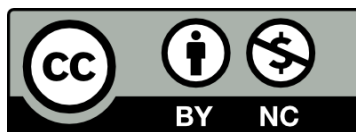


DETERMINACIÓN DE LA MUTAGENICIDAD DE SUSTANCIAS MIGRADAS DESDE  
RECIPIENTES PLÁSTICOS DE BAJO COSTO COMERCIALIZADOS EN  
VILLAVICENCIO (META) MEDIANTE TEST AMES



ALEJANDRO ALVAREZ RUIZ

JOSÉ MAURICIO NOVOA BERMÚDEZ



UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

INGENIERÍA AMBIENTAL

VILLAVICENCIO

2020

DETERMINACIÓN DE LA MUTAGENICIDAD DE SUSTANCIAS MIGRADAS DESDE  
RECIPIENTES PLÁSTICOS DE BAJO COSTO COMERCIALIZADOS EN  
VILLAVICENCIO (META) MEDIANTE TEST AMES

ALEJANDRO ALVAREZ RUIZ

JOSÉ MAURICIO NOVOA BERMÚDEZ

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Ingeniero Ambiental

Director (a)

MARÍA ALEXANDRA MÉNDEZ LEAL

Magister en Comunicación Social de la Investigación científica

Codirector (a)

CHRISTIAN JOSÉ ROJAS REINA

PhD. Msc. Ingeniero químico

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

INGENIERÍA AMBIENTAL

VILLAVICENCIO

2020

Autoridades académicas

**P. JOSÉ GABRIEL MESA ANGULO, O.P.**

Rector General

**P. EDUARDO GONZÁLEZ GIL, O.P.**

Vicerrector Académico General

**P. JOSÉ ANTONIO BALAGUERA CEPEDA, O.P.**

Rector Sede Villavicencio

**P. RODRIGO GARCÍA JARA, O.P.**

Vicerrector Académico Sede Villavicencio

**JULIETH ANDREA SIERRA TOBÓN**

Secretaria de División Sede Villavicencio

**YÉSICA NATALIA MOSQUERA BELTRÁN**

Decana Facultad de Ingeniería Ambiental

**Nota De Aceptación**

---

---

---

---

---

**YESICA NATALIA MOSQUERA BELTRÁN**

Decana de facultad

---

**MARÍA ALEXANDRA MÉNDEZ LEAL**

Directora trabajo de grado

---

**JONATHAN STEVEN MURCIA FANDIÑO**

Jurado

---

**ANGELA MARÍA ZAPATA MARÍN**

Jurado

Villavicencio, 21 de Mayo de 2020

### **Agradecimientos**

Agradecemos principalmente a Dios por habernos permitido culminar exitosamente esta etapa tan importante de nuestras vidas y por otorgarnos la sabiduría para superar los obstáculos y alcanzar nuestros objetivos.

De igual forma, agradecemos infinitamente a nuestros padres, hermanos y demás familiares por el esfuerzo, la dedicación y el apoyo incondicional en todo momento, así como por ser pilar y guía en nuestra vida, aportándonos a través de sus conocimientos y experiencias, herramientas que nos ayudan a crecer día a día como profesionales y como personas.

Así mismo, damos gracias a nuestros amigos y compañeros por el cariño brindado, dejando en nuestra memoria gratos recuerdos de los momentos vividos, así como por su acompañamiento que nos permitió sobrellevar las situaciones difíciles.

También agradecemos especialmente a nuestros directores de proyecto María Alexandra Méndez y Christian Rojas por el compromiso, dedicación y confianza depositada en nosotros, apoyándonos incondicionalmente durante cada una de las etapas del desarrollo de este proyecto.

Finalmente, agradecemos a la Facultad de Ingeniería Ambiental y, a nuestra Alma Mater, Universidad Santo Tomás, por brindarnos los conocimientos y herramientas necesarias para formarnos como futuros profesionales íntegros, capaces de responder de manera ética, creativa y crítica a las problemáticas que actualmente enfrenta la sociedad y el país.

## Contenido

RESUMEN .....	12
ABSTRACT .....	13
CAPÍTULO 1: PRELIMINARES .....	14
Introducción .....	14
Planteamiento del problema .....	15
Objetivos .....	17
Objetivo general .....	17
Objetivos específicos .....	17
Justificación .....	18
CAPÍTULO 2: ANTECEDENTES .....	20
CAPÍTULO 3: MARCO REFERENCIAL .....	23
Plástico .....	23
Bisfenol A .....	26
Mutagenicidad .....	26
Test Ames .....	28
Marco legal .....	29
CAPÍTULO 4: METODOLOGÍA .....	31
Diseño experimental .....	31
Fases metodológicas .....	33
Fase 1: Identificación de recipientes plásticos .....	34
Fase 2: Determinación del índice de mutagenicidad .....	35
Activación y mantenimiento de la cepa .....	35
Preparación de soluciones .....	36
Extracción de muestras .....	37
Aplicación del test Ames .....	39
Fase 3: Análisis estadístico .....	41
CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y ANÁLISIS .....	42
5.1. Selección de establecimientos comerciales .....	42

5.2. Identificación de recipientes plásticos .....	43
5.3. Test de mutagenicidad de Ames.....	46
5.4. Análisis estadístico.....	47
DISCUSIÓN.....	54
CONCLUSIONES.....	57
RECOMENDACIONES.....	59
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
ANEXOS.....	69

**Lista de tablas**

Tabla 1. <i>Marco legal vigente.</i> .....	29
Tabla 2. <i>Variables del diseño experimental.</i> .....	31
Tabla 3. <i>Parámetros del diseño experimental</i> .....	32
Tabla 4. <i>Tipos de recipientes.</i> .....	33
Tabla 5. <i>Resultados del índice de mutagenicidad por tipo de recipiente para 5 calentamientos.</i> .....	46
Tabla 6. <i>Resultados del índice de mutagenicidad por tipo de recipiente para 20 calentamientos.</i> .....	47
Tabla 7. <i>Prueba t de Student del índice de mutagenicidad por número de calentamientos.</i> .....	48
Tabla 8. <i>ANOVA del índice de mutagenicidad para 5 calentamientos.</i> .....	49
Tabla 9. <i>ANOVA del índice de mutagenicidad para 20 calentamientos.</i> .....	49
Tabla 10. <i>Prueba HSD de Tukey del índice de mutagenicidad para 5 calentamientos.</i> .....	50
Tabla 11. <i>Prueba HSD de Tukey del índice de mutagenicidad para 20 calentamientos.</i> .....	50
Tabla 12. <i>Prueba t de Student del índice de mutagenicidad por variable para 5 calentamientos.</i> .....	52
Tabla 13. <i>Prueba t de Student del índice de mutagenicidad por variable para 20 calentamientos.</i> .....	52

