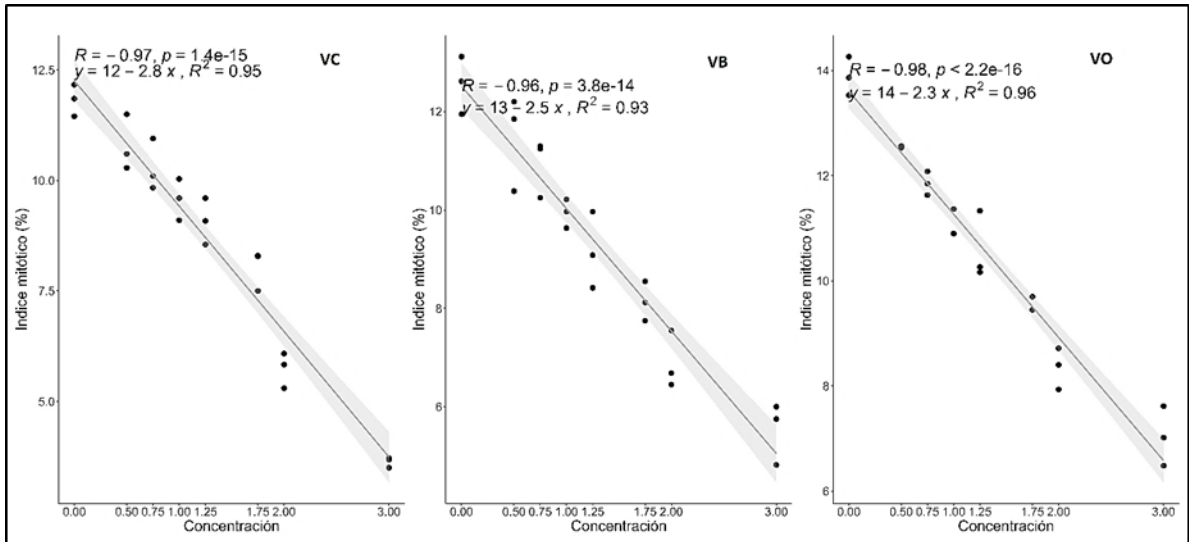


Figura 6 Índice mitótico (IM) en *Allium cepa* inducida por tres tipos de vinaza. VC: vinaza cruda; VB: vinaza biooxidada con levaduras; VO: vinaza oxidada por reacciones de Fenton.

Con relación a las aberraciones cromosómicas (AC) el compartamiento de los datos presentaron también una tendencia lineal, pero a diferencia de la prueba anterior, esta fue positiva, con un valor en R de 0,89, 0,93 y 0,93 (Figura 7) y un valor de $p < 0,05$. Esto quiere decir, que a mayor concentración mayor AC se presentaron. La comparación del control negativo con las concentraciones mostró que para VC y VB las AC se presentan de manera significativa a partir de 0,25 % y para VO correspondió a 0,5 %.

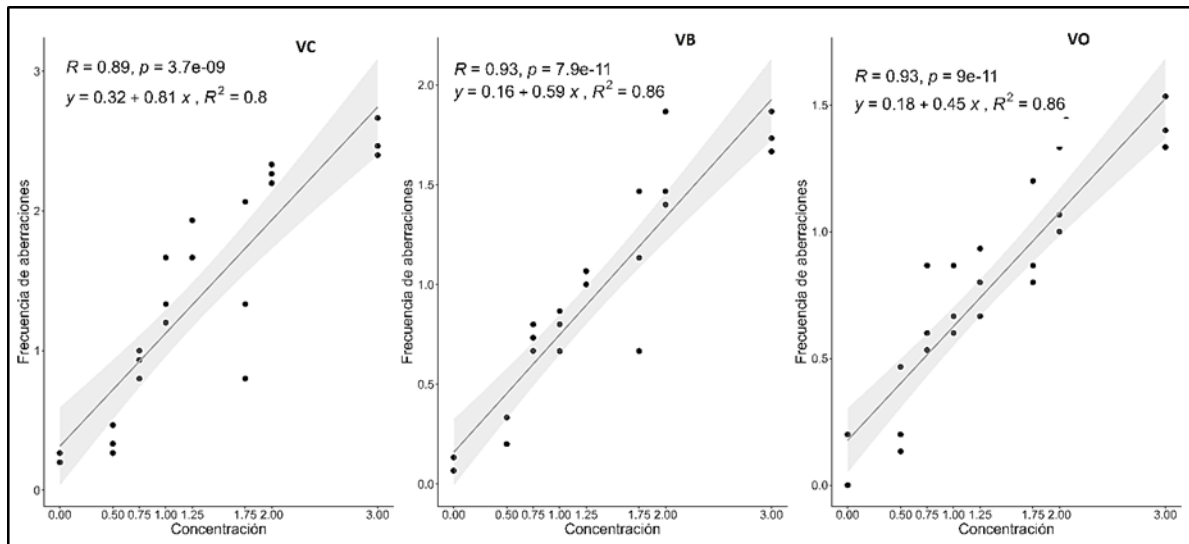


Figura 7 Aberraciones cromosómicas (AC) en *Allium cepa* inducida por tres tipos de vinaza. VC: vinaza cruda; VB: vinaza biooxidada con levaduras; VO: vinaza oxidada por reacciones de Fenton.

Cuando comparamos la respuesta en la concentración más alta (3 %), se observa una disminución de las AC en VC, VB y VO con valores de 2,5, 1,10 y 0,89 respectivamente (Tabla 4).

Por último, los resultados de micronúcleos se observaron de manera similar a las AC por la tendencia positiva al obtener valores de coeficiente de correlación de 0,64, 0,76 y 0,63 para VC, VB y VO respectivamente (Figura 8). Esto indica una baja relación lineal entre los datos, en comparación con lo registrado para IM y AC. En este sentido, no se observa un impacto significativo en las diferentes concentraciones y solo es evidente diferencias significativa en la concentración de 3 % con respecto al control para la VC.

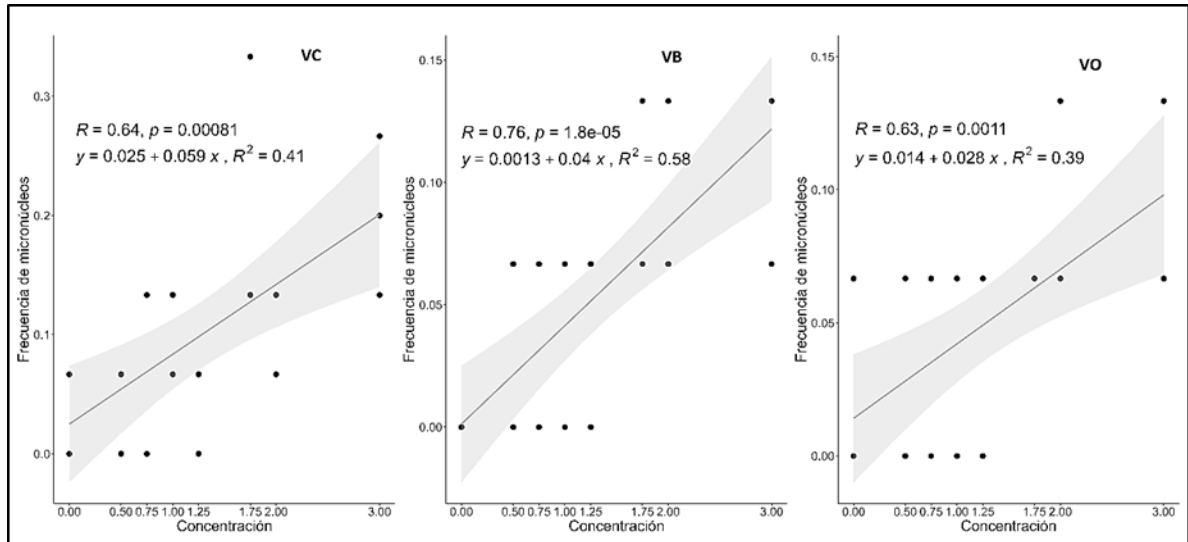


Figura 8 Mironucleos (MN) en *Allium cepa* inducida por inducida por tres tipos de vinaza. VC: vinaza cruda; VB: vinaza bioxidada con levaduras; VO: vinaza oxidada por reacciones de Fenton.

La comparación de las respuestas en la concentración de 3 % para los diferentes tipos de vinaza, muestra un compartamiento similar a IM y AC, ya que los valores promedios de MN registrados fueron 0,20, 0,11 y 0,09 para VC, CB y VO (Tabla 4).

1.4 Discusión

Los diferentes tipos de vinaza produjeron daño citotóxico y gentóxico en células de *A. cepa*. Sin embargo, en la evaluación de MN no se observó dicho daño. Teniendo en cuenta que la inducción de micronucleos en la región F1 fue muy baja puede ser un indicativo que las anomalías mitóticas y cromosómicas observados en las células meristemáticas fueron reparados Christofolletti et al. (2012, 2013). Otra posible explicación es la dificultad en su detección, ya que en el campo visual se puede confundir con otras partículas ajenas a la muestra o incluso con precipatos de los colorantes.

Con respecto a la evaluación del IM, se registró una disminución de la división celular, así como un incremento en el daño de cromosomas para los tres tipos de vinaza (Tabla 4). Estas

observaciones también fueron reportadas por otros autores, donde asocian una reducción en el IM de las células meristemáticas con una disfunción de la cromatina inducida por interacciones metal/compuestos organometálicos-ADN o a una alteración del ciclo celular. (Anacleto et al., 2017; Bhat et al., 2016 b; Soltys et al., 2011; Radić et al, 2010).

En las AC pueden ser diversas de acuerdo con la muestra evaluada. Por ejemplo, con residuos de destilería se han reportado células que presentan C-metafase producto de una falla del huso acromático; de igual manera, se han registrado células con cromosomas que forman puentes anafásicos y cromosomas pegajosos, debido a una disfunción de la cromatina (Kumar et al 2021). Los puentes cromosómicos en la anafase y la telofase indican anomalías asociadas con los efectos clastogénicos de los contaminantes vertidos en el efluente de la destilería (Chandra y Kumar 2017a). Según (Mercykutty y Stephen, 1980) la pegajosidad en el cromosoma puede surgir debido a la eliminación de la cubierta proteica del ADN en los cromosomas, la rotura y el intercambio en las unidades de fibras plegables básicas de las cromátidas, la despolimerización del ADN y la disolución de las nucleoproteínas.

Con relación a los MN, se aprecia que por los valores de coeficiente de correlación en los tres tipos de muestra estuvo entre 0,63 y 0,76 los cuales no son tan significativos, exceptuando la concentración de 3 % en la vinaza cruda y vinaza bióxidada (Figura 5). Como se mencionó anteriormente, su detección presentó algunos inconvenientes que posiblemente sean los responsables del comportamiento de estos datos. La presencia de MN más común es aquellos formados por rupturas o quiebres en cromosomas acéntricos que no se incorporan a los núcleos hijos y se encapsulan en membranas nucleares separadas (Pellman D & Luis S. 2020, Hatch 2018). Otra razón para la existencia de MN, es la interrupción en el ensamblaje del huso mitótico ocasionado por algunos fármacos (Pellman D & Luis S. 2020). Por último, los MN pueden surgir

también a causa de cromosomas rezagados, los cuales son separados del núcleo y envueltos en una membrana, aunque esto es inusual (Pellman D & Luis S. 2020, Hatch 2018).

Referente a los tipos de vinazas contemplados en este estudio, se puede observar que la biooxidación realizada con levaduras y la oxidación con las reacciones de Fenton presentan una mejor respuesta celular al evaluar el IM, las AC y los MN.

En los resultados del IM se observa que al tratar la vinaza cruda con la biooxidación y su posterior tratamiento químico el daño disminuyó. En este sentido, se puede observar en la tabla 5, que el índice mitótico mejoró, alcanzando un 20,0% para la concentración del 2 % y 52,1 % en la concentración de 3 %. Valores más altos se observan cuando se compara la vinaza cruda con la oxidación química, donde se obtuvo una recuperación de la división celular de 46,3 % para la concentración de 2 % y 109,9 % para el 3 %.

Tabla 5

Comparación de los resultados de IM de vinaza cruda con respecto a su tratamiento con biooxidación con levaduras y con oxidación química.

Concentraciones	Diferencia entre VB-VC	% de mejora del IM	Diferencia entre VO-VC	% de mejora del IM
0,25%	0,68	6,3	1,77	16,4
0,50%	0,63	6,1	1,55	15,0
0,75%	0,36	3,8	1,32	13,8
1%	0,08	0,9	1,09	12,0
1,25%	0,11	1,4	1,42	17,7
2%	1,15	20,0	2,66	46,3
3%	1,89	52,1	3,99	109,9

Con la prueba de AC, el compartimiento de la mejora en la respuesta tanto para VB como VO fue similar, mostrando unos valores levemente superior en las concentraciones 0,75 % y 1 %

(Tabla 6). En general, se aprecia un rango de porcentaje de mejora al tratar la vinaza con levaduras entre 48,9 % y 65,0 % y para el tratamiento con la oxidación química los valores fueron entre 51,4 % y 71,4 %.

Tabla 6

Comparación de los resultados de AC de vinaza cruda con respecto a su tratamiento con bio-oxidación con levaduras y con oxidación química.

Concentraciones	Diferencia entre VC-VB	% de disminución de AC	Diferencia entre VC-VO	% de disminución de AC
0,25%	0,2	57,1	0,18	51,4
0,50%	0,44	48,9	0,48	53,3
0,75%	0,91	65,0	0,96	68,6
1%	1,1	62,9	1,25	71,4
1,25%	0,72	51,4	0,8	57,1
2%	1,27	56,4	1,54	68,4
3%	1,4	56,0	1,61	64,4

Por último, los valores de mejora en la respuesta para MN no fueron tan consistentes como en las dos pruebas anteriores, sin embargo, en la VB se alcanzó un 63,6 para la concentración de vinaza de 0,75 % y en la VO el valor más alto fue de 65,0 % para la concentración 1,25 % Tabla 7.

Tabla 7

Comparación de los resultados de MN de vinaza cruda con respecto a su tratamiento con bio-oxidación con levaduras y con oxidación química.