**Lista de figuras**

<i>Figura 1.</i> Código internacional de identificación de resinas .....	24
<i>Figura 2.</i> Matriz de distribución de los tratamientos en cada bloque según el diseño experimental .....	32
<i>Figura 3.</i> Diagrama de proceso de la metodología del proyecto .....	34
<i>Figura 4.</i> Áreas clasificadas como "zonas comerciales" según el plan de ordenamiento territorial de Villavicencio.....	35
<i>Figura 5.</i> Ejemplo 1 morfología colonias <i>S. typhimurium</i> .....	40
<i>Figura 6.</i> Ejemplo 2 morfología colonias <i>S. typhimurium</i> .....	40
<i>Figura 7.</i> Establecimientos que comercializan recipientes plásticos dentro de las áreas clasificadas como "zonas comerciales" según el plan de ordenamiento territorial de Villavicencio .....	42
<i>Figura 8.</i> Distribución porcentual de los recipientes plásticos comercializados en Villavicencio según el tipo de recipiente.....	44
<i>Figura 9.</i> Distribución porcentual de los recipientes plásticos comercializados en Villavicencio según las variables de estudio.....	45
<i>Figura 10.</i> Distribución de recipientes plásticos comercializados en Villavicencio por rango de precio..	46

**Lista de Anexos**

*Anexo A.* Formato de recolección de información de recipientes plásticos ..... 69

## Glosario

**MUTÁGENO:** Sustancias que producen mutaciones en el material genético y, por consiguiente, alteran el control de la actividad celular, desde la producción de energía hasta su reproducción, lo que conduce a un funcionamiento inadecuado de la célula (Zuluaga, Valencia, & Ortíz, 2009).

**MIGRACIÓN:** Describe un proceso de difusión y transferencia de componentes que puede estar fuertemente influenciado por una interacción entre el alimento con el material de empaque durante su almacenamiento o preparación (Arvanitoyannis & Bosnea, 2004; Hotchkiss, 1988).

**MUTACIÓN:** Es la alteración en la información genética que ocurre como resultado de pequeños cambios (pérdida, adición o reemplazo de bases) alterándose así la secuencia del ADN y afectando la fidelidad del mensaje genético (Trossero, Caffarena, Hure, & Rizzotto, 2006).

**PLÁSTICOS:** Son materiales orgánicos constituidos por macromoléculas y producidos por transformación de sustancias naturales o por síntesis directa, a partir de productos extraídos del petróleo, del gas natural, del carbón o de otras materias minerales (Baldomero, Santos, Escudero, & Escudero, 2005).

**TEST AMES:** Ensayo de mutación bacteriano que emplea *Salmonella typhimurium* como bacteria indicadora para la detección de mutágenos, siendo quizás la más difundida de las pruebas para detectar, en forma simple, rápida y económica, la capacidad mutagénica de diversas sustancias (Trossero et al., 2006).

## Resumen

---

La presencia de sustancias mutagénicas en los materiales plásticos usados en la vida cotidiana, particularmente en aquellos destinados al contacto con alimentos y bebidas, puede llegar a representar una problemática para salud pública y el medio ambiente, debido a los efectos adversos en la salud humana relacionados principalmente con daños al ADN, problemas cardiovasculares, afectaciones en la fertilidad, alteraciones neurológicas, entre otras enfermedades, así como la degradación del suelo, fuentes hídricas subterráneas y la alteración de receptores ambientales como microorganismos, plantas y animales.

Desde esta problemática, la presente investigación evaluó el índice de mutagenicidad de agua en contacto con recipientes plásticos de bajo costo, empleados para el transporte, almacenamiento y calentamiento comercializados en la ciudad de Villavicencio Meta, en función del uso y tipo de recipiente. Se utilizó el test Ames como método de identificación del índice de mutagenicidad de las muestras obtenidas. Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó la prueba t de Student y el análisis de varianza ANOVA con prueba HSD de Tukey.

El test Ames se efectuó con *Salmonella typhimurium*, siguiendo el protocolo descrito por Ames et al. (1975). El test incluyó controles positivos y negativos y fue llevado a cabo sin activación metabólica. Todas las pruebas fueron aplicadas en triplicado. Las tasas de reversión espontánea obtenidas se mantuvieron dentro de los valores normales. Se obtuvieron índices de mutagenicidad que oscilaron entre 0,74 y 1,52, valores considerados como "No mutagénicos" o "Ligeramente mutagénicos" según la escala de análisis. Se pudo inferir que el índice de mutagenicidad puede llegar estar relacionado con el desgaste del material al que se exponen estos recipientes, debido a la relación entre el número de calentamientos aplicado y el índice de mutagenicidad obtenido. De igual forma, se comprobó estadísticamente la influencia de las características físicas del recipiente en el aumento en el índice de mutagenicidad, considerando como más adecuados los recipientes fabricados con polipropileno, transparentes y que en su etiqueta se enuncien como libres de BPA.

**Palabras clave:** Test Ames, mutagenicidad, recipientes plásticos, migración.

### Abstract

---

The presence of mutagenic substances in the plastic materials used in everyday life, specifically in those intended for contact with food and beverages, may become a problem for public health and the environment, due to adverse effects on the human health mainly related to DNA damage, cardiovascular problems, fertility disorders, neurological disorders, among other diseases, as well as soil degradation, underground water sources and the alteration of environmental receptors such as microorganisms, plants and animals.

Due to this problem, the present investigation evaluated the mutagenicity index of water in contact with low-cost plastic containers, used for transport, storage and heating, commercialized in the city of Villavicencio (Meta), in contrast with use and type of container. The Ames test was used as a method of identifying the mutagenicity index of the obtained samples. For the statistical treatment of the data, the Student's t-test and the analysis of variance ANOVA with the Tukey's HSD test were used.

The Ames test was carried out with *Salmonella typhimurium*, following the protocol described by Ames et al. (1975) The test included positive and negative controls and was carried out without metabolic activation. All tests were applied in triplicate. The spontaneous reversion rates remained within normal values. Mutagenicity index ranged between 0.74 and 1.52, obtaining values labeled as "Non-mutagenic" or "Slightly mutagenic" according to the analysis scale. It can be inferred that mutagenicity index can be related to the normal wear to which these recipients are exposed, based on the relationship between the number of heating applied and the mutagenicity index obtained. Likewise, the influence of the physical characteristics of the container on the increase in the mutagenicity index was statistically verified, considering that containers made with polypropylene, transparent and labeled as BPA-free, are the most appropriate.

**Key word:** Ames test, mutagenicity, plastic containers, migration.

## Capítulo 1: Preliminares

---

### Introducción

El plástico es un material sintético de elevada masa molecular, producido a través de la polimerización de moléculas de monómeros derivados del carbón, petróleo o gas natural (Okunola, Adewale, & Yetunde, 2019, p. 1; Selukar, Lande, & Ingole, 2014, p. 98). Debido a la adaptabilidad y versatilidad del plástico, su producción mundial ha aumentado sustancialmente de 1,5 millones de toneladas en 1950 a 348 millones de toneladas, aproximadamente para el año 2017 (Plastics Europe, 2018, p. 18), ocupando un papel importante en todos los aspectos de la vida humana, incluyendo aplicaciones comerciales, industriales y medicinales (Okunola et al., 2019, p. 1; Pawar, Shirgaonkar, & Patil, 2016, p. 42).

En aplicaciones más cotidianas, los materiales plásticos se han posicionado como una de las mejores alternativas para el almacenamiento de alimentos y bebidas, en términos de costo y efectividad (Hotchkiss, 1988, p. 2). De hecho, para el año 2017, casi el 40% del plástico transformado en Europa se destinó para tal fin (Plastics Europe, 2018, p. 24). Sin embargo, en la fabricación de dichos materiales se involucran aditivos, estabilizantes, lubricantes y antioxidantes, sustancias que pueden migrar de los materiales plásticos de envasado a los alimentos, después de someterlos a diferentes factores de exposición, como altas temperaturas, radiación UV y radiación de microondas (Arvanitoyannis & Bosnea, 2004, p. 67; Bach et al., 2013, pp. 672–673; Chang et al., 2018, p. 142; Cooper, Kendig, & Belcher, 2011, pp. 943–944; Duck Soo, Seung Jun, Kyu Bong, Hyung Sik, & Byung Mu, 2009, p. 1285; Suhrhoff & Scholz, 2015, p. 84; Xue & Shu, 2013, p. 929).

Dichas sustancias han demostrado ser perjudiciales para la salud aún en pequeñas dosis por su carácter mutagénico, interactuando con el ADN y alterando significativamente el material genético de los individuos (Nepalia, Singh, Mathur, Kamath, & Pareek, 2018, p. 391; Romana, 1993, p. 17). Puntualmente, una de las sustancias más utilizadas para la fabricación de recipientes plásticos es el Bisfenol A (BPA), un conocido aditivo que brinda estabilidad y firmeza al recipiente; no obstante, diversas investigaciones alrededor del mundo han

documentado la migración de dicha sustancia desde los revestimientos plásticos a los alimentos y sus consecuencias en el detrimento de la salud humana (Cooper et al., 2011, pp. 943–944; Duck Soo et al., 2009, pp. 1285–1287; García et al., 2017, pp. 441–443; Mansilha et al., 2013, pp. 6012–6016; Nepalia et al., 2018, pp. 393–399; L. N. Vandenberg, 2014, pp. 426–429; Laura N. Vandenberg, Hauser, Marcus, Olea, & Welshons, 2007, pp. 139–173; Xue & Shu, 2013, pp. 929–932).

Por esta razón, la presente investigación enmarcada en el macroproyecto "Análisis de riesgo a partir de recipientes plásticos de bajo costo en contacto intermitente con alimentos en la ciudad de Villavicencio (Meta)", se desarrolla con el objeto de evaluar la mutagenicidad de sustancias migradas de recipientes plásticos para almacenar, transportar y calentar alimentos en la ciudad de Villavicencio, a través del test Ames como método indirecto para la identificación de mutagenicidad. Así, se contribuye al reconocimiento de una problemática real enmarcada en el área de salud ambiental, y a su vez se genera información base para la elaboración de nuevas investigaciones, que orienten la toma de decisiones en cuanto a la salud de la población.

### **Planteamiento del problema**

Los materiales plásticos son ampliamente usados en todo el mundo y se consideran extremadamente convenientes para el almacenamiento, la preparación y el consumo de alimentos (Mansilha et al., 2013, p. 6007). Sin embargo, numerosos estudios han encontrado que los envases plásticos contienen diversos aditivos, monómeros no reaccionados, auxiliares de procesamiento como Bisfenol A (BPA), metales pesados y plastificantes como di(2-etilhexil)ftalato (DEHP) en sus revestimientos superficiales (Arvanitoyannis & Bosnea, 2004, p. 63; Ballesteros, Rubio, & Pérez, 2009, p. 450; Chang et al., 2018, p. 142; Erler & Novak, 2010, pp. 400–407; Nepalia et al., 2018, p. 392; Suhrhoff & Scholz, 2015, p. 84; L. N. Vandenberg, 2014, pp. 424–429; Laura N. Vandenberg et al., 2007, pp. 139–177; Xue & Shu, 2013, p. 929). Dichos compuestos pueden transportarse masivamente desde los componentes del empaque a los alimentos (proceso conocido como migración), cuando estos son sometidos a altas temperaturas o a otros factores físico-químicos, incumpliendo la garantía de seguridad al consumidor puesto que estas sustancias son potencialmente dañinas y pueden generar efectos mutagénicos (Bach et al., 2013, p. 672; Lopez et al., 2007, pp. 95–96; Nepalia et al., 2018, p. 391).

Las sustancias mutagénicas pueden ocasionar daños al ADN, alterando a largo plazo la información genética del individuo, siendo una importante causa de mortalidad y morbilidad en sociedades avanzadas (Mortelmans & Zeiger, 2000, p. 29; Romana, 1993, p. 25). Diferentes estudios asocian la presencia de sustancias mutagénicas y disruptores endocrinos<sup>1</sup> a diferentes enfermedades como el cáncer, diabetes, obesidad, criptorquidia, afectaciones en la fertilidad, daños cardiovasculares, modificaciones del comportamiento y desarrollo, déficit cognitivo, alteraciones neurológicas, entre otras (Cooper et al., 2011, p. 943; Mansilha et al., 2013, p. 6008; J. Muncke et al., 2017, p. 1; Jane Muncke, 2011, p. 119; Omran, Gaber, Mostafa, Abdel, & Salah, 2018, p. 188; L. Vandenberg, Luthi, & Quinerly, 2015, pp. 374–375).