Concentraciones	Diferencia entre VC-VB	% de disminución de MN	Diferencia entre VC-VO	% de disminución de MN
0,25%	0,02	50,0	0,01	25,0

0,50%	0,02	50,0	0,01	25,0
0,75%	0,07	63,6	0,06	54,5
1%	0	0,0	-0,01	-25,0
1,25%	0,11	55,0	0,13	65,0
2%	0,02	18,2	0,02	18,2
3%	0,09	45,0	0,11	55,0

Teniendo en cuenta que la vinaza es una mezcla compleja, no es posible indicar cuál de los compuestos o características fisicoquímicas son responsables de su genotoxicidad. En tal caso, la capacidad de un compuesto para interferir en la acción de otro debe ser tomada en cuenta (Azevedo y Chasin, 2004). El pH, por ejemplo, puede interferir con la biodisponibilidad de los metales, ya que puede contribuir a su precipitación en el ambiente (CETESB, 2009). Los valores bajos de pH reducen la fidelidad de las enzimas de replicación y reparación del ADN potenciando efectos genotóxicos (Brusick, 1986). Pedro-Escher et al. (2016) y Christofolletti et al. (2013b) mostraron que el pH bajo fue uno de los parámetros responsables de la genotoxicidad observada en sus muestras de vinaza.

Una explicación a la mejora en la respuesta biológica entre la VB y VO con respecto a la VC es el cambio de variables químicas como el pH y la DQO. El pH ácido en el ambiente intracelular inhibe la proliferación celular (Laihia et al, 2010), lo que es congruente con el valor mayor de disminución del índice mitótico en VC con respecto a los otros dos tipos de vinaza. La biooxidación (VB) y la oxidación química (VO) redujeron la DQO y por consiguiente aumentó el valor de PH, lo que se reflejó en una mejor respuesta en las células para la evaluación del índice mitótico, aberraciones cromosómicas y los micronúcleos.

1.5 Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran que los compuestos en la vinaza afectan la división celular en células meristemáticas de raíz de *A. cepa*. En este sentido, se encontró que la vinaza

cruda (VC) tienen compuestos citotóxicos, evidenciado con una disminución de la división celular cuando se aumenta la concentración.

Se determinó que la vinaza cruda (VC) tiene un efecto genotóxico en las células meristemáticas de *A. cepa* al registrarse mayores aberraciones cromosómicas cuando la concentración de vinaza era mayor.

Los tratamientos de biooxidación y oxidación química con las reacciones de Fenton aplicados a la vinaza cruda, mostraron un efecto protector en la toxicidad y genotoxicidad en las células meristemáticas de *A. cepa*. Este análisis es coherente con los valores de pH y DQO registrados en la caracterización química realizada a los tres tipos de vinaza, mostrando valores menos perjudiciales para las células.

CAPITULO II

2.1 Evaluación de la actividad genotóxica en linfocitos humanos inducida por diferentes diluciones de vinaza generada en la planta de producción de bioetanol en Frontino, Antioquia, antes y después de ser sometidas a procesos de bio-oxidación y de Fenton.

2.1.1 Introducción

La contaminación del ambiente por subproductos de procesos agroindustriales se ha convertido en una de las principales preocupaciones de la comunidad científica, ya que muchas sustancias tienen la capacidad de generar daño en el ADN, causando alteraciones químicas o físicas, lo que se conoce como genotoxicidad (Akpoilih B.U. 2012). Genotoxicidad es un término utilizado para referirse a sustancias que afectan el material genético de una célula (ADN y ARN), perturbando así la integridad de la célula (Ren et al 2017, Mohamet et al, 2017). Algunas veces se confunde genotoxicidad con mutagenicidad (Ren et al 2017). No todas las sustancias genotóxicas ostentan propiedades mutagénicas; mientras que, cada mutágeno es capaz de inducir genotoxicidad. Existen tres tipos de agentes, los cuales están asociados con alteraciones genéticas: agentes causantes de cáncer (Ren et al 2017) como los que causan mutaciones (Mohamet et al, 2014) y teratogénesis (Sloczynska et al 2014) y los relacionados con defectos de nacimiento (Rencuzogullari et al, 2019, Nohmi et al, 2018). Cuando el daño del material genético recae sobre células somáticas, puede conducir al desarrollo de cáncer, pero si el daño se da en células germinales originará mutaciones hereditarias que ocasionan defectos congénitos; estos daños, pueden provocar lesiones menores en la molécula de ADN o anomalías cromosómicas mayores, que pueden incluir duplicación, inserción o eliminación de información genética y pueden desencadenar la aparición de diversas enfermedades (Mohamet et al, 2014, Savage et al, 1976). Cabe resaltar, que existe una estrecha asociación entre daño en el ADN e inducción de

varios tipos de cáncer (Sarasin, A. 2003). La exposición continua en bajos niveles puede generar riesgos graves para la salud, dado que el ADN es el portador de la información heredada y cualquier cambio en su estructura puede potenciar cambios biológicos graves (Reus et al., 2012). Por lo anterior, resulta importante estudiar e identificar los diferentes agentes físicos, químicos y biológicos con posibles efectos genotóxicos. Dentro de los ensayos más utilizados para el estudio de la genotoxicidad esta la prueba de electroforesis en gel de células individuales, también conocida como ensayo cometa (Singh et al., 1988), la cual además de proporcionar información valiosa se caracterizan por ser muy sensibles y de bajo costo.

2.1.2 Ensayo Cometa

El ensayo cometa ha sido objeto de diversas modificaciones, entre las que se encuentran el desarrollo de una técnica en microgeles de electroforesis bajo condiciones neutras y tinción del ADN con naranja de acridina (Ostling, O., & Johanson, K. J. 1984). Otra modificación reportada en la literatura es la hibridación in situ fluorescente (Comet- FISH) que permite evaluar el daño de ADN específico (McKenna et al., 2012). En la búsqueda de estas mejoras se logró un método más versátil y corresponde a la versión alcalina (Singh et al., 1988), que sirve para detectar niveles bajos de rupturas en el ADN; es una técnica rápida, sensible, confiable, de bajo costo, no invasiva y permite visualizar el daño en el ADN en células individuales (Maistro et al., 2004). El principio del ensayo consiste en lisar células embebidas en agarosa de bajo punto de fusión sobre portaobjetos de microscopía, posteriormente se lleva a cabo una electroforesis en condiciones neutras o altamente alcalinas ($\text{pH} > 13$). El ADN que migra después de la neutralización se tiñe con el colorante adecuado (por ejemplo, bromuro de etidio (EB), yoduro de propidio (PI), 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), y naranja de acridina) y se visualiza con un microscopio de fluorescencia; por último, con el uso de un software se evalúa cuantitativa y cualitativamente el

daño en el ADN mediante el conteo de 50 a 100 células por dosis/individuo. Hay varios parámetros de medidas; sin embargo, entre los más utilizados están el porcentaje de ADN en cola, longitud de la cola (micras) y momento de cola (Collins et al., 2008). El ensayo puede realizarse tanto *in vivo* como *in vitro* y ha sido aplicado a una variedad de muestras celulares para evaluar el daño en el ADN y estudiar la reparación del mismo (Dhawan et al, 2009). En ensayos *in vivo* se han utilizado ratones en diferentes tejidos y órganos (Sasaki et al, 2000), mientras que estudios *in vitro* se han llevado a cabo en líneas celulares de ovario (CHO), fibroblastos de ratón (V79), entre otros, y en cultivos de células primarias (Maistro et al., 2004). El ensayo cometa se ha convertido en uno de los métodos estándar para la evaluación de daño en el ADN, tanto así, que ha sido recomendado para ser usado rutinariamente en estudios de evaluación de seguridad genotóxica de productos en el ambiente, con el fin de que sean avalados bajo los parámetros de regulación internacional. Una de las ventajas del ensayo cometa es su sensibilidad para detectar el daño del ADN en el nivel más bajo (0,1 rupturas de ADN por 10E+9 daltons) en comparación con las pruebas de aberraciones cromosómicas y el ensayo de micronúcleos (Gedik, C., & S. Ewen, A. C. 1992); otras ventajas no menos importantes, son el requerimiento de un pequeño número de células (~ 10.000) por muestra, la flexibilidad para utilizar la proliferación, así como las células no proliferantes, de bajo costo, la fácil aplicación y la corta duración del ensayo (Tice et al, 2000, Muchut et al, 2011). El ensayo cometa ha sido utilizado en áreas como la toxicología genética (Araldi et al., 2014, Speit et al., 2009, Wada et al., 2014, Anderson et al., 1998, Araldi et al, 2014, Burlinson et al, 2006 Valdiglesias et al., 2011, Hobbs et al., 2012, Lent et al., 2011), biomonitoreo (Corte´s-Gutierrez et al., 2012, Aycicek et al., 2008, Patton et al., 1999, Dodani et al., 2012, McKenna et al., 2008, Apostolou et al., 2014, Collins et al., 2014), , ecogenotoxicidad (Cotelle et al., 1999, Fabiani et al., 2012, Pellegrini et al., 2014), epidemiología molecular (Kruszewski et al., 2012), nutrigenómica (Duthie S. & Hawdon A. 1998, Bishop et al., 2015) y en

nanomateriales (Huk et al., 2015), Trisiniet al., 2004). Esta prueba ha sido aplicada en diferentes tejidos para evaluar la acción de diversas sustancias. Desde 2007 a 2013, las evaluaciones registradas en la literatura muestran que el organismo más utilizado ha sido la rata y el tejido blanco más evaluado con el ensayo cometa fue el hígado en 23 estudios; otros tejidos y/o muestras considerados en investigaciones fueron mucosa gastrointestinal en nueve estudios, médula ósea en tres ocasiones, piel, riñón y en orina en dos ocasiones y por último epitelio aórtico y pulmón en una ocasión (Frotschl, 2015).

Entre la diversidad de sustancias, a manera de ejemplo, varios estudios han sido realizados en fármacos. Por ejemplo, Brambilla & Martelli, 2009 analizaron 838 fármacos usando el ensayo cometa y encontraron que el 56,3 % de ellos eran genotóxicos. En otro estudio, analizaron 476 fármacos, con la misma metodología y encontraron que el 43.5% eran genotóxicos (Snyder R. & Green J 2000). Estos datos indican la importancia de la evaluación genotóxica de productos farmacéuticos. Basados en dichos estudios, el ensayo fue propuesto por la Conferencia Internacional sobre Armonización de Requisitos Técnicos (ICH) y recomendado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) en el análisis mutagénico de fármacos (Burlinson et al., 2007, Hobbs et al., 2012, Hartmann et al., 2003).

Debido a todas las ventajas y aplicaciones de esta técnica, el número de publicaciones relacionadas con el ensayo cometa ha crecido en los últimos años de manera constante (Hartmann et al., 1996, Collins A. 2015), lo que hace que el ensayo cometa sea un campo de gran interés (Del Bo et al., 2015, Neri et al., 2010). PubMed registra más de 7600 citas entre 1990 y 2013, lo que refuerza la importancia de esta técnica (Neri et al., 2010). La base de datos de PubMed registró 737 publicaciones relacionadas con el ensayo cometa en 2014 y 173 en 2015 (Singh., 2016).

Por todo lo anterior, este capítulo tiene como objetivo evaluar la genotoxicidad sobre linfocitos humanos inducida por vinaza cruda, vinaza tratada con biooxidación, y vinaza tratada por la oxidación química, mediante las reacciones de Feltón. Los objetivos específicos contemplados en este capítulo son determinar la citotoxicidad de los tres tipos de vinaza sobre linfocitos humanos, así como evaluar la genotoxicidad mediante el ensayo cometa.

2.2 Metodología

2.2.1 Obtención de las muestras de Vinazas

Los diferentes tipos de vinazas consideradas en este capítulo fueron obtenidas como se describió en el capítulo anterior.

2.2.2 Cultivo de los linfocitos

Las muestras de sangre periférica fueron obtenidas de voluntarios con edades entre de 20 y 25 años, con consentimiento informado y declaraban estar saludables, no fumadores, sin ningún tipo de tratamiento clínico y no deportista de alto rendimiento. Se tomaron 5,0 mL de sangre total heparinizada, obtenida en las horas de la mañana. Posteriormente, la sangre se centrifugó en un gradiente de densidad de Hystopaque. Luego de la centrifugación (2.000 rpm, 25°C, 30 min), se recolectaron los linfocitos y se lavaron tres veces con buffer fosfato salino (PBS) a 1.200 rpm por 7 minutos.

2.2.3 Prueba de citotoxicidad mediante la exclusión con el colorante azul de tripano.

Con el fin de determinar la toxicidad de las diferentes muestras de vinaza (VC, VB y VO) y para establecer las concentraciones adecuadas en las evaluaciones biológicas, se utilizó la prueba de exclusión con el colorante azul de tripano. Esta prueba se basa en que las células vivas, que poseen membranas celulares intactas, logran excluir el azul de tripano mientras que las células muertas no lo hacen. Cuando los linfocitos se exponen al efecto de las dosis de extractos

de vinaza, permite observar y cuantificar el daño inducido sobre la membrana celular. En resumen, se tomaron $5E+4$ linfocitos con una viabilidad por encima del 95 %, se mezclan con el extracto y se llevaron a incubación a 37 °C durante 1 Hora. Pasado el periodo de incubación a una fracción de la muestra incubada, se adicionó azul de tripano al 0,4 % en un Eppendorf nuevo y ésta mezcla se dejó durante 15 minutos a temperatura ambiente, para que las células que hayan sufrido lesiones o estén muertas se tiñan de una tonalidad azul; por último, se calculó la viabilidad mediante la observación en placa de Neubauer, mediante la formula:

- $\% \text{ Viabilidad} = (\text{Número de células Vivas}) / (\text{Número total de células}) \times 100$

Para determinar la citotoxicidad se realizaron 20 diluciones seriadas (1:1) de cada una de las muestras de vinaza, partiendo de una concentración de 100 % hasta 0,00019 %.

2.2.4 Evaluación genotóxica a través de electroforesis en gel de células individuales (ensayo Cometa).

La metodología para determinar la genotoxicidad consideró diferentes concentraciones de cada una de los tres tipos de vinaza como fueron 0,5 %, 0,75 %, 1,0 %, 1,25 %, 1,75 % y 3,0 %, así como un control negativo, el cual fue PBS, y un control positivo como peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Para detectar el daño en el ADN se utilizó electroforesis en gel de células individuales (ensayo cometa alcalino) siguiendo el protocolo propuesto por Tice (Tice et al., 2000); en resumen, 50.000 células fueron tratadas con cada muestra de vinaza y se mezclaron con 80 μ L de agarosa de bajo punto de fusión. Luego, cada suspensión se vierte a un portaobjetos con agarosa de punto de fusión normal, los cuales se incuban durante 6 minutos a 4 °C. Finalizada la incubación, las placas son sometidas a lisis celular a 4 °C, durante 1 h y posteriormente se someten a electroforesis alcalina aplicando 25 mV y 300 mA por 30 minutos; luego, las placas fueron sometidas a tres lavados durante 5 minutos con buffer neutralizante frío. Si la lectura de

los resultados no se hace el mismo día, las placas son fijadas con metanol y almacenadas en cámara húmeda hasta su lectura. Para la visualización de los cometas, a cada placa se adicionó bromuro de etidio (BrEt, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como colorante y su observación se realizó usando un microscopio de fluorescencia (Nikon), con filtro verde y con un objetivo de 40 X (Figura 6). El parámetro para determinar daño evaluado en esta investigación fue la medida de longitud de la cola (μm).

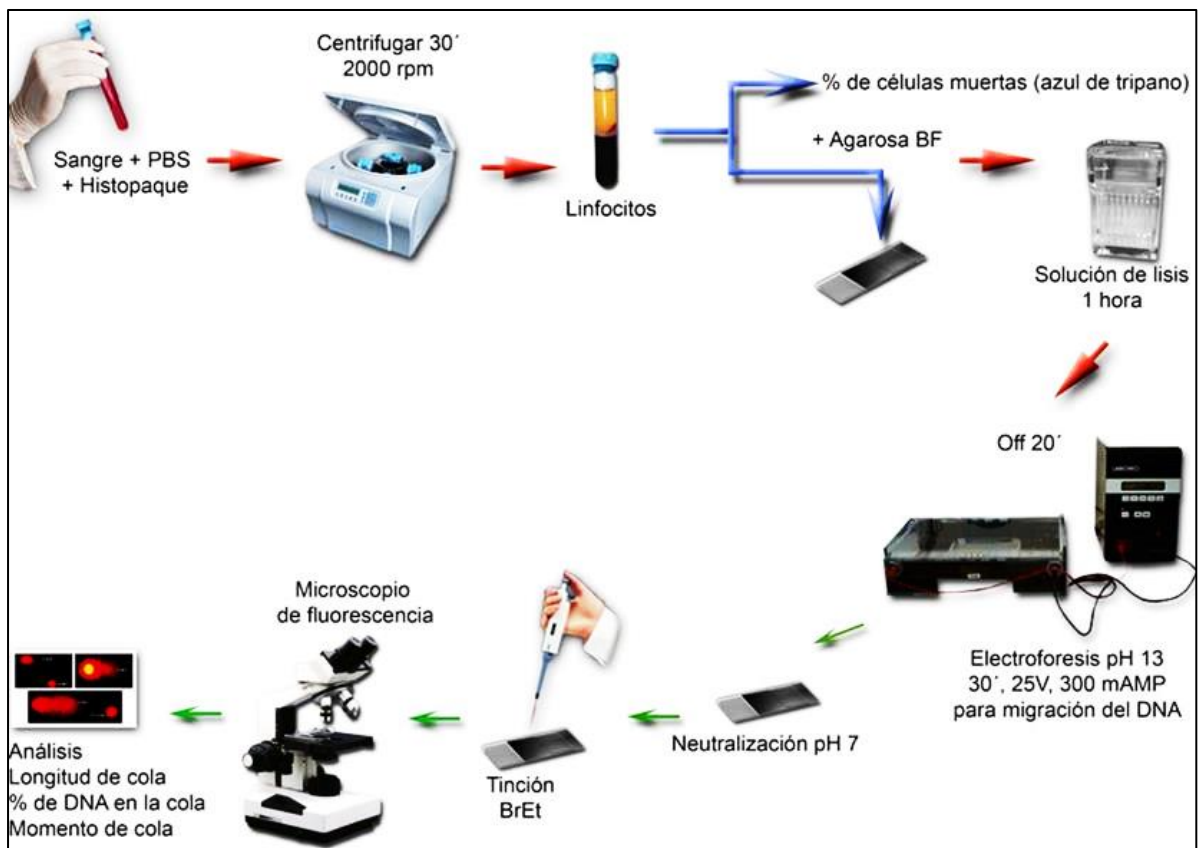


Figura 9 Pasos metodológicos para el ensayo cometa usando en linfocitos de sangre periférica humana.

2.2.5 Análisis estadísticos

En el presente estudio, se efectuó un análisis estadístico de los datos recabados referentes a la variable de longitud de la cola. Primero, se procedió con una estadística descriptiva; para

ello, se calculó la media aritmética y la desviación de los resultados de tres ensayos independientes para cada una de las mencionadas variables, proporcionando una representación central de los datos.

Posteriormente, con el objetivo de explorar la relación potencial entre la variable y determinar la naturaleza y fortaleza de esta relación, se aplicó una regresión lineal entre longitud de la cola vs concentraciones de los diferentes tipos de vinaza: vinaza cruda, vinaza biooxidada con levadura y vinaza oxidada con reacción de Fenton. El criterio convencionalmente aceptado en la literatura científica es que una relación es considerada estadísticamente significativa si el valor de p (probabilidad) es inferior a 0,05. En consecuencia, cualquier relación con un valor menor a este umbral se interpretó como un indicativo de una correlación no aleatoria entre las variables en cuestión.

2.3 Resultados

2.3.1 Citotoxicidad

Los resultados de las diferentes evaluaciones de viabilidad celular en linfocitos humanos para los tres tipos de muestras: vinaza cruda (VC), vinaza biooxidada (VB) y vinaza sometida a procesos de oxidación por reacción de fenton (VO) son registrados en la tabla 8.

Tabla 8

Citotoxicidad inducida en linfocitos humanos por vinaza cruda (VC), vinaza biooxidada con levaduras (VB) y vinaza oxidada por reacción de Fenton (VO). Como control negativo se usó PBS y como control positivo DMSO puro (viabilidad 3,5 %).

Concentración (%)	VC	VB	VO
	Promedio	Promedio	Promedio
0,00019	94,0 ± 2,0	95,7 ± 4,9	97,3 ± 4,6

0,00038	93,3 ± 4,9	94,0 ± 3,6	95,3 ± 3,1
0,00076	92,7 ± 4,0	94,3 ± 1,5	97,7 ± 1,5
0,00152	94,7 ± 2,1	95,0 ± 4,6	94,7 ± 3,5
0,00305	92,3 ± 0,6	93,0 ± 2,6	96,0 ± 2,6
0,00610	92,7 ± 4,2	95,7 ± 2,1	95,7 ± 2,5
0,01220	90,0 ± 2,6	93,3 ± 0,6	94,3 ± 1,5
0,02441	94,0 ± 4,6	95,3 ± 2,9	96,7 ± 3,2
0,0488	92,3 ± 3,5	96,7 ± 4,0	94,3 ± 2,1
0,09765	95,3 ± 4,5	95,0 ± 2,6	97,3 ± 3,8
0,19531	92,7 ± 2,3	96,0 ± 2,6	95,7 ± 3,5
0,39063	92,0 ± 3,0	94,0 ± 1,7	93,7 ± 2,5
0,78125	89,3 ± 1,2	95,7 ± 2,3	98,0 ± 1,0
15,625	90,0 ± 2,0	97,3 ± 3,1	95,0 ± 3,0
3,125	87,7 ± 3,1	95,0 ± 1,7	97,7 ± 1,5
6,25	89,3 ± 2,1	92,7 ± 1,5	96,7 ± 3,2
12,5	86,7 ± 0,6	95,7 ± 2,1	97,7 ± 2,5
25	85,3 ± 1,5	96,0 ± 1,0	95,7 ± 5,1
50	74,7 ± 1,5	94,3 ± 1,5	97,3 ± 2,1
100	69,7 ± 0,6	95,0 ± 2,6	95,0 ± 1,0

Los resultados mostrados en la tabla 8, dan cuenta de la viabilidad celular en los ensayos de toxicidad al presentar valores por encima del 85 % en los tres tipos de vinaza. Es de anotar, que en las dosis de VC por encima de 3 % la viabilidad disminuyó con valores entre el 70 y el 88%, caso contrario se observó para VB y VO cuyas viabilidades se mantuvieron por encima del 93 y 94% respectivamente.

2.3.2 Genotoxicidad

Los resultados de las diferentes evaluaciones de la genotoxicidad en linfocitos humanos para los tres tipos de muestras: vinaza cruda (VC), vinaza biooxidada (VB) y vinaza oxidada (VO) son registrados en la tabla 9.

Tabla 9

Genotoxicidad en linfocitos humanos inducida por vinaza cruda (VC), vinaza biooxidada con levaduras (VB) y vinaza oxidación (VO). Los resultados se obtuvieron de tres experimentos independientes cada uno por duplicado y de cada tratamiento.

Concentración (%)	VC	VB	VO
0	54,06 ± 6,6	53,11 ± 6,4	51,52 ± 3,8
0,5	56,35 ± 6,0	59,83 ± 4,7	60,69 ± 5,7
0,75	64,59 ± 7,4	66,70 ± 4,5	67,50 ± 4,2
1	67,13 ± 7,4	69,06 ± 2,8	69,37 ± 1,7
1,25	69,42 ± 8,8	76,16 ± 5,0	76,17 ± 5,0
1,75	70,36 ± 7,8	78,57 ± 5,1	74,54 ± 4,4
3	72,31 ± 7,3	81,66 ± 5,2	77,35 ± 4,5
H ₂ O ₂ 50 μM	86,21 ± 9,3	99,97 ± 6,0	110,34 ± 9,1

Se puede apreciar que los valores en la vinaza con el tratamiento biooxidado (VB) con levaduras anaeróbicas y la oxidación química con las reacciones de Fenton (VO) muestran valores similares (Figura 10). En los tres tipos de vinaza se observa un efecto de dosis, es decir, a mayor concentración de la vinaza mayor el daño.

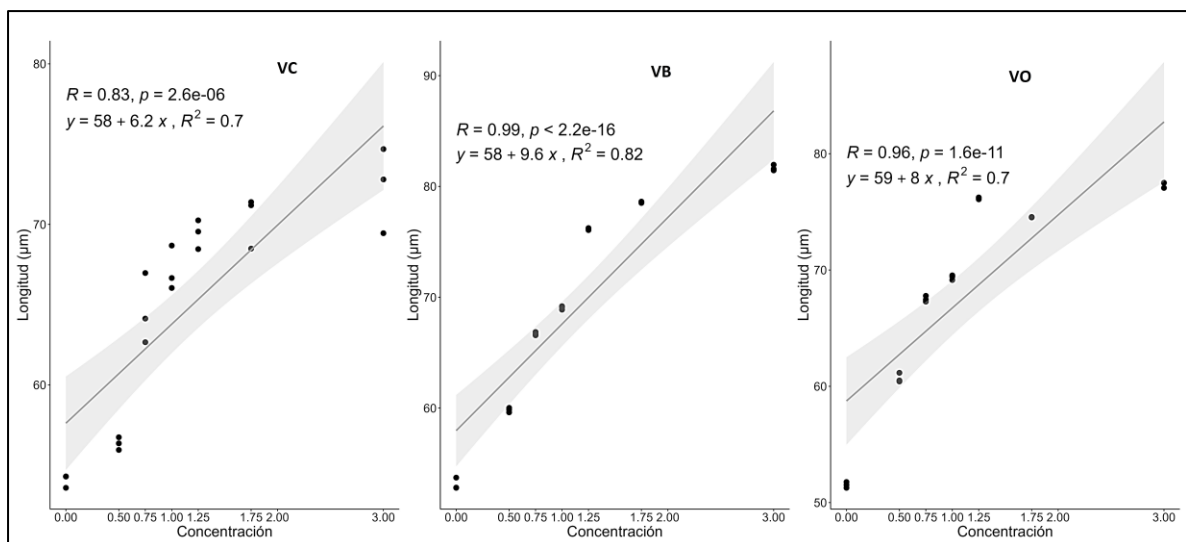


Figura 10 Genotoxicidad inducida en el ADN de linfocitos humanos por vinaza cruda (VC), vinaza biooxidada con levaduras (VB) y vinaza oxidada (VO). El control negativo utilizado fue

PBS y el control positivo fue peróxido de hidrogeno H_2O_2 50 μM . Los datos corresponden al promedio de daño 300 células.

Los resultados de los análisis mediante regresiones lineales muestran una tendencia de linealidad de los datos donde se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,83, 0,99 y 0,96 para VC, VB y VO respectivamente. Así mismo, los datos de cada una de las concentraciones presentan diferencias estadísticas significativas con respecto al contro negativo.

Los resultados de toxicidad (Tabla 8) en VC muestran que por encima de las concentraciones de 3% las células presentan menor viabilidad. La prueba de azul de tripano indica el daño sobre la célula, especialmente a nivel de membrana dado que esta prueba es un indicativo de su integridad (Stahlhoefer et al., 2022, Crisóstomo 2017). En comparación con la VB y la VO, la viabilidad celular se comporta de manera similar a las células no tratadas, incluyendo las respuestas para la concentración por encima del 3 %. Una posible explicación es la presencia de compuestos nitrogenados, que por acción de los micro organismos producen óxido nítrico en vinaza cruda; este compuesto interactúa con hemoproteínas como la guanilil ciclasa, las catalasas y proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial (Cooper, 1999; Murphy, 1999). En consecuencia, concentraciones de vinaza cruda inferiores a 3 % no tienen efecto citotóxico y los valores por encima de 3 % de VB y de VO indican que en dichos tratamientos se reduce el efecto citotóxico en linfocitos humanos.