Aunque el aseguramiento de la calidad de los productos plásticos es relevante, Colombia no posee una normatividad específica que permita regular estrictamente los materiales plásticos, generando incertidumbre y permisividad en la comercialización. Puntualmente, los recipientes plásticos para almacenar, calentar y transportar alimentos (coloquialmente denominados “cocas”, “portacomidas”, “tupper”, “fiambreras”, entre otros), se comercializan a bajo costo en los principales sectores comerciales de las ciudades, llegando a los consumidores sin cumplir, en diversas ocasiones, con los requerimientos mínimos de etiquetado (Muñoz & Santos, 2019).

Particularmente, Villavicencio no cuenta con informes o estudios toxicológicos accesibles que reporten la relación entre el uso de estos recipientes plásticos y sus posibles efectos nocivos a la salud. No obstante, en el año 2019, Muñoz y Santos se realizaron 1064 encuestas para conocer las preferencias de compra y uso de recipientes plásticos de la población de Villavicencio, obteniendo que el 46.71% de los encuestados reportan que el principal criterio de compra es el precio y el 57,7% no pagarían más de \$5.000 por estos recipientes. Con respecto al uso, el 81% emplean recipientes plásticos para transportar y calentar alimentos y el 90% no tienen conocimiento sobre el BPA o sus efectos nocivos en la salud (Muñoz & Santos, 2019, pp. 51–54).

El panorama anterior genera preocupación en cuanto al tipo de producto que se está comercializando en la ciudad, puesto que el desconocimiento general de la población y el mal

---

<sup>1</sup> Sustancias que trastornan la reproducción, el crecimiento y la supervivencia al cambiar la función normal del sistema endocrino

uso de este tipo de recipientes puede generar a largo plazo problemas de salud debido a las sustancias liberadas por los plásticos.

Por tanto, y como parte del macroproyecto en ejecución "Análisis de riesgo a partir de recipientes plásticos de bajo costo en contacto intermitente con alimentos en la ciudad de Villavicencio (Meta)", se plantea la presente propuesta buscando determinar el índice de mutagenicidad de las sustancias liberadas por los recipientes plásticos utilizados y comercializados a bajo costo (entre \$1.000 y \$20.000) en la ciudad, con el uso de una metodología sencilla y práctica como el test Ames, permitiendo obtener resultados confiables, y que puedan ser tomados como punto de partida para la toma de decisiones relacionadas con la salud de la población.

En este sentido, la presente investigación busca responder a la siguiente formulación: ¿Cómo varía el índice de mutagenicidad determinado por test Ames, de una muestra de agua destilada en contacto con recipientes plásticos de bajo costo, en función del uso y tipo de recipiente?

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Determinar la mutagenicidad de las sustancias presentes en los recipientes plásticos de bajo costo empleados para transportar, almacenar y calentar alimentos en la ciudad de Villavicencio (Meta) a partir de la aplicación del test AMES.

### **Objetivos específicos**

- Caracterizar mediante variables cualitativas los recipientes plásticos comercializados a bajo costo en las principales zonas comerciales de Villavicencio.
- Evaluar el índice de mutagenicidad de las sustancias migradas desde los recipientes plásticos hacia una matriz de agua, después de exponerlos a calentamiento en microondas mediante la aplicación del test AMES.
- Analizar la variación del índice de mutagenicidad en función de las variables cualitativas y el número de calentamientos de los recipientes plásticos.

## **Justificación**

Desde la década de los 50, se ha presentado un desarrollo significativo de materiales sintéticos para ser implementados en productos de consumo, produciendo plásticos de todo tipo e incorporándolos en diferentes artículos cotidianos, especialmente aquellos destinados al almacenamiento, preparación y consumo de alimentos (Mansilha et al., 2013, p. 6007; L. Vandenberg et al., 2015, p. 373). Sin embargo, en los plásticos se encuentran sustancias potencialmente dañinas utilizadas en su fabricación, las cuales pueden migrar del material y liberarse en matrices de agua y alimentos. Dicha migración es generada por diversos factores de exposición en condiciones normales de uso (pasteurización, esterilización o calentamiento con microondas), luz ultravioleta (UV) y por propiedades de los alimentos, tales como la composición inorgánica o la presencia de bacterias (Bach et al., 2013, p. 672; Mansilha et al., 2013, p. 6008).

Generalmente, los consumidores se enfrentan a este tipo de sustancias en bajos niveles de exposición durante toda su vida, las cuales se relacionan con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, obesidad, diabetes, cáncer y efectos neurológicos (Jane Muncke, 2011, p. 119). Además, algunos estudios han asociado las sustancias liberadas de los materiales plásticos con efectos mutagénicos y alteraciones en el ADN (Nepalia et al., 2018, p. 391; Okunola et al., 2019, p. 1). Los efectos adversos relacionados con el uso extendido de recipientes plásticos, soportan la necesidad de reconocer esta problemática en el marco de la salud ambiental, y el consecuente desarrollo de investigaciones encaminadas a determinar la seguridad de los productos para contacto con alimentos, que sirvan como punto de partida para la toma de decisiones sobre la salud de la población.

Particularmente en Villavicencio, el desarrollo económico de los últimos años se ha generado a partir de la dinámica del sector comercio, hoteles y restaurantes (41% del empleo local y 10% del PIB Departamental) (Cámara de Comercio de Villavicencio, 2017, p. 5), lo cual ha permitido la comercialización de productos provenientes de diferentes partes del país y del mundo, de los cuales en diversas ocasiones se desconoce su calidad, seguridad e inocuidad. Específicamente, en la ciudad se comercializa a bajo costo gran variedad de recipientes plásticos para calentar, almacenar y transportar alimentos, que no cumplen con los requisitos establecidos por la

normatividad colombiana para este tipo de productos (Ministerio de Salud y Protección Social, 2012b, pp. 1–16).

Por lo anterior, y debido al uso extendido de dichos recipientes en el área de estudio para el transporte de alimentos a lugares de trabajo y estudio, la presente investigación pretende generar información documentada sobre los recipientes plásticos comercializados en Villavicencio y los posibles efectos mutagénicos derivados, toda vez que no existen reportes accesibles por parte de las autoridades competentes con información técnica, específica y científica en torno a dichos recipientes en la ciudad. Así, la presente investigación representa un punto de partida para el desarrollo de estudios posteriores con un mayor grado de especialización, que puedan ser presentados ante las autoridades sanitarias para la formulación de estrategias encaminadas a prevenir daños en la salud de la población.