Con respecto a la genotoxicidad, los resultados obtenidos en cada una de las concentraciones de vinaza comparados con el control negativo muestran una tendencia creciente de daño genotóxico conforme aumenta la concentración de estas (Figura 7). Esto indica un incremento de las lesiones primarias sobre el ADN, lo cual, está directamente relacionado con el

aumento en las alteraciones genéticas celulares. Resultados similares fueron reportados en muestras de sangre de peces evaluadas con el ensayo cometa, donde los autores consideraron diluciones de vinaza de 1 %, 2,5 % y 5 % y en todas se presentó daño excepto en la dilución 1 %. (Correia et al, 2017).

Con relación a los tipos de tratamientos de vinazas, la VB y la VO los resultados de genotoxicidad no mostraron diferencias con respecto a la VC. Una posible explicación es la presencia de melanoidinas, las cuales no son eliminadas por la levaduras en en tratamiento anaeróbico (VB) y por las reacciones de Fento (VO).

Las malanoidinas han sido reportadas con efecto gentoxico en linfocitos humanos (Glösl et al., 2004), aunque esto puede ser un poco contradictorio, dada que es bien conocido las propiedad antioxidantes de las melanoidinas. Falta mayor conocimiento al respecto, porque hay diversas formas de obtener melanoimidinas que incluyen condiciones químicas como el pH, el origen del sustrato, la temperatura y el solvente, entre otros (Kim & Lee, 2008; Kwak et al., 2005)

2.5 Conclusiones

Se determinó la citotoxicidad de la vinaza cruda por enzima de la concentración de 3 % en linfocitos humanos y se observó que los tratamientos de biooxidación (VB) y oxidación química (VO) con las reacciones de Fenton tiene un efecto protector dichas celulas en estas mismas concentraciones.

La genotoxicidad presentó un efecto de dosis, aumentando la respuesta de genotoxicidad a mayor concentración en los tres tipos de vinaza. En esta evaluación no hubo una mejora en la respuesta de genotoxicidad con las vinaza tratadas con biooxidación y con oxidación química.

CAPITULO III

3.1 Determinación de la actividad mutagénica en *Salmonella typhimurium* inducida por diferentes diluciones de vinaza generada en la planta de producción de bioetanol en Frontino, Antioquia, antes y después de ser sometidas a procesos de bio-oxidación y de Fenton.

3.1.1 Introducción

Desde hace algunos años existe mucha preocupación de que las sustancias tóxicas son factores que contribuyen a que se den varias clases de enfermedades como el cáncer, enfermedades congénitas y envejecimiento, entre otras. En las últimas décadas, ha surgido el concepto de mutación para explicar el mecanismo por el cual los agentes químicos, físicos y/o biológicos causan efectos adversos en la salud. Las mutaciones pueden ocurrir al azar, por lo que no es posible predecir en cuál gen o célula en particular aparecerá.

Las sustancias químicas mutagénicas están presentes en el aire que respiramos, en el agua que bebemos y en los alimentos que consumimos. Se pueden encontrar en los residuos de la industria, en productos de combustión industrial y vehicular, en drogas, presentes como sustancias inorgánicas, (Shuduan ET AL., 2020, Mosley et al., 2020,) en aguas negras, en productos agroquímicos, en herbicidas (Zeleta et. al. 1990), alimentos fritos y asados etc. (Sugimura T. et. al, 2004; Sanz-Serrano et al, 2021). Con el fin de controlar y atenuar la presencia de mutágenos la ciencia actual propende por una búsqueda permanente en los recursos naturales y artificiales que permitan realizar una investigación limpia, segura y cada vez mas tratar de minimizar el impacto ambiental que por nuestro oficio causamos en el ambiente.

En general los mutágenos llegan al organismo mezclados con otros mutágenos o material no mutagénico. Se ha demostrado que estas mezclas pueden producir efecto aditivo o potenciar o disminuir el efecto; por ejemplo, se observó que diferentes combinaciones de cinco aminas heterocíclicas (AH) aumentan la producción de adenocarcinomas en el intestino de ratas (Ohgaki gawa et al, 1991). Se ha observado que los mutágenos Mx y la amina heterocíclica Glu- p.1 al estar mezcladas aumenta la mutagenicidad indirecta de Glu-p-1. Se observó que el cromo mezclado con hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) aumenta la unión de los HPA al gen P53 en células humanas del pulmon. (Feng et al, 2003).

Con respecto a los métodos usados por la toxicología genética, hay una gama de ellos, dependiendo de los objetivos que se deseen alcanzar. En este sentido, se pretende determinar si un agente en particular es capaz de inducir daño al ADN; para esto, se han desarrollado sistemas biológicos, especialmente en micro organismos, para la detección del daño genético provocado por agentes químicos o mezclas de ellos, que sean eficientes, rápidos y económicos (Ames et al., 1973,75, 79). Una de las pruebas más comunmente usadas para este fin es el tes de Ames.

3.1.2 Actividad mutagénica en *Salmonella typhimurium* (Test de Ames).

El ensayo de *Salmonella typhimurium* (prueba de *Salmonella*; test de Ames), es un ensayo bacteriano a corto plazo, ampliamente aceptado para identificar sustancias que pueden producir daño genético que conduce a mutaciones genéticas. Esta prueba emplea bacterias mutantes (auxótrofas, his⁻) de *Salmonella typhimurium* incapaces de sintetizar el aminoácido histidina, mientras que las cepas silvestres (protótrofas, his⁺) lo pueden hacer, por lo que no requieren este aminoácido en el medio de cultivo. La base del ensayo consiste en revertir el fenotipo mediante la inducción de mutaciones en el operón de la histidina (Tabla 10), lo que confiere a los revertantes la capacidad de crecer en medios mínimos carentes del aminoácido

(Ames 1975). Varios autores han cuestionado la eficacia de estos sistemas, basando sus críticas principalmente en la gran diferencia evolutiva que existe entre las bacterias y los mamíferos, lo que dificulta la extrapolación de resultados para la posible toma de decisiones. No obstante, la inclusión de la fracción microsómica S9 del hígado de mamífero aporta los paquetes enzimáticos que están involucrados en el metabolismo y con ello se facilita el análisis de los mutágenos indirectos, también conocidos como promutágenos (Maron and Ames, 1983).

La prueba de mutagenicidad de Salmonella se diseñó específicamente para detectar mutagénesis inducida químicamente (Ames 1975) . A lo largo de los años, su valor como tal ha sido reconocido por la comunidad científica y por las agencias gubernamentales y corporaciones. El ensayo se utiliza en todo el mundo como una prueba inicial para determinar el potencial mutagénico de nuevos productos químicos y fármacos, porque existe un alto valor predictivo para la carcinogenicidad en roedores, cuando se obtiene una respuesta mutagénica (McCann et al., 1975, Sugimura et al., 1976, Zeiger E.1985, Ames et al, 1973). También se han desarrollado directrices internacionales, por ejemplo, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), la Comisión Internacional de Armonización (ICH)) para que los laboratorios de pruebas aseguren la uniformidad de los procedimientos de prueba, antes de la presentación de datos a las agencias reguladoras para el registro o aceptación de muchos productos químicos, incluidos medicamentos y biocidas.

3.1.3 Características de las cepas

Con el objeto de lograr que se introduzcan a la bacteria moléculas grandes como los Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HPA) Ames et al., 1973-83, han modificado las cepas de *Salmonella typhimurium* con la presencia del marcador rfa que les confiere gran permeabilidad a diversas sustancias, por la pérdida de lipopolisacáridos de la pared celular (Tabla 7). Además de

esto, el empleo de diferentes cepas permite establecer si las mutaciones se inducen por mecanismos de sustitución de bases (TA100) o por corrimiento del marco de lectura (TA98). Por lo tanto, el interés de esta prueba radica en el hecho de conocer no sólo si un agente químico es mutagénico, sino también el mecanismo molecular que está involucrado (Tabla 10). De igual manera, la existencia de un plásmido (factor R), proporciona resistencia al antibiótico ampicilina y es usado para validar que la cepa cuenta con las características antes de aplicar la prueba; así mismo, si las bacterias crecen cuando se ponen en radiación UV, indicaría que la cepa perdió el gen que interviene en la reparación por escisión (Tabla 10). Otra característica de las cepas es que revierten de manera espontánea por las condiciones específicas del medio; por ejemplo, la TA98 presenta crecimiento de manera espontánea entre 20 a 50 colonias por caja y en la cepa TA100 este número corresponde entre 120 a 200. Este criterio es importante, ya que, si en determinada prueba se obtienen valores muy superiores a esta reversión, se considera que los compuestos analizados pueden ser potenciamente mutágenos. Todas estas características de las cepas mencionadas permiten contar con una prueba sensible muchos mutágenos.

Tabla 10

Cepas de Salmonella typhimurium comunmente empleadas para pruebas de mutagenesis.

Cepa	Mutación	Mecanismo molecular de mutación	Otras características		
			LPS	Reparación por escisión	Factor <i>f</i>
TA-100	<i>HisG46</i> que codifica la primera enzima en la biosíntesis de la histidina.	Sustitución de bases	<i>rfa</i>	uvrV	+
TA-98	<i>HisD3052</i> que	Desplazamiento del	<i>rfa</i>	uvrV	+

	codifica para la histidina deshidrogenasa.	marco de lectura.			
--	--	-------------------	--	--	--

En este capítulo, se plantea como objetivo determinar la actividad mutagénica en *Salmonella typhimurium* inducida por diferentes diluciones de vinaza generada en la planta de producción de bioetanol en Frontino, Antioquia, antes y después de ser sometidas a procesos de bio-oxidación y de Fenton. Para el logro de este objetivo, se requirió evaluar el efecto mutagénico por ganancia o pérdida de bases nitrogenadas con la cepas TA98 sin S9 y con S9; de la misma manera, se contempló evaluar la cepa TA100 sin y con S9 para determinar si las vinazas tienen un efecto mutagénico por sustitución de bases.

3.2 Metodología

En este estudio se usaron dos cepas de *Salmonella typhimurium* como son la TA 98 y TA100 a través del test de (Ames Ames BN. 1975), modificado por (Kado et al., 1983) para evaluar la actividad mutagénica de los extractos de vinaza. Los tres tipos de vinaza fueron descritos en el capítulo 1.

3.2.1 Preparación de las concentraciones de vinaza

Para preparar las concentraciones utilizadas en el test de Ames, se requirió hacer una curva de citotoxicidad del extracto de vinaza con diluciones seriadas partiendo desde el stock (100%) hasta completar 20 diluciones (0,0002%). Partiendo de esto, las concentraciones en los tres tipos de vinaza usadas, en ambas cepas para la evaluación mutagénica, fueron 3,125 %, 6,25 %, 12,5 %, 25,0 %, 50,0 % y 100,0 %. Cada experimento se realizó con y sin adición de enzimas metabólicas de hígado de rata, fracción S9.

3.2.2 Test de Ames

Se siguió el protocolo descrito por Maron y Ames, (1983). Con cada muestra se tratan $1E+7$ bacterias, con y sin presencia de enzimas activadoras contenidas en un homogenizado de hígado (mezcla S-9) de rata macho. La muestra se preincuba a 37°C por una hora y luego se siembra en agar mínimo. El conteo de colonias se hará después de 48 horas. Para la cepa TA98 sin S9 se usó como control positivo Daunomicina $6\mu\text{g}$ y en la cepa TA100 se usó como control positivo 4NQ $1,5\mu\text{g}$ por plato. Como control positivo con S9 se usó 2AA $1,5\mu\text{g}$ por plato. Como control negativo se usa agua desionizada y bi-distilada.

El criterio para una respuesta positiva se consideró cuando hay un incremento significativo de mutación con relación al control negativo en los tres experimentos realizados de forma independiente.

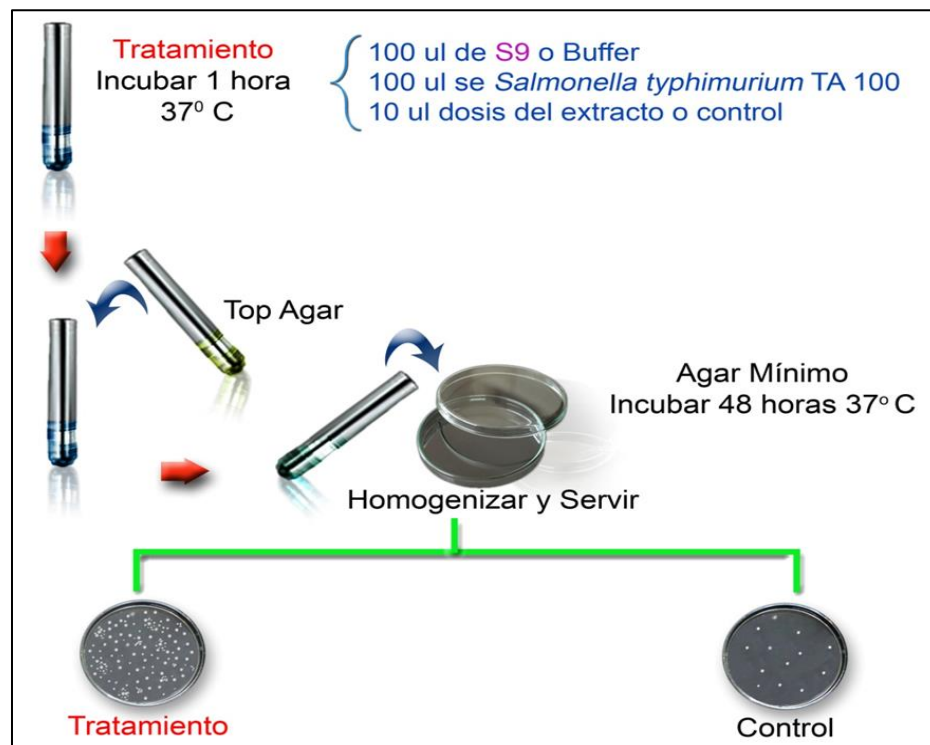


Figura 10 Pasos resumidos del Test de Ames aplicados en este estudio

3.3 Resultados

3.3.1 Mutagenicidad evaluada por el test de Ames

Los resultados de mutagenicidad en *Salmonella Tiphymurium* TA-98 y TA100 con y sin S9, para los tres tipos de muestras: vinaza cruda (VC), vinaza bioxidada (VB) y vinaza sometida a procesos de oxidación por reacción de fenton (VO) son registrados en la tabla 8 y tabla 9 y figuras 9 a la 12.