## Capítulo 2: Antecedentes

---

Se han realizado diversos estudios en todo el mundo acerca de las sustancias presentes en los materiales plásticos y materiales para contacto con alimentos, entre las que destacan el Bisfenol A (BPA) y otras sustancias mutagénicas, y los riesgos asociados a la salud debido a su exposición. Las concentraciones migradas de Bisfenol en matrices de agua y alimento han sido evaluadas bajo diferentes condiciones y diferentes tipos de plásticos, encontrando resultados positivos (Duck Soo et al., 2009; García et al., 2017; Nepalia et al., 2018; Wolstenholme, Goldsby, & Rissman, 2013; Xue & Shu, 2013) y negativos (Cooper et al., 2011) para migración.

Otros autores han descrito, mediante diferentes métodos y revisiones del tema, los efectos a la salud humana debido a la exposición de BPA, disruptores endocrinos y sustancias mutagénicas, encontrando relación con la aparición de enfermedades como cáncer, diabetes, obesidad, criptorquidia, afectaciones en la fertilidad, daños cardiovasculares, modificaciones del comportamiento y desarrollo, déficit cognitivo, alteraciones neurológicas, entre otras (Ballesteros et al., 2009; Cooper et al., 2011; Erler & Novak, 2010; Mansilha et al., 2013; Monneret, 2017; J. Muncke et al., 2017; Jane Muncke, 2011; Omran et al., 2018; L. Vandenberg et al., 2015; L. N. Vandenberg, 2014; Laura N. Vandenberg et al., 2007). Entre los métodos más utilizados para la detección de sustancias mutagénicas se encuentra la cromatografía de gases, la cromatografía líquida, el test Ames, el test SOS/umu, el test cometa, el test ELISA, entre otros. El test Ames ha sido utilizado por diversos autores como una pantalla inicial para determinar la mutagenicidad de sustancias presentes en fuentes de agua (Guan et al., 2017; Romana, 1993) y compuestos químicos (Aßmann, Emmrich, Kampf, & Kaiser, 1997; Chung, Kirkovsky, Kirkovsky, & Purcell, 1997; González et al., 2004; Hiramoto, Hiromi, Kato, & Kikugawa, 1995; Kier, Yamasaki, & Ames, 1974; Trossero et al., 2006).

En un estudio realizado por Nepalia et. al (2018) se evaluó la mutagenicidad de los alimentos listos para consumir por bebés (0 - 3 años) y las sustancias migradas (BPA, plomo y DEHP) de los plásticos usados para el alimento de bebés mediante dos bioensayos basados en *Salmonella typhimurium* (ensayo de reversión bacteriana de Ames y ensayo de fluctuación) y el uso de cromatografía de gases y espectrometría de masas. Se encontraron moderados niveles de BPA y

altos niveles de DEHP migrados de los plásticos a las muestras recolectadas, los cuales aumentaban con la exposición del recipiente a altas temperaturas (Nepalia et al., 2018). Así mismo, (Okunola et al., 2019) evaluó el potencial mutagénico y genotóxico de lixiviados provenientes de un vertedero de desechos plásticos utilizando el test de mutagenicidad de Ames con dos cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, encontrando resultados positivos para mutagenicidad en todas las concentraciones probadas (Okunola et al., 2019).

Por otro lado, Bach et. al (2013) investigó el impacto de la temperatura en la liberación de los componentes de la botella de PET en el agua y evaluó el posible peligro para la salud mediante bioensayos in vitro con bacterias y líneas celulares humanas. En dicho estudio se encontraron sustancias que no están en la lista positiva del Reglamento de la Unión Europea para fabricación de plásticos pero no se hallaron resultados positivos de actividad mutagénica en los bioensayos (Bach et al., 2013).

En Colombia, no hay registros accesibles acerca del uso del test Ames para determinar mutagenicidad de sustancias migradas desde recipientes plásticos. Sin embargo, existen registros sobre el uso del test Ames en otros contextos y la determinación de sustancias provenientes de productos plásticos con otros métodos entre los que se destacan:

Respecto al uso de plásticos se evaluó, a través de cromatografía de gases y espectrometría de masas, la liberación de sustancias utilizadas en la fabricación de productos de poliestireno expandido después de exponerlos a altas temperaturas, encontrando al menos 30 compuestos que pueden ser perjudiciales para la salud humana (Pajaro, Caballero, & Olivero, 2014). Así mismo, se evaluó la presencia de disruptores endocrinos en diferentes tipos de agua embotellada comercializada en Bogotá, encontrando concentraciones significativas de BPA y DEHP en contraste con los niveles permisibles por organizaciones internacionales como la Agencia de Protección Ambiental (EPA) (Enríquez, 2017).

En cuanto al test Ames, ha sido utilizado para la determinación de actividad mutagénica y genotóxica del material particulado PM<sub>2,5</sub> en ciudades como Cúcuta, Pamplona y Villa del Rosario, demostrando el potencial mutagénico de dicho contaminante y los riesgos para la salud de las personas que habitan en estas ciudades (Beleño, Quijano, & Melendez, 2013; Melendez, Martínez, & Quijano, 2012; Melendez, Quintero, & Quijano, 2016). De igual forma, se ha

utilizado para evaluar la mutagenicidad de metales pesados en muestras de agua del río Cauca en la ciudad de Cali y en la curtiembre Tasajero en Cúcuta, encontrando un alto índice de mutagenicidad en ambos casos (Quijano, Castillo, & Melendez, 2015; Vivas et al., 2015).

Así mismo, el test Ames se ha empleado para determinar la mutagenicidad de extractos de plantas del género *Sapindus* utilizadas para el tratamiento de leishmaniasis y trypanosomas y de los géneros *Artemisia*, *Eupatorium* y *Solanum* para el tratamiento de Malaria sin encontrar actividad mutagénica o genotóxica en ninguno de los casos, reafirmando la seguridad para el tratamiento de dichas enfermedades (Barbosa, Muskus, Orozco, & Pabón, 2017; Navarro, Bonilla, Trujillo, & Upegui, 2006; Pabón, Blair, Carmona, Zuleta, & Saez, 2003; Pabón, Lopera, Carmona, & Blair, 2001). Finalmente, en el sector agrícola, se ha empleado el test Ames para la determinación de mutagenicidad de un insecticida organofosforado usado ampliamente en el país para la fumigación de cultivos de café, encontrando un alto potencial mutagénico y la capacidad de generar aberraciones cromosómicas; y de esteres de sacarosa proveniente de la planta *Physalis peruviana* sin encontrar actividad mutagénica (Ocampo, Caro, Rivera, & Franco, 2017; Sierra et al., 1998).

### Capítulo 3: Marco referencial

---

En la década de 1950 y 1960, hubo un desarrollo significativo de materiales sintéticos para ser implementados en productos de consumo. Se produjeron plásticos de todo tipo y desde entonces se han incorporado a innumerables materiales. Los productores de estos químicos y materiales supusieron que la baja exposición de los seres humanos o la vida silvestre, mantendría bajo el riesgo a padecer efectos negativos sobre su salud, pero, actualmente se consideran extremadamente convenientes para el almacenamiento, la preparación y el consumo de alimentos, de tal forma que, a partir de los estudios de campo, los experimentos controlados con animales de laboratorio y la epidemiología ha desafiado esta suposición (L. Vandenberg et al., 2015, p. 373).

#### **Plástico**

El concepto de plástico que se evidencia en el texto de (Baldomero et al., 2005) se define de la siguiente manera:

“Materiales orgánicos constituidos por macromoléculas y producidos por transformación de sustancias naturales o por síntesis directa, a partir de productos extraídos del petróleo, del gas natural, del carbón o de otras materias minerales” (p. 87).

Este a su vez, se puede moldear en objetos sólidos de diversas formas y, por lo tanto, se ha trasladado rápidamente a todos los aspectos de la vida cotidiana, con una amplia gama de aplicaciones como películas, materiales de envoltura, bolsas de basura y de compras, contenedores de fluidos, ropa, juguetes, productos domésticos e industriales, y materiales de construcción, además de considerarse extremadamente conveniente para el contacto con alimentos (Okunola et al., 2019, p. 1). Como resultado de esto, existe hoy en día una gran variedad de aplicaciones plásticas representado en una enorme cantidad de productos elaborados con este material, variando según la composición química y la estructura, desarrollados a partir de los requerimientos del mercado (Dalglish et al., 2008, p. 1). Por lo tanto, ha surgido la necesidad de clasificarlos según las resinas que los componen, para de tal forma conocer el uso con el que se constituyeron y la disposición final que debe tener.

Según el código internacional de identificación de resinas, existen 7 tipos de plásticos utilizados en gran variedad de productos cotidianos, representados a través de un triángulo que contiene un número del 1 al 7 según corresponda, acompañado en la parte inferior de las siglas del nombre del plástico, tal como se aprecia en la figura 1.



*Figura 1. Código internacional de identificación de resinas. Adaptado de: Escuela Colombiana de Ingeniería (2007).*

\* **Polietileno Tereftalato (PET):** Tipo de plástico generalmente claro, lavable, que no absorbe la humedad. Posee buena fuerza y dureza, lo cual lo hace resistente al calor y a la grasa. Se utiliza principalmente en la elaboración de botellas plásticas para bebidas, recipientes de aderezo, medicamentos, agroquímicos, detergentes, limpiadores, entre otros (Erler & Novak, 2010, p. 6; Escuela Colombiana de Ingeniería, 2007, p. 15).

\* **Polietileno de Alta Densidad (PEAD):** Este polímero posee propiedades mecánicas como alta resistencia a la tensión, impacto y abrasión debido a su alta densidad. Así mismo, es resistente a bajas temperaturas. Su aplicación está relacionada con envases para detergentes, aceites de automotor, lácteos y pintura, tuberías, entre otros (American Society for Testing and Materials, 2013, p. 3; Erler & Novak, 2010, p. 6; Escuela Colombiana de Ingeniería, 2007, p. 15).

\* **Policloruro de Vinilo (PVC):** Material flexible, claro, elástico, resistente a la humedad y con propiedades eléctricas favorables. De igual forma, es resistente a grasas, aceites y a algunos químicos. A partir de este se elaboran envases cosméticos, tuberías, accesorios de fontanería, revestimiento de paredes, láminas de techo, botellas de plástico, empaques de comida, entre otros

(American Society for Testing and Materials, 2013, p. 3; Erler & Novak, 2010, p. 6; Escuela Colombiana de Ingeniería, 2007, p. 15).

\* **Polietileno de Baja Densidad (PEBD):** Resina suave, flexible, cerosa, translúcida, caracterizada por su facilidad de procesar y resistencia a la humedad. Es usado en la manufactura de películas flexibles, tales como bolsas plásticas y publicitarias, también es usado en alambres y cables por las propiedades favorables para aislamiento eléctrico (Erler & Novak, 2010, p. 6; Escuela Colombiana de Ingeniería, 2007, p. 15).

\* **Polipropileno (PP):** Es el polímero termoplástico, parcialmente cristalino, con dureza considerable pero que puede llegar a ser flexible, ceroso, translucido y resistente a altas y bajas temperaturas. Es comúnmente usado en la elaboración de recipientes destinados al contacto con alimentos y bebidas como botellas, biberones, tupperware, empaques y láminas, pitillos, entre otros (American Society for Testing and Materials, 2013, p. 3; Erler & Novak, 2010, p. 6; Escuela Colombiana de Ingeniería, 2007, p. 15).

\* **Poliestireno (PS):** Es un plástico muy versátil que puede ser rígido o formado. Es claro, duro y quebradizo. Es muy poco resistente al vapor de agua, oxígeno y tiene relativamente bajo punto de fusión. Entre sus aplicaciones se encuentra la fabricación de bandejas de alimentos de espuma de poliestireno, cartones de huevos, vasos y tazones desechables, recipientes de comida para llevar y cubiertos de plástico opaco (American Society for Testing and Materials, 2013, p. 3; Erler & Novak, 2010, p. 6; Escuela Colombiana de Ingeniería, 2007, p. 15).

\* **Otros:** El uso de este código indica que el empaque en cuestión está hecho de una resina diferente a las seis listadas o de más de una de dichas resinas y que es usado en una combinación de varias capas. Se utiliza en botellas de agua reutilizables, algunas botellas de jugos y salsa de tomate. Así mismo, embalaje, autopartes, electrodomésticos, computadoras, electrónica, enfriador de agua botellas, dispositivos médicos (American Society for Testing and Materials, 2013, p. 3; Erler & Novak, 2010, p. 6; Escuela Colombiana de Ingeniería, 2007, p. 15).

Además del polímero principal, la mayoría de los plásticos contienen diversos aditivos y plastificantes, como el Bisfenol A (BPA) y di(2-etilhexil)ftalato (DEHP), para mejorar las especificaciones del producto como ductilidad, dureza, durabilidad o resistencia a la intemperie (Suhrhoft & Scholz, 2015, p. 84).

## **Bisfenol A**

El Bisfenol A se define por (García et al., 2017) como:

“Producto químico producido en grandes cantidades para su uso principalmente en la producción de policarbonato y resinas epoxi. Se usa ampliamente en el envasado de alimentos y bebidas para protegerlos de los contaminantes y mantener su integridad y calidad” (p. 3).