De acuerdo con el criterio para que un compuesto sea mutagénico, este debe superar el doble de revertantes con respecto al control negativo. Como se puede apreciar, ninguna dosis de vinaza en la cepa TA98, sin S9 y con S9 alcanzó entre 40 y 50 revertantes, valores que determinarían la acción mutagénica de alguno de los tipos de vinaza; el valor más alto correspondió a 26,3 revertantes para la VO en la dosis 6,25 % con S9 (Tabla 11).

Tabla 11

Actividad mutagénica en Salmonella tipymurium TA98 inducida por vinaza cruda (VC), vinaza bioxidada con levaduras (VB) y vinaza bioxidada con levaduras (VO) con la adición o no de enzimas microsomales (S9).

Dosis	TA-98					
	VC		VB		VO	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
0	21,3 ± 1,2	25,0 ± 0,8	20,3 ± 2,3	22,3 ± 2,8	19,0 ± 4,6	19,2 ± 3,5
3,125	21,0 ± 1,6	24,3 ± 0,8	21,7 ± 1,9	22,0 ± 2,8	25,5 ± 3,5	23,2 ± 6,0
6,25	21,7 ± 1,4	24,0 ± 1,4	22,1 ± 2,6	24,5 ± 1,0	25,8 ± 3,3	26,3 ± 5,5
12,5	20,7 ± 1,3	23,7 ± 2,1	20,1 ± 2,3	22,5 ± 2,6	25,0 ± 3,9	22,8 ± 2,0
25	20,3 ± 0,8	24,3 ± 1,0	22,7 ± 2,3	24,5 ± 1,0	24,0 ± 4,1	22,0 ± 4,0
50	20,7 ± 1,5	23,0 ± 1,5	20,3 ± 2,8	22,8 ± 1,6	22,8 ± 3,6	24,7 ± 3,0
100	21,3 ± 1,2	22,7 ± 1,4	21,7 ± 5,0	23,5 ± 1,0	23,8 ± 2,9	23,3 ± 3,0

De manera similar sucedió con la cepa TA100 sin S9 y con S9 (Tabla 12), ninguna dosis estuvo en un promedio de revertantes entre 166,6 y 192,4, que sería el rango para determinar

algún efecto mutagénico de alguno de los tipos de vinaza; el valor más alto fue en VO en la dosis 12,5 % con S9 para valor promedio de 108,3.

Tabla 12

Actividad mutagénica en Salmonella tipymurium TA100 inducida por vinaza cruda (VC), vinaza biooxidada con levaduras (VB) y vinaza oxidada (VO) con la adición o no de enzimas microsomales (S9). Los datos corresponden al promedio de tres experimentos independientes, cada uno por duplicado.

TA-100						
Dosis	VC		VB		VO	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
0	83,7 ± 1,2	87,8 ± 1,0	96,2 ± 4,8	89,5 ± 2,8	89,0 ± 1,5	89,5 ± 2,6
3,125	84,2 ± 1,2	24,3 ± 0,8	93,8 ± 4,2	90,3 ± 2,9	107,0 ± 16,2	114,5 ± 15,9
6,25	84,0 ± 1,2	88,0 ± 1,4	93,3 ± 4,9	91,2 ± 1,7	104,0 ± 15,4	107,3 ± 15,9
12,5	83,0 ± 1,8	87,7 ± 2,0	92,7 ± 5,4	92,3 ± 4,5	107,0 ± 11,5	107,7 ± 14,5
25	82,8 ± 1,9	88 ± 0,8	92,7 ± 3,5	95,5 ± 5,2	117,0 ± 8,3	102,5 ± 15,7
50	82,8 ± 1,8	88,3 ± 1,4	91,0 ± 4,1	92,2 ± 2,8	103,0 ± 12,8	98,7 ± 8,9
100	83 ± 1,8	87,8 ± 0,8	91,2 ± 4,3	91,8 ± 4,1	111,0 ± 14,7	111,0 ± 15,5

Los resultados promedios de revertantes en ambas cepas sin S9 obtenidos para los diferentes tipos de vinaza, son reafirmados con el análisis de regresión lineal aplicado a los datos. Para la cepa TA98, aunque en la VC se obtuvo un valor $p < 0,05$ y un coeficiente de correlación de 63 % negativo (Figura 12), no se registró actividad mutagénica debido a que no se cumplió el criterio de duplicar el número de revertantes.

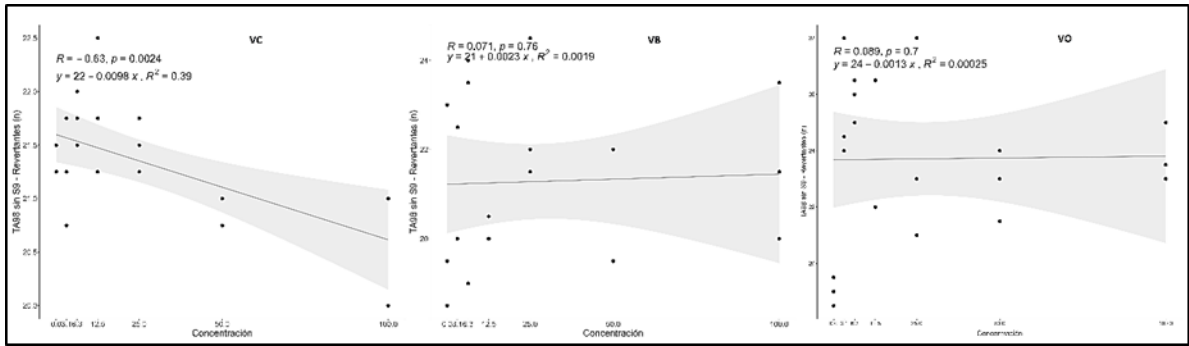


Figura 12 Revertantes en *Salmonella typhimurium*, inducidas por diferentes concentraciones de vinaza cruda, vinaza biooxidada con levaduras y vinaza oxidada en la cepa TA98 sin S9.

El control positivo usado fue Daunomicina 6µg por plato y como control negativo fue agua desionizada y bidestilada. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos independientes, cada uno por duplicado.

En la VB y la VO los valores de p fueron de 0,76 y 0,70, así como el coeficiente de correlación menor a 10 % respectivamente, lo que indica que los datos no alcanzaron un comportamiento lineal y una media con tendencia a cero.

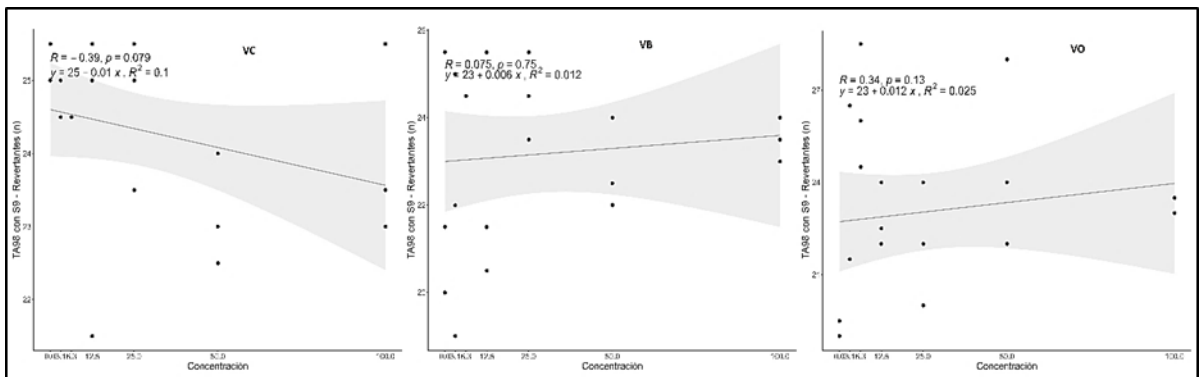


Figura 11 Revertantes en *Salmonella typhimurium*, inducidas por diferentes concentraciones de vinaza cruda, vinaza biooxidada con levaduras y vinaza oxidada en la cepa TA98 con S9.

El control positivo con activación metabólica se usó 2AA (2-amino antraceno) 1,5 µg por plato y el control negativo se usó agua desionizada y bidestilada. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos independientes, cada uno por duplicado.

Con respecto a la cepa TA100 (Tabla 9), los resultados no mostraron que las vinazas induzcan mutaciones. Los análisis de regresión lineal para la cepa TA100 sin S9, muestran que en VC los datos tienen tendencia a cero con un coeficiente de correlación de solo 6 % (Figura 14). Mientras que en la VB y la VO estos coeficientes son de 46 % y 50 % respectivamente, el primero con una tendencia inversa y el segundo directamente proporcional. En estos dos tipos de vinaza, los valores de p fueron inferiores a 0,05, sin embargo, como se describió anteriormente, ninguna de las dosis duplicó el número de colonias revertantes con respecto al número registrado en el control negativo.

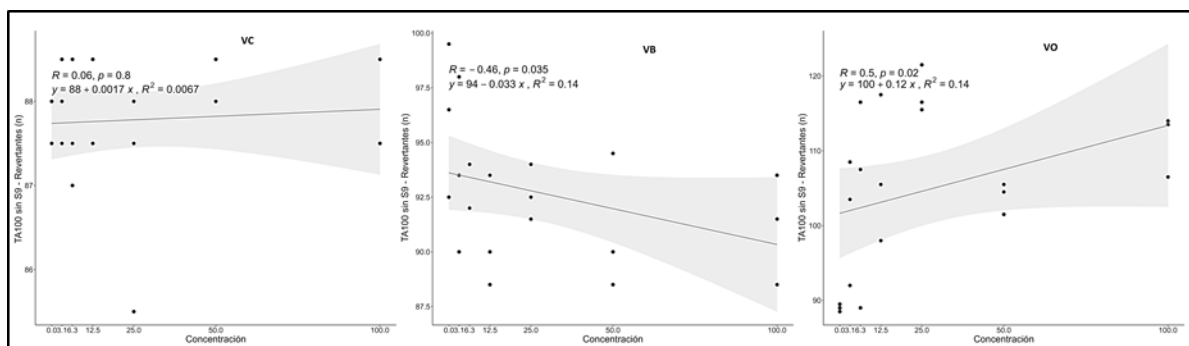


Figura 124 Revertantes en *Salmonella typhimurium*, inducidas por diferentes concentraciones de vinaza cruda, vinaza biooxidada con levaduras y vinaza oxidada en la cepa TA100 sin S-9.

El control positivo 4NQ (4-Nitroquinolina) 1,5 µg por plato y el control negativo fue agua desionizada y bidestilada. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos independientes, cada uno por duplicado.

Los análisis para esta cepa con S9 presentaron un coeficiente de correlación muy bajo en los tres tipos de vinaza, como fueron -0,37, 0,45 y 0,21 para VC, VB y Vo respectivamente (Figura 15). De estos, solamente se obtuvo un valor de p inferior a 0,05 en VB, sin embargo, un 45 % de los datos no es lo suficientemente representativo para afirmar el efecto mutagénico de este tipo de vinaza. Así mismo, esto está reafirmado con los resultados en todas las dosis evaluadas, los cuales ninguno duplicó e número de revertantes con respecto al control negativo.

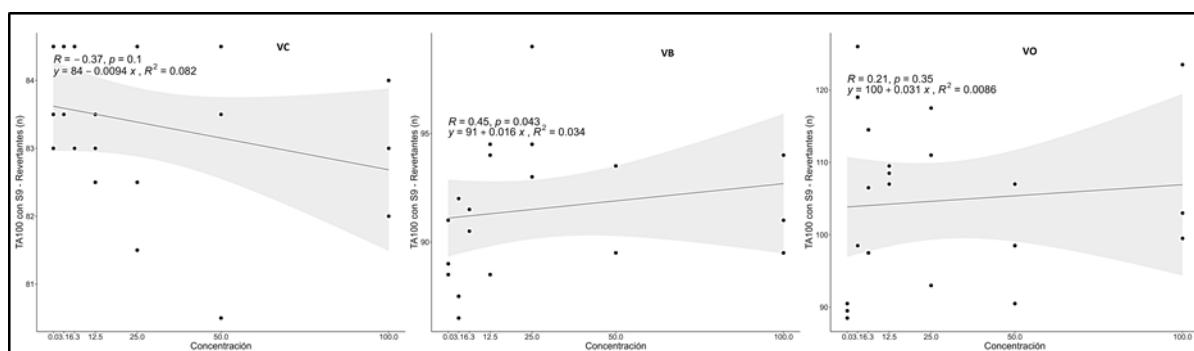


Figura 135 Revertantes en *Salmonella typhimurium*, inducidas por diferentes concentraciones de vinaza cruda, vinaza biooxidada con levaduras y vinaza oxidada por reacción de Fenton en la cepa TA100 con S-9.

Como control positivo con activación metabólica se usó 2AA 1,5µg por plato Como control negativo se usa agua desionizada y bi-distilada. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos independientes, cada uno por duplicado.

3.4 Discusión

La ausencia en la respuesta mutagenica fue evidente en los tres tipos de vinaza analizados en el presente estudio para las cepas TA98 y TA100 sin y con la adición de enzimas microsomales (S9). Esto indica que las vinazas consideradas en esta evaluación no contienen compuestos que induzcan mutación, que pueda ser detectada por estas cepas, como la ganancia, pérdida o sustitución de bases nitrogenadas. Otra razón posible es que efectivamente habían

compuestos mutagénicos, pero la presencia de melanoidinas podrían bloquear dicha actividad mutagénica, debido a su capacidad antioxidante reportada previamente en vinagre (Xu et al., 2007). Así mismo, las melanoidinas al ser moléculas recalcitrantes no fueron afectadas por los tratamientos en la vinaza biooxidada y oxidada con las reacciones químicas de Fenton (Parnaudeau et al., 2008).

Otra posible explicación es que los compuestos presentes en estas muestras son aneugénicos, es decir, tienen efectos sobre estructuras del aparato mitótico en células eucarióticas o sobre proteínas como las histonas, los cuales no se encuentran en células procarióticas (Corrêa et al., 2016; Chowdhary et al., 2022).