La exposición humana a Bisfenol A es extensa y generalmente ocurre por vía oral, puesto que se ha demostrado que se filtra de los contenedores de alimentos y bebidas en condiciones normales de uso (Montes & Olivero, 2013, p. 312; Laura N. Vandenberg et al., 2007, p. 140). Así mismo, existen otras fuentes de exposición como el contacto con la piel, el agua y el aire, además, en humanos se ha cuantificado en sangre, leche materna, orina, líquido amniótico, cordón umbilical y placenta (Gómez et al., 2018, p. 68). El Bisfenol A ha sido considerado como una sustancia extremadamente preocupante debido a sus propiedades de alteración endocrina, causantes de probables efectos graves en la salud humana, dando lugar a un nivel de preocupación equivalente a las sustancias carcinógenas, mutágenas o tóxicas para la reproducción (European Chemical Agency (ECHA), 2018).

De igual forma, en los plásticos se encuentra otras sustancias potencialmente dañinas inherentes en su fabricación, las cuales pueden migrar del material y liberarse en matrices de agua y alimentos (Mansilha et al., 2013). Esta migración se produce por diversos factores de exposición como pasteurización, esterilización o calentamiento con microondas, luz ultravioleta (UV) y propiedades fisicoquímicas de los alimentos como la composición inorgánica o la presencia de bacterias (Bach et al., 2013, p. 672; Mansilha et al., 2013, p. 6008). Por lo tanto, se hace necesario determinar la mutagenicidad de dichas sustancias y las afectaciones que pueda llegar a tener el ser humano y los ecosistemas expuestos a estas (Okunola et al., 2019, p. 1).

## **Mutagenicidad**

La mutagenicidad se refiere a la inducción de cambios permanentes transmisibles en la cantidad o estructura del material genético de las células u organismos. Estos cambios pueden involucrar un solo gen o segmento de gen, un bloque de genes o cromosomas. Como resultado de estos

cambios, se produce una mutación la cual es causada por un agente denominado mutágeno (Sundar, Jain, & Valani, 2018, p. 191).

De acuerdo con la (Organización Mundial de la Salud (OMS), 1985), la mutación se define de la siguiente manera:

“Alteración en la información genética que ocurre como resultado de pequeños cambios (pérdida, adición o reemplazo de bases) alterándose así la secuencia del ADN y afectando la fidelidad del mensaje genético” (p. 15).

Esta puede presentarse de forma natural o de forma inducida, es decir provocadas artificialmente con radiaciones, sustancias químicas u otros agentes mutagénicos (Kremenchutzky & Vásquez, 2015, p. 2)

Dichos agentes mutagénicos, en algunos casos simplemente llamados mutágenos, son definidos por (Zuluaga et al., 2009) como:

“Sustancias que producen mutaciones en el material genético y, por consiguiente, alteran el control de la actividad celular, desde la producción de energía hasta su reproducción, lo que conduce a un funcionamiento inadecuado de la célula” (p. 38).

Por otra parte, la Agencia de Protección Ambiental (EPA), Food and Drug Administration (FDA), así como otras entidades de carácter gubernamental y científico aplican pruebas de mutagenicidad, con el fin de aprobar y registrar pesticidas, productos farmacéuticos, dispositivos médicos, así como el establecimiento de niveles de exposición aceptables en aire, agua y alimentos. Lo anterior, para determinar si dichos productos y sustancias, pueden generar mutaciones en seres humanos o si estos contribuyen a resultados adversos en la salud (Sundar et al., 2018, p. 191). Entre las pruebas de mutagenicidad más empleadas se encuentra el test SOS/umu, el test cometa, el test ELISA y el empleado en el presente estudio, el test Ames, debido al bajo costo que acarrea y la capacidad en equipamiento de los laboratorios de la Universidad Santo Tomás sede Villavicencio.

## Test Ames

El test Ames o ensayo de mutación inversa en bacterias se define según (Trossero et al., 2006) como:

“Ensayo de mutación bacteriano que emplea *Salmonella typhimurium* histidina-dependiente o *Escherichia coli* triptófano-dependiente, como bacterias indicadoras para la detección de mutágenos, debido a que revierten las mutaciones presentes en las cepas de prueba, restaurando la capacidad funcional del microorganismo para sintetizar un aminoácido esencial, siendo quizás la más difundida de las pruebas para detectar, en forma simple, rápida y económica, la capacidad mutagénica de diversas sustancias” (p. 140).

Fue desarrollado en 1975 por Bruce Ames, como una prueba simple para determinar los posibles efectos cancerígenos y mutagénicos de los productos químicos y como estos podían generar una mutación en la bacteria *Salmonella typhimurium* (Watson et al., 2014, p. 321).

De acuerdo con (Barreto, Castillo, & Retamal, 2016), *Salmonella spp* se define como:

Bacilo Gram negativo de la familia enterobacteriaceae, facultativo que se ha agrupado en las especies *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*, siendo considerada de mayor potencial patogénico la *S. enterica* por sus más de 2600 serotipos descritos hasta la fecha (p. 547).

*Salmonella typhimurium* es una serovariedad de *S. enterica* y es la responsable de enfermedad gastrointestinal en el ser humano, infección sistémica en el ratón y un cuadro crónico asintomático en aves debido a la ingesta de alimentos o agua contaminada (Barreto et al., 2016, p. 547).

Para el caso del Test Ames, usualmente se emplean las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium*, las cuales han sido modificadas genéticamente para evitar la biosíntesis del aminoácido histidina, demostrando la eficiencia en la detección de un gran número de mutágenos ambientales (Sandoval, 2007, p. 340). Sin embargo, si las células mutantes se tratan con una sustancia química que es mutagénica, la mutación se revierte en un pequeño número de células mutantes. Esta inversión restaura la capacidad de las células para crecer y formar colonias en un medio sólido que carece de histidina. Lo anterior, indica que un mutágeno más potente se traduce en un mayor número de colonias revertidas (Watson et al., 2014, p. 321).

Los resultados son expresados a través de la razón de mutagenicidad o índice de mutagenicidad (IM) que es una razón entre el número de revertantes de la placa de prueba (revertantes espontáneos inducidos) y el número de revertantes en la placa control (revertantes espontáneos) (Sandoval, 2007, p. 339).