Estos resultados son coherentes con otro estudio donde no se encontró efecto mutagénico con la cepa TA100 sin S9 y con S9. Sin embargo, en la cepa TA98 efectivamente se encontró efecto mutagénico, alcanzando 5 veces las colonias revertantes con respecto al control en la dosis de 50 % de vinaza cruda (Oñate et al., 2015). En este mismo estudio, se encontró que los tratamientos de vinaza tuvieron un efecto protector, al no registrar mutagenicidad, ya que en vinaza biooxidada y vinaza oxidada con Fenton el número de colonias revertantes fue similar al control negativo en la dosis de 50 %.

El tercer aspecto a tener en cuenta, es que los mutagenos presentes en las vinazas podrían inducir mutación por mecanismos diferentes a sustituciones, pérdidas o ganancia de bases.

3.5 Conclusiones

Las vinazas evaluadas en este estudio no tienen efecto mutagénico sobre la cepa TA98 y TA100; es decir, que los compuestos presentes en la muestra no generan ganancia o pérdida de bases nitorgenadas, así como sustitución de bases.

Por lo anterior, no se pudo comprobar el efecto protector del tratamiento de la vinazas por biooxidación o por oxidación química con las reacciones de Fenton.

3.6 Recomendaciones generales

La evaluación citotóxica y genotóxica en los tres tipos de vinaza, mostraron la importancia del tratamiento con biooxidación mediante microorganismos anaeróbicos y la oxidación química con las reacciones de Fenton para tratar las vinazas producto de la producción de bioetanol. Dado el auge en la producción de este combustible, la gran cantidad de materia orgánica contenida en la vinaza es una amenaza para los sistemas biológicos, como se evidenció en este estudio. Por lo tanto, se hace un llamado a las entidades regulatorias del sector agro industrial para promover la implementación del tratamiento de la vinaza cruda para disminuir su impacto en el ambiente y la salud de las personas.

Este estudio mostró que la evaluación en tres tipos de célula como son, vegetal y animal, y procarióticas . indicarian que los compuestos en vinazas tienen un efecto principalmente en el aparato mitótico

Referencias

1. Albertini S., B. Miller, A. Che´telat, F. Locher, Detailed data on in vitro MNT and in vitro CA: industrial experience, *Mutat. Res.* 392 (1997) 187–208.
2. Ames BN, Lee FD, Durston WE. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1973; 70:782-86
3. Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella-mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 1975; 31:347-64.
4. Ames BN. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science* 1979; 204:587-93
5. Ames BN. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science* 1979; 204:587-93
6. Anacleto, L.R., Roberto, M.M., Marin-Morales, M.A., 2017. Toxicological effects of the waste of the sugarcane industry, used as agricultural fertilizer, on the test system *Allium cepa*. *Chemosphere* 173, 31e42.
7. Anderson D., T. Yu, D. McGregor, Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure, *Mutagenesis* 13 (1998) 539–555.
8. Anoopkumar- S D, McMahan A, Allshire A and Conere T J, 2005. Further evidence for biological effects resulting from ionizing radiation doses in the diagnostic X-ray range. *The British Journal of Radiology* Vol. 78, No. 928 . Published Online: 13 Feb 2014 <https://doi.org/10.1259/bjr/24426084>
9. Apostolou P., M. Toloudi, E. Kourtidou, G. Mimikakou, I. Vlachou, M. Chatziioan-nou, et al., Use of the comet assay technique for quick and reliable prediction of in vitro response to

chemotherapeutics in breast and colon cancer, *J. Biol. Res.* 21 (2014) 14,
<http://dx.doi.org/10.1186/2241-5793-21-14>.

10. Araldi R., B. Rechiutti, T. Mendes, E. Ito, E. Souza, Mutagenic potential of *Cordia ecalyculata* alone and in association with *Spirulina maxima* for their evaluation as candidate anti-obesity drugs, *Genet. Mol. Res.* 13 (2014) 5207–5220, <http://dx.doi.org/10.4238/2014.July.7.14>.
11. Araldi R., B. Rechiutti, T. Mendes, E. Ito, E. Souza, Mutagenic potential of *Cordia ecalyculata* alone and in association with *Spirulina maxima* for their evaluation as candidate anti-obesity drugs, *Genet. Mol. Res.* 13 (2014) 5207–5220, <http://dx.doi.org/10.4238/2014.July.7.14>.
12. Arrebola F A , Rosario FL, Curveco DL., 2003 Sánchez Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Revista de toxicología en línea*. P 40-52
13. Ateeq B., M. Adul Farrah, M.N. Ali, W. Ahmad, Clastogenicity of pentachlorophenol, 2-4-D and butachlor evaluated by *Allium rot tip* test, *Mutat. Res.* 514 (2002) 05–113.
14. AVELLA C. G., ““Tablero de comando” para La promoción de los biocombustibles en Colombia,” ed., Naciones Unidas - CEPAL - GTZ, 2009, p. 63.
15. Aycicek A., A. Kocyigit, O. Erel, H. Senturk, Phototherapy causes DNA damage in peripheral mononuclear leukocytes in term infants, *J. Pediatr. (Rio. J.)* 84 (2008) 141–146, <http://dx.doi.org/10.2223/JPED.1765>.
16. Azevedo, F.A., Chasin, A.A.M., 2004. *As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia*. Rima, SãoPaulo, pp. 340.

17. Beltrán de Heredia Alonso, J. (2005). Tratamiento de las aguas residuales de destilerías de vino mediante un proceso combinado de lodos activos y oxidación química. *ALIMENTACION EQUIPOS Y TECNOLOGIA* 198, 55-59.
18. Bhat, S.A., Singh, J., Vig, A.P., 2016b. Genotoxicity reduction in bagasse waste of sugar industry by earthworm technology. *Springerplus* 5, 1186. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2882-1>.
19. Białas W., D. Szymanowska, W. Grajek, Fuel ethanol production from granular corn starch using *Saccharomyces cerevisiae* in a long term repeated SSF process with full stillage recycling, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 3126–3131, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.090>.
20. Bialas, A., & Kafarski, P. (2009). Proteases as anti-cancer targets-molecular and biological basis for development of inhibitor-like drugs against cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 9(7), 728-762.
21. Bishop K., S. Erdrich, N. Karunasinghe, D. Han, S. Zhu, A. Jesuthasan, et al., An investigation into the association between DNA damage and dietary fatty acid in men with prostate cancer, *Nutrients* 7 (2015) 405–422, <http://dx.doi.org/10.3390/nu7010405>.
22. Bolle P., S. Mastrangelo, P. Tucci, M.G. Evandri, Clastogenicity of atrazine assessed with the *Allium cepa* test, *Environ. Mol. Mutagen.* 43 (2004) 137–141.
23. Boller K., W. Schmid, Chemical mutagenesis in mammals – Chinese hamster cells as an in vivo test system. Hematological finding after treatment with tenimon, *Humangenetik* 11 (1970) 34–54.
24. Boorman G.A., Drinking water disinfection by-products: review and approach to toxicity evaluation, *Environ. Health Perspect.* 107 (1999) 207–217.

25. Brambilla G., A. Martelli, Update on genotoxicity and carcinogenicity testing of 472 marketed pharmaceuticals, *Mutat. Res.* 681 (2009) 209–229, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.09.002>.
26. Brusick, D., 1986. Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environ. Mol. Mutagen.* 8 (6), 879–886.
27. Bull, S., Fletcher, K., Boobis, A. R., & Battershill, J. M. (2006). Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. *Mutagenesis*, 21(2), 93-103.
28. Burlinson B., R. Tice, G. Speit, E. Agurell, S. Brendler-Schwaab, A. Collins, et al., Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup, *Mutat. Res.* 627 (2007) 31–35, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.08.011>.
29. Carita R. ´, M.A. Marin-Morales, Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes, *Chemosphere* 72 (2008) 722–725.
30. CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. 2009. Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo. Available from: (<http://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/wp-content/uploads/sites/32/2013/11/variaveis.pdf>). (Accessed on 27 September 2005).
31. Chandra S., L.K.S. Chauhan, R.C. Murthy, P.N. Saxena, P.N. Pande, S.K. Gupta, Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test, *Sci. Total Environ.* 347 (2005) 46–52.

32. Chandra, R., Kumar, V., 2017a. Detection of *Bacillus* and *Stenotrophomonas* species growing in an organic acid and endocrine-disrupting chemical-rich environment of distillery spent wash and its phytotoxicity. *Environ. Monit. Assess.* 189, 26.
33. Chauhan L.K.S., P.N. Saxena, V. Sundararaman, S.K. Gupta, Diuron-induced cytological and ultrastructural alterations in the root meristem cells of *Allium cepa*, *Pest. Biochem. Physiol.* 62 (1998) 152–163.
34. Chauhan L.K.S., S.K. Gupta, Combined cytogenetic and ultrastructural effects of substituted urea herbicides and synthetic pyrethroid insecticide on the root meristem cells of *Allium cepa*, *Pest. Biochem. Physiol.* 82 (2005) 27–35.
35. Chowdhary P., A. Raj, R.N. Bharagava, Environmental pollution and health hazards from distillery wastewater and treatment approaches to combat the environmental threats: a review, *Chemosphere* 194 (2018) 229–246,
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.163>.
36. Chowdhary L. Pankaj a,b, Anjali Singh b, Ram Chandra a, P. Senthil Kumar c,d, Abhay Raj b, Ram Naresh Bharagava (2022). Detection and identification of hazardous organic pollutants from distillery wastewater by GC-MS analysis and its phytotoxicity and genotoxicity evaluation by using *Allium cepa* and *Cicer arietinum*. *Chemosphere* 297 134123
37. Christofolletti C.A., J.P. Escher, J.E. Correia, J.F.U. Marinho, C.S. Fontanetti, Sugarcane vinasse: environmental implications of its use, *Waste Manag.* 33 (2013) 2752–2761,
<http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2013.09.005>.
38. Christofolletti, C.A., Pedro-Escher, J., Correia, J.E., Marinho, J.F.U., Fontanetti, C.S., 2013. Sugar cane vinasse: environmental implications of its use. *Waste Manag.* 33, 2752e2761

39. Christofolletti, C.A., Francisco, A., Fontanetti, C.S., 2012. Biosolid soil application: toxicity tests under laboratory conditions. *Appl. Environ. Soil Sci.* 2012, 1e9.
40. Christofolletti, C.A., Pedro-Escher, J., Fontanetti, C.S., 2013b. Assessment of the genotoxicity of two agricultural residues after processing by diplopods using the *Allium cepa* Assay. *Water Air Soil Poll.* 224, 1523.
41. Collins A., G. Koppen, V. Valdiglesias, M. Dusinska, M. Kruszewski, P. Møller, et al., The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project, *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 759 (2014) 27–39, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2013.10.001>.
42. Collins A., The comet assay: a heavenly method! *Mutagenesis* 30 (2015) 1–4.
43. Collins, A. R., Osoz, A. A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Štětina, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23(3), 143-151. doi: 10.1093/mutage/gem051.
44. Correia J E. a, Cintya Ap. Christofolletti b, Yadira Ansoar-Rodríguez a, Thays A. Guedes a, Carmem S. Fontanetti a, Comet assay and micronucleus tests on *Oreochromis niloticus* (Perciforme: Cichlidae) exposed to raw sugarcane vinasse and to phisicochemical treated vinasse by pH adjustment with lime (CaO). *Chemosphere* 173 (2017) 494-501.
45. Cooper CE, 1999. Nitric oxide and iron proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1411: 290-309
46. CORPOICA. <https://agronet.gov.co/Noticias/Paginas/Noticia187.aspx>
47. Corrêa NM, Victor de Souza V, Souza TS., 2016. Genotoxic and mutagenic effects of sewage sludge on higher plants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 124, 489-496, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.11.031>.

48. Correia, J.E., Christofolletti, C.A., Marcato, A.C.C., Marinho, J.F.U., Fontanetti, C.S., 2017. Histopathological analysis of tilapia gills (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) exposed to sugarcane vinasse. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 135, 319e326.
49. Cortés-Gutiérrez E., F. Hernández-Garza, J. García-Pérez, M. Da'vila-Rodríguez, M. Aguado-Barrera, R. Cerda-Flores, Evaluation of DNA single and double strand breaks in women with cervical neoplasia based on alkaline and neutral comet assay techniques, *J. Biomed. Biotechnol.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1155/2012/385245>.
50. Cotelle S., J. Féraud, Comet assay in genetic ecotoxicology: a review, *Environ. Mol. Mutagen.* 34 (1999) 246–255.
51. Countryman P., J. Heddle, The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes, *Mutat. Res.* 41 (1976) 321–331.
52. Crisóstomo L.HGutiérrez (2017). "Comparación de dos técnicas para la cuantificación de la viabilidad en células mononucleares de sangre periférica evaluadas en el Hospital IV Augusto Hernández Mendoza del distrito de Ica". Tesis de maestría, Universidad Alas Peruanas.
53. Darlington, C. D. 1942. Chromosome chemistry and gene action. *Nature* 149: 66-69.
54. Del Bo C., D. Fracassetti, C. Lanti, M. Porrini, P. Riso, Comparison of DNA damage by the comet assay in fresh versus cryopreserved peripheral blood mononuclear cells obtained following dietary intervention, *Mutagenesis* 30 (2015) 29–35, <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/geu058>.
55. Dhawan, A., Bajpayee, M., & Parmar, D. (2009). Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology*, 25(1), 5-32. doi: 10.1007/s10565-008-9072-z.

56. Dodani K., N. Anumala, H. Avula, K. Reddy, S. Varre, B. Kalakonda, et al., Periodontal findings in patients with oral submucous fibrosis and comet assay of affected gingival epithelial cells, *J. Periodontol.* 83 (2012) 1038–1047, <http://dx.doi.org/10.1902/jop.2011.110352>.
57. Dorothea K, Stephen D, Nikki E, Carol R. (1998). An automated method for discriminating aneugen-vs. Clastogen-induced micronuclei. *Environ Mol Mutagen.*31:340-344.
58. Duthie S., A. Hawdon, DNA instability (strand breakage, uracil misincorporation, and defective repair) is increased by folic acid depletion in human lymphocytes in vitro, *FASEB J.* 12 (1998) 1491–1497.
59. Escobar, M.L.; Aristizábal, G.F.A. Aplicación de un método fluorométrico para evaluar la proliferación celular en líneas celulares tumorales. *Vitae* 2010, 17, 173–180.
60. Fabiani R., P. Rosignoli, A. Bartolomeo, R. Fucelli, G. Morozzi, Genotoxicity of alkene epoxides in human peripheral blood mononuclear cells and HL60 leu-kaemia cells evaluated with the comet assay, *Mutat. Res.* 747 (2012) 1–6, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2012.01.004>.
61. Faggiano AA, De Carluccio MB, Cerrato FC, Garcia CAugusto Jr , Proto AA, Fiorentino AA ,* Rizzo LB. Improving organic matter and nutrients removal and minimizing sludge production in landfill leachate pre-treatment by Fenton process through a comprehensive response surface methodology approach. *Journal of Environmental Management* 340 (2023) 117950
62. Fatima R.A., M. Ahmad, Genotoxicity of industrial wastewaters obtained from twodifferent pollution sources in northern India: a comparison of three bioassays, *Mutat. Res.* 609 (2006) 81–91.

63. Fenech M., A. Morley, Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutat. Res.* 147 (1985) 29–36.
64. Feng, D.; Y Shen,.; E. R Chavez,., 2003. Effectiveness of different processing methods in reducing hydrogen cyanide content of flaxseed. *J. Sci. Food Agric.*, 83 (8): 836–841
65. Feretti D., I. Zerbini, E. Ceretti, M. Villarini, C. Zani, M. Moretti, C. Fatigoni, G. Orizio, F. Donato, S. Monarca, Evaluation of chlorite and chlorate genotoxicity using plant bioassays and in vitro DNA damage tests, *Water Res.* 42 (2008) 4075–4082.
66. Fernandes T.C.C., D.E.C. Mazzeo, M.A. Marin-Morales, Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide, *Pest. Biochem. Physiol.* 88 (2007) 252–259.
67. Fernandes T.C.C., D.E.C. Mazzeo, M.A. Marin-Morales, Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide, *Pest. Biochem. Physiol.* 88 (2007) 252–259.
68. Fiskesjo G. ", C. Lassen, Benzo[a]pireno and nitrosoguanidine in the *Allium* test, *Mutat. Res.* 97 (1982) 188.
69. Fiskesjo G. ", *Allium* test on copper in drinking water, *Vatten* 37 (1981) 232–240.
70. Fiskesjo G., The *Allium* test as a standard in environmental monitoring, *Hereditas* 102 (1985) 99–112.
71. Frotschl R., Experiences with the in vivo and in vitro comet assay in regulatory testing, *Mutagenesis* 30 (2015) 51–57, <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/geu069>.
72. Fuic a, Mijic A. (1999). In vitro and in vivo micronucleus tests in genotoxicity research. *Arh Hig Rada Toksikol.* 50: 299-306.

73. Gamboa- España E., Mijangos-Cortes, J., Barahona-Perez, L., Dominguez- Maldonado, J., Hernandez-Zarate, G., Alzategaviria, L., 2011. Vinasses: characterization and treatments. *Waste Manag. Res.* 29, 1235e1250.
74. Garcia, C.F.H., Souza, R.B. d., de Souza, C.P., Christofolletti, C.A., Fontanetti, C.S., 2017. Toxicity of two effluents from agricultural activity: comparing the genotoxicity of sugar cane and orange vinasse. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 142, 216–221. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.053>
75. Gedik, C., & S. Ewen, A. C. (1992). gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells, *Int. J. Radiat. Biol.* 62 . 313–320.
76. Glösl S, Wagner KH, Draxler A, Kaniak M, Lichtenecker S, Sonnleitner A, Somoza V, Erbersdobler H, Elmadfa I. Genotoxicity and mutagenicity of melanoidins isolated from a roasted glucose-glycine model in human lymphocyte cultures, intestinal Caco-2 cells and in the Salmonella typhimurium strains TA98 and TA102 applying the AMES test. *Food Chem Toxicol.* 2004 Sep;42(9):1487-95. doi: 10.1016/j.fct.2004.04.011. PMID: 15234079.
77. Grover I.S., S. Kaur, Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the Allium root anaphase aberration and micronucleus assays, *Mutat. Res.* 426 (1999) 183–188.
78. Hartmann A., E. Agurell, C. Beevers, A. Smith, G. Speit, V. Thybaud, et al., Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay, *Mutagenesis* 18 (2003) 45–51.
79. Hatanaka Y, Kitagawa Y, Toyoda Y, Kawata T, Ando N, Kawabata Y, Iwai M, Arimura H. (1992). Micronucleus test with cyclophosphamide using mouse peripheral blood reticulocytes. *Mutat Res.* 278:99-101.

80. Hatch EM: Nuclear envelope rupture: little holes, big openings. *Curr Opin Cell Biol* 2018, 52:66–72.
81. Heddle J., A rapid in vivo test for chromosomal damage, *Mutat. Res.* 18 (1973) 187–190.
82. Heddle J, Cimino M, Hayashi M, Romagna F, Shelby M, Tucker J, McGregor J. (1991). Micronuclei as an index of cytogenetic damage : past, present and future. *Environ Mol Mutag.* 18:277-291.
83. Hobbs C., C. Swartz, R. Maronpot, J. Davis, L. Recio, S. Hayashi, Evaluation of the genotoxicity of the food additive, gum ghatti, *Food Chem. Toxicol.* 50 (2012) 854–860, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.11.021>.
84. Hoshina M.M., Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro - município de Rio Claro, pertencente à bacia do rio Corumbataí, por meio de testes de mutagenicidade em *Allium cepa*, Trabalho de conclusão (Bacharel e Licenciatura - Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2002, 52 p.
85. Idris S, Ambali S, Ayo J. Cytotoxicity of chlorpyrifos and cypermethrin: the ameliorative effects of antioxidants. *Afr J Biotechnol.* 2012; 11 (99): 16461-16467.
86. Inceer H., O. Beyazoglu, H.A. Ergul, Cytogenetic effects of wastes of copper mine on root tip cells of *Allium cepa* L., *Pak. J. Biol. Sci.* 3 (2000) 376–377.
87. Jiang, Y., Xie, S.H., Dennehy, C., Lawlor, P.G., Hu, Z.H., Wu, G.X., Zhan, X.M., Gardiner, E., 2020. Inactivation of pathogens in anaerobic digestion systems for converting biowastes to bioenergy: a review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 120, 109654 <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109654>.
88. Jorge E. Correia, Cintya Ap. Christofolletti, Yadira Ansoar-Rodríguez, Thays A. Guedes, Carmem S. Fontanetti. 2017,

89. Kado N-Y., D Langley. y E Eisenstadt. (1983). A simple liquid incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutat. Res.* 121, 25-32.
90. Kihlman B & Odmark, G. 1965. Effects of chromosome breaking purine derivatives on nucleic acid synthesis and on the levels of adenosine S'triphosphate and deoxyadenosine 5-triphosphate in bean root tips. *Mutation Res.* 2: 274-286.
91. Kim Ji-S, Young-Soon Lee. 2008. Effect of reaction pH on enolization and racemization reactions of glucose and fructose on heating with amino acid enantiomers and formation of melanoidins as result of the Maillard reaction, *Food Chemistry*, Volume 108, Issue 2, Pages 582-592, ISSN 0308-8146. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.014>.
92. Klaude M., S. Eriksson, J. Nygren, G. Ahnström, The comet assay: mechanisms and technical considerations, *Mutat. Res.* 363 (1996) 89–96.
93. Kruszewski M., T. Iwanenko, E. Machaj, T. Ołdak, M. Wojewódzka, L. Kapka-Skrzypczak, et al., Direct use of the comet assay to study cell cycle distribution and its application to study cell cycle-dependent DNA damage formation, *Mutagenesis* 27 (2012) 551–558, <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/ges018>.
94. Kumar, V., Sharma, D.C., 2019. Distillery Effluent: pollution profile, eco-friendly treatment strategies: challenges and future prospects. In: Arora, PK (Ed.), *Microbial Metabolism of Xenobiotic Compounds*. Springer Nature, pp. 337–357.
95. Kumar Vineet a,b, Fuad Ameen c, M. Amirul Islam d, Sakshi Agrawal a, Ankit Motghare b, Abhijit Dey e, Maulin P. Shah f, Juliana Heloisa Pinê Américo-Pinheiro g,h, Simranjeet Singh i, Praveen C. Ramamurthy i., 2022. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity effects of refractory pollutants of untreated and biomethanated distillery effluent using *Allium cepa*, *Environmental Pollution*, 300 (2022) 118975

96. Kumar, N., Sinha, S., Mehrotra, T., Singh, R., Tandon, S., 2019. Biodecolorization of azo dye acid black 24 by *Bacillus pseudomycooides*: process optimization using box behnken design model and toxicity assessment. *Bioresour. Technol. Rep.* 8, 100311.
97. Kumar, S., Gopal, K., 2001. Impact of distillery effluent on physiological consequences in the freshwater teleost *Channa punctatus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 66, 617e622.
98. Kumar, V., Ferreira, L.F.R., Sonkar, M., Singh, J., 2021. Phytoextraction of heavy metals and ultrastructural changes of *Ricinus communis* L. grown on complex organometallic sludge discharged from alcohol distillery. *Environ. Technol. Innov.* 22, 101382.
99. Pellman Liu S, D: The coordination of nuclear envelope assembly and chromosome segregation in metazoans. *Nucleus* 2020, 11:35–52.
100. Kwak E J, Young Soon Lee, Masatsune Murata, Seiichi Homma 2005. Effect of pH control on the intermediates and melanoidins of nonenzymatic browning reaction, *LWT - Food Science and Technology*, Volume 38, Issue 1, , Pages 1-6, ISSN 0023-6438.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2003.09.011>.
101. L.R. Ramos, G. Lovato, J.A.D. Rodrigues, E.L. Silva, Anaerobic digestion of vinasse in fluidized bed reactors: Process robustness between two-stage thermophilic-thermophilic and thermophilic-mesophilic systems, *J. Clean. Prod.* 314 (2021), 128066,
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128066>.
102. Laime, E.M.O., Fernandes, D.C.S., Freire, E.A., 2011. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. *Rev. Trópica-Ciências Agrar. e Biol.* 5, 16–29.
103. Leme D.M., D.F. Angelis, M.A. Marin-Morales, Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells, *Aquat. Toxicol.* 88 (2008) 214–219.

104. Leme D.M., M.A. Marin-Morales, Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—a case study, *Mutat. Res.* 650 (2008) 80–86.
105. Lent E., L. Crouse, M. Quinn, S. Wallace, Assessment of the *in vivo* genotoxicity of isomers of dinitrotoluene using the alkaline Comet and peripheral blood micro-nucleus assays, *Mutat. Res.* 742 (2012) 54–60, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.11.013>.
106. M. Kirsch-Volders, T. Sofuni, M. Aardema, S. Albertini, D. Eastmond, M. Fenech, et al., Report from the *in vitro* micronucleus assay working group, *Mutat. Res.* 540 (2003) 153–163.
107. Mahimairaja S., N.S. Bolan, The Regional Institute – Problems and Prospects of Agricultural Use of Distillery Spentwash in India, (2008) http://regional.org.au/au/assi/supersoil2004/s7/poster/1891_mahimairajas.htm . (Accessed 28 August 2013).
108. Maistro, E. L., Carvalho, J. C. T., & Mantovani, M. S. (2004). Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and V79 cells by the comet assay. *Toxicology in Vitro*, 18(3), 337–342. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2003.10.002>
109. Maron, D.M., Ames, B.N., 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* 113, 173–215. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9)
110. Martins Corra M.N. a, Victor Souza VB, Souza T, 2016. Cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of sewage sludge on *Allium cepa*. *Chemosphere* 148 (2016) 481e486
111. Matsumoto S.T., M.S. Mantovani, M.I.A. Malaguttii, A.L. Dias, I.C. Fonseca, M.A. Marin-Morales, Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips, *Genet. Mol. Biol.* 29 (2006) 148–158.

112. McCann J., E. Choi, E. Yamasaki, B.N. Ames, Detection of carcinogens in the Salmonella/microsome test. Assay of 300 chemicals, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72 (1975) 5135–5139.
113. McKenna D., S. McKeown, V. McKelvey-Martin, Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer, Mutagenesis 23 (2008) 183–190, <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/gem054>.
114. McKenna, D. J., Doherty, B. A., Downes, C. S., McKeown, S. R., & McKelvey-Martin, V. J. (2012). Use of the Comet-FISH Assay to Compare DNA Damage and Repair in p53 and hTERT Genes following Ionizing Radiation. PLoS ONE, 7(11), e49364. doi: 10.1371/journal.pone.0049364
115. Melnick R.L., J.K. Dunnick, D.P. Sandler, M.R. Elwell, J.C. Barret, Trihalomethanes and other environmental factors that contribute to colorectal cancer, Environ. Health Perspect. 102 (1994) 586–588.
116. Mercykutty, V.C., Stephen, J., 1980. Adriamycin induced genetic toxicity as demonstrated by the Allium test. Cytologia 45 (4), 769–777.
117. Migid A.H.M., Y.A. Azab, W.M. Ibrahim, Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent, Ecotoxicol. Environ. Saf. 66 (2007) 57–64.
118. Migid A.H.M., Y.A. Azab, W.M. Ibrahim, Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent, Ecotoxicol. Environ. Saf. 66 (2007) 57–64.
119. Miller B., S. Albertini, F. Locher, V. Thybaud, E. Lorge, Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the in vitro chromosome aberration test: industrial experience, Mutat. Res. 392 (1997) 45–59.

120. Mohamed S.A., S. Upreti, S.V. Rajendra, R. Dang, Genotoxicity: mechanisms, testing guidelines and methods, *Glob. J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 1 (2017)
121. Monarca S., M. Rizzoni, B. Gustavino, C. Zani, A. Alberti, D. Feretti, I. Zerbini, Genotoxicity of surface water treated with different disinfectants using in situ plant tests, *Environ. Mol. Mutagen.* 41 (2003) 353–359.
122. Moraes B.S., M. Zaiat, A. Bonomi, Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: challenges and perspectives, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 44 (2015) 888.
123. Mosley D, Su T, Murff HJ, Smalley WE, Ness RM, Zheng W, Shrubsole MJ. Meat intake, meat cooking methods, and meat-derived mutagen exposure and risk of sessile serrated lesions. *Am J Clin Nutr.* 2020 Jun 1;111(6):1244-1251. doi: 10.1093/ajcn/nqaa030. PMID: 32077920; PMCID: PMC7266682.
124. Muchut, S., Simoniello, M. F., Scagnetti, J., Poletta, G. L., & Kleinsorge, E. C. (2011). Evaluación de genotoxicidad en linfocitos humanos expuestos a mezclas de biocidas mediante electroforesis en gel de células individuales (Ensayo cometa) (Vol. 15). FABICIB. Obtenido de <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar/ojs/index.php/FABICIB/articulo/view/885/1313>
125. Murphy Michael, 1999, Nitric oxide and cell death. *Biochimica et Biophysica Acta* 1411 (1999) 401-414.
126. Neri M., D. Milazzo, D. Ugolini, M. Milic, A. Campolongo, P. Pasqualetti, et al., Worldwide interest in the comet assay: a bibliometric study, *Mutagenesis* 30 (2015) 155–163, <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/geu061>.
127. Nohmi, Thresholds of genotoxic and non-genotoxic carcinogens, *Toxicol. Res.* 34 (2018) 281–290.

- 128.NTC3629, 2002. Norma técnica colombiana. Calidad del agua. demanda química de oxígeno (DQO).. Editada por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC)
- 129.NTC5167, 2011. Norma técnica colombiana. Productos para la industria agrícola. Productos orgánicos usados como abonos o fertilizantes y enmiendas o acondicionadores de suelo. Editada por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC)
- 130.NTC5595, 2008. Calidad de suelo. Determinación del nitrógeno amoniacal y nitrógeno nítrico. Editada por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC).
- 131.NTC5403, 2013. Calidad de suelo. Determinación del carbono orgánico. Editada por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC).
- 132.NTC897, 2015. Calidad del agua. Determinación del contenido de sólidos. Editada por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC).Norppa H., G. Falck, What do human micronuclei contain? *Mutagenesis* 18 (2003) 221–233.
- 133.Novelo, R.I.M., Reyes, R.B.G., Borges, E.R.C., and Riancho, M.R.S. (2010). Tratamiento de lixiviados por oxidación Fenton. *Ingeniería e Investigación* 30, 80-85.
- 134.OCAMPO A., “Alcohol Carburante: actualidad tecnológica,” *Revista EIA*, n.º 1, pp. 7, 2004. [5] FEDEBIOCOMBUSTIBLES. “Desarrollo estratégico y sostenible para Colombia,” abril de 2012, 2012; <http://www.fedebiocombustibles.com/v2/nota-web-id-990.htm>.
- 135.OECD, In vitro mammalian cell micronucleus test, 2010, <http://dx.doi.org/10.1787/9789264091016-en>.
- 136.Ohgaki H, Takayama S, Sugimura T, 1991. Carcinogenicities of heterocyclic amines in cooked food, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Volume 259, Issues 3–4, Pages 399-410, ISSN 0165-1218, [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(91\)90130-E](https://doi.org/10.1016/0165-1218(91)90130-E).

137. Oñate, J., Arenas, A., Ruiz, A. et al. Evaluation of Mutagenic and Genotoxic Activity in Vinasses Subjected to Different Treatments. *Water Air Soil Pollut* 226, 144 (2015).
<https://doi.org/10.1007/s11270-014-2250-0>
138. Ostling O., & Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1), 291-298. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X\(84\)90411-X](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(84)90411-X)
139. Oudalova A. A.; S. A. Geras'kin; N. S. Dikareva and S. V. Pyatkova, 2017. Allium -test as a tool for toxicity testing of environmental radioactive-chemical mixtures, *Journal of Physics Conference Series* 784(1):012057. DOI:10.1088/1742-6596/784/1/012057
140. Parnaudeau, V., Condom, N., Oliver, R., Cazevieuille, P., & Recous, S. (2008). Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes. *Bioresource Technology*, 99, 1553–1562.
141. Patton W.P., U. Chakravarthy, R.J. Davies, D.B. Archer, Comet assay of UV-induced DNA damage in retinal pigment epithelial cells, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40 (1999) 3268–3275.
142. Pedro-Escher, J., Christofolletti, C.A., Ansoar-Rodríguez, Y., Fontanetti, C.S., 2016. Sugarcane vinasse, a residue of ethanol industry: toxic, cytotoxic and genotoxic potential using the Allium cepa test. *J. Environ. Prot.* 7, 602–612.
143. Pellegrini V., G. Gorbi, A. Buschini, Comet assay on *Daphnia magna* in eco-genotoxicity testing, *Aquat. Toxicol.* 155 (2014) 261–268, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.07.002>.
144. Perry, P., & Evans, H. J. (1975). Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. [10.1038/258121a0]. *Nature*, 258(5531), 121-125.

145. Perry, P., & Evans, H. J. (1975). Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. [10.1038/258121a0]. *Nature*, 258(5531), 121-125.
146. Radić, S., Stipaničev, D., Vujčić, V., Rajčić, M.M., Širac, S., Pevalek-Kozlina, B., 2010. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. *Sci. Total Environ.* 408 (5), 1228–1233.
147. Rank J., M.H. Nielsen, Evaluation of the *Allium* anaphase–telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater, *Mutat. Res.* 312 (1994) 17–24.
148. Rank J., The method of *Allium* anaphase-telophase chromosome aberration assay, *Ekologija* (2003) 38–42.
149. Ren N., M. Atyah, W.Y. Chen, C.H. Zhou, The various aspects of genetic and epigenetic toxicology: testing methods and clinical applications, *J. Transl. Med.* 15 (2017) 110.
150. Rencuzogullari E., M. Aydin, Genotoxic and mutagenic studies of teratogens in developing rat and mouse, *Drug Chem. Toxicol.* 42 (2019) 409–429. [7] T.
151. Repetto, M. *Toxicología Fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad in vitro*. Sevilla, España: Ediciones Díaz de Santos, Enpses-Mercie Group .Tercera edición; 2002. p.303-305.
152. Reus, A. A., Usta, M., & Krul, C. A. M. (2012). The use of ex vivo human skin tissue for genotoxicity testing. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 261(2), 154-163. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2012.03.019>
153. Santal, A.R., Singh, N.P., Saharan, B.S., 2016. A novel application of *Paracoccus pantotrophus* for the decolorization of melanoidins from distillery effluent under static conditions. *J. Environ. Manag.* 169, 78–83.
154. Sanz-Serrano J., Garayoa R, Vitas A. I., Azqueta A, de Cerain A. L. 2021. In vitro mutagenicity assessment of fried meat-based food from mass catering companies, *Food and*

Chemical Toxicology, Volume 156, 12494, ISSN 0278-6915,

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112494>

155. Sarasin, A. (2003). An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 544(2–3):99–106.
156. Sasaki, Y. F., Sekihashi, K., Izumiyama, F., Nishidate, E., Saga, A., Ishida, K., & Tsuda, S. (2000). The Comet Assay with Multiple Mouse Organs: Comparison of Comet Assay Results and Carcinogenicity with 208 Chemicals Selected from the IARC Monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database**. *Critical Reviews in Toxicology*, 30(6), 629-799. doi:10.1080/10408440008951123
157. Savage J.R., Classification and relationships of induced chromosomal structural changes, *J. Med. Genet.* 13 (1976) 103–122.
158. Schmid W. (1975). The micronucleus test. *Mutat Res.* 31:9-15.
159. Seth C.S., V. Misra, L.K.S. Chauhan, R.R. Singh, Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* (2008) 1, doi:10.1016/j.jecoenv.2008.02.003.
160. Shrivastava, R., Upreti, R. K., Seth, P. K., & Chaturvedi, U. C. (2002). Effects of chromium on the immune system. *FEMS immunology and medical microbiology*, 34(1), 1-7.
161. Shuduan M, Zhang G, Li J, Geng X., Wang J, Zhao S., Cheng Z., Xu Y, Li Q, Wang Y., 2020. Occurrence and sources of PCBs, PCNs, and HCB in the atmosphere at a regional background site in east China: Implications for combustion sources, *Environmental Pollution*, Volume 262, 2020, 114267, ISSN 0269-7491, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114267>.

162. Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184-191. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
163. Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184-191. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
164. Sloczynska K., B. Powroznik, E. Pekala, A.M. Waszkielewicz, Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action, *J. Appl. Genet.* 55 (2014) 273–285.
165. Smaka-Kincl V., P. Stegnar, M. Lovka, M.J. Toman, The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure, *Mutat. Res.* 368 (1996) 171–179.
166. Snyder R., J. Green, A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals, *Mutat. Res.* 488 (2001) 151–169.
167. Soltys, D., Rudzińska-Langwald, A., Kurek, W., Gniazdowska, A., Sliwinska, E., Bogatek, R., 2011. Cyanamide mode of action during inhibition of onion (*Allium cepa* L.) root growth involves disturbances in cell division and cytoskeleton formation. *Planta* 234 (3), 609–621.
168. Souza, T.S., Hencklein, F.A., De Angelis, D.F., Fontanetti, C.S., 2013. Clastogenicity of landfarming soil treated with sugar cane vinasse. *Environ. Monit. Assess.* 185, 1627–1636.
169. Speit G., M. Vasquez, A. Hartmann, The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity, *Mutat. Res.* 681 (2009) 3–12, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.005>.
170. Srivastava K., K.K. Mishra, Cytogenetic effects of commercially formulated atrazine on the somatic cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*, *Pest. Biochem. Physiol.* 93 (2009) 8–12.
171. Srivastava, S., Jain, R., 2010. Effect of distillery spent wash on cytomorphological behaviour of sugarcane seedlings. *J. Environ. Biol.* 31, 809–812.

172. Stahlhoefer AG, Guilherme Gomes Pereira Lopes, Manoelito Ferreira Silva Junior, Rafael Gomes Ditterich, Mário Marques Fernandes, Rogério Nogueira Oliveira, Gabriela Cauduro da Rosa, Nelson Massanobu Sakaguti (2022). "Formulación y evaluación de la viabilidad celular a través de la prueba de azul de tripano en un nuevo colorante derivado del azul de tripano". *Revista Brasileira de Biociências*, 20(1), 23-30.
173. Steinkellner H., K. Mun-Sik, C. Helma, S. Ecker, T.-H. Ma, O. Horak, M. Kundi, S. Knasmüller, Genotoxicity effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays, *Environ. Mol. Mutagen.* 31 (1998) 183–191.
174. Sudhakar R., K.N. Ninge Gowda, G. Venu, Mitotic abnormalities induced by silk dyeing industry effluents in the cells of *Allium cepa*, *Cytologia* 66 (2001) 235–239.
175. Sugimura T., S. Sato, M. Nagao, T. Yahagi, T. Matsushima, Y. Seino, M. Takeuchi, T. Kawachi, Overlapping of carcinogens and mutagens, in: P.N. Magee, S. Takayama, T. Sugimura, T. Matsushima (Eds.), *Fundamental of Cancer Prevention*, University Park Press, Baltimore, 1976, pp. 191–215.
176. Sutiakova I. , N. Kovalkovicˇova´ , V. Sutiak, Micronucleus assay in bovine lymphocytes after exposure to bisphenol A in vitro, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* (2014), <http://dx.doi.org/10.1007/s11626-013-9727-9>.
177. Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., . . . Ryu J. C. y Sasaki, Y. F. (2000.). *Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing*. *Environ. Mol. Mutagen.*
178. Trisini A., N. Singh, S. Duty, R. Hauser, Relationship between human semen parameters and deoxyribonucleic acid damage assessed by the neutral comet assay, *Fertil. Steril.* 82 (2004) 1623–1632, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.05.087>.

179. UPME, "Biocombustibles en Colombia," Ministerio de Minas y Energía, ed., Unidad de Planeación Minero Energética – UPME, 2015, p. 22.
180. Valdíglesias V., B. Laffon, E. Pa´ saro, J. Me´ ndez, Evaluation of okadaic acid-induced genotoxicity in human cells using the micronucleus test and gH2AX analysis, *J. Toxicol. Environ. Health* 74 (2011) 980–992, <http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2011.582026>.
181. Wada K., T. Yoshida, N. Takahashi, K. Matsumoto, Effects of seven chemicals on DNA damage in the rat urinary bladder: a comet assay study, *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 769 (2014) 1–6, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.04.015>.
182. Wilkie A.C., K.J. Riedesel, J.M. Owens, Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks, *Biomass Bioenergy* 19 (2000) 63–102, [http://dx.doi.org/10.1016/S0961-9534\(00\)00017-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0961-9534(00)00017-9)
183. Wu H. Yi, L., L. Jiang, Genotoxicity of arsenic evaluated by *Allium*-root micronucleus assay, *Sci. Total Environ.* 308 (2007) 232–236.
184. Xu Q, Tao W, Ao Z., 2017 Antioxidant activity of vinegar melanoidins. *Food Chemistry* 102 (2007) 841–849
185. Zeiger E., J.K. Haseman, M.D. Shelby, B.H. Margolin, R.W. Tennant, Evaluation of four in vitro genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity: confirmation of earlier results with 41 additional chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.* 16 (Suppl. 18) (1990) 1–14.
186. Zeiger E., The *Salmonella* mutagenicity assay for identification of presumptive carcinogens, in: H.A. Milman, E.K. Weisburger (Eds.), *Handbook of Carcinogen Testing*, Noyes Publishers, Park Ridge, NJ, 1985, pp. 83–99.
187. Zhang Q.-H., X. Lu, L. Tang, Z.-G. Mao, J.-H. Zhang, H.-J. Zhang, F.-B. Sun, A novel full recycling process through two-stage anaerobic treatment of distillery wastewater for

bioethanol production from cassava, *J. Hazard. Mater.* 179 (2010) 635–641,

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.03.050>.

188. Zhang CZ, Spektor A, Cornils H, Francis JM, Jackson EK, Liu S, Meyerson M, Pellman D:

Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. *Nature* 2015, 522:179–184.

189. Zhang, M., Xie, L., Wang, Z., Lu, X., Zhou, Q., 2018. Using Fe(III)-coagulant-modified colloidal gas aphanes to remove bio-recalcitrant dissolved organic matter and colorants from cassava distillery wastewater. *Bioresour. Technol.* 268, 346–354.

190. Zuleta M., Salazar J, Adelaida G. 1990 Mutagenicidad de cinco herbicidas en *Salmonella typhimurium*. *Revista Latinoamericana de Genética* 321-328.