El test Ames es uno de los métodos más rápidos y eficientes debido a su rentabilidad, simplicidad, flexibilidad, reproducibilidad y una base de datos validada considerable (Nepalia et al., 2018, p. 391). Por lo tanto, el test Ames ha sido designado para la determinación de mutagenicidad en diferentes aspectos como fuentes hídricas, contaminación del aire, compuestos químicos, alimentos y agua embotellada, recipientes plásticos, entre otros (Bach, Dauchy, Chagnon, & Etienne, 2012, pp. 571–583; Bach et al., 2013, pp. 672–680; Beleño et al., 2013, pp. 3731–3737; Enríquez, 2017, pp. 1–238; Guan et al., 2017, pp. 1–15; Mortelmans & Zeiger, 2000, pp. 29–60; Nepalia et al., 2018, pp. 391–399; Pabón et al., 2001, pp. 412–414; Quijano et al., 2015, pp. 13–20; Vivas et al., 2015, pp. 18–24).

### Marco legal

La normatividad legal vigente para Colombia relacionada con la fabricación, uso y comercialización de materiales plásticos destinados a estar en contacto con alimentos y bebidas se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. *Marco legal vigente.*

<b>NORMA</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
Constitución Política de Colombia de 1991 (Artículo 78)	Por medio de la cual se ejerce control de calidad de los bienes y servicios ofrecidos a la comunidad, así como la información que debe suministrarse al público. Por otro lado, determina responsabilidades para los que atenten contra la salud, la seguridad y aprovisionamiento de los consumidores y usuarios.
Ley 9 de 1979 del Congreso de Colombia	Por medio de la cual se dictan medidas sanitarias para los equipos, utensilios, empaques, envases o envolturas destinados a estar en contacto con alimentos y bebidas.
Resolución 683 del 2012 del Ministerio de Salud y Protección Social	Por medio de la cual se expide el Reglamento Técnico sobre los requisitos sanitarios que deben cumplir los materiales, objetos, envases y equipamientos destinados a entrar en contacto con alimentos y bebidas para consumo humano.
Resolución 4143 del 2012 del Ministerio de Salud y Protección Social	Por el cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios que deben cumplir los materiales, objetos, envases y equipamientos plásticos y sus aditivos, destinados a entrar en contacto con alimentos y bebidas para consumo humano en el territorio nacional.

Tabla 1. *Marco legal vigente (Continuación).*

Resolución 2014022808 del 2014 del INVIMA	Por la cual se establecen los ensayos de migración y verificación del cumplimiento de los límites de migración total y específica reglamentados en las resoluciones 4142 y 4143 del 2012.
Norma Técnica Colombiana NTC 5023 del ICONTEC	Se especifica los materiales y buenas prácticas de manufactura de compuestos y artículos plásticos para contacto con alimentos y bebidas y usos derivados, de tal forma que en las condiciones normalizadas o previsibles de empleo, no presenten migración hacia los alimentos o bebidas.

*Nota:* Normatividad Colombiana relacionada con la fabricación, uso y comercialización de materiales plásticos. Por Alvarez & Novoa, 2020.

## Capítulo 4: Metodología

### Diseño experimental

Las variables a considerar en el diseño experimental se seleccionaron teniendo en cuenta las características físicas de los recipientes plásticos comercializados en el mercado local de Villavicencio. Fueron seleccionadas 3 variables con dos opciones de respuesta cada una, tal como se evidencia en la Tabla 2.

Tabla 2. *Variables del diseño experimental.*

Variable	Numeración	Descripción
Plástico	1	Polipropileno (Número 5) <sup>2</sup>
	2	Otro (Números 1,2,3,4,6,7) <sup>2</sup>
Opacidad	1	Opaco
	2	Transparente
Presencia de BPA según la etiqueta	1	Libre de BPA
	2	No reporta

*Nota:* Variables del diseño experimental según las características físicas de los recipientes plásticos. Por Alvarez & Novoa, 2020.

El diseño experimental consiste en Bloques Incompletos Balanceados (BIB), en donde todos los tratamientos no están representados en cada bloque, y aquellos que sí están en uno en particular se ensayan en él una sola vez, garantizando que cada tratamiento ocurre el mismo número de veces en el diseño y cada par de tratamientos ocurren juntos el mismo número de veces que cualquier otro par (Lara & García, 1998). Para la elaboración del diseño experimental se utilizó el software estadístico R en conjunto con el paquete "Agricolae", el cual permite realizar procedimientos de análisis de datos experimentales como comparación de tratamientos y pruebas de comparación no paramétricas (De Mendiburu, 2016; Enríquez, 2017). Dentro del paquete "Agricolae" se utilizó la función `design.bib`, la cual crea diseños por bloques incompletos balanceados aleatorios y permite obtener el tamaño de muestra mínimo del experimento, de manera que se puedan implementar las herramientas estadísticas pertinentes para el análisis de datos.

<sup>2</sup> Según el código internacional de identificación de resinas: (Número 1) Tereftalato de Polietileno-PET, (Número 2) Polietileno de alta densidad-HDPE, (Número 3) Policloruro de Vinilo-PVC, (Número 4) Polietileno de baja densidad-LDPE, (Número 5) Polipropileno-PP, (Número 6) Poliestireno-PS, (Número 7) Otros-OTHER

El contraste de hipótesis del diseño por bloques incompletos balanceados enuncia:

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6 = \mu_7 = \mu_8 = \mu \quad \text{Vs.} \quad H_1 = \mu_i \neq \mu_j \text{ para algún } i \neq j$$

Es decir, se contrasta la hipótesis que no hay diferencia en las medias del índice de mutagenicidad de los tratamientos frente a la alternativa de que al menos una de las medias difiere de otra.

Los resultados del diseño experimental se presentan en la tabla 3. Para efectos de la presente investigación, "Tratamiento" representa el número posible de combinaciones de las variables del diseño; "lambda" representa el número de veces que cada par de tratamientos están juntos en el diseño; "Tamaño de bloque" representa el número de muestras que se pueden procesar al día según la capacidad del laboratorio; "Bloques" representa el número de días destinados al análisis de las muestras; "Réplicas" representa el número de recipientes de cada tratamiento que se deben adquirir para la extracción de las muestras; "Factor de eficiencia" representa la eficiencia del diseño de bloques incompletos en comparación con el diseño de bloques completos; y "Recipientes" representa el total de recipientes que se deben adquirir para extraer individualmente las muestras destinadas a experimentación. La matriz del diseño se encuentra en la Figura 2.

Tabla 3. *Parámetros del diseño experimental*

Parámetro	Valor
Tratamiento	8
Lambda	6
Tamaño de bloque	7
Bloques	8
Réplicas	7
Factor de eficiencia	0,9795918
Recipientes	56

*Nota:* Parámetros del diseño experimental por bloques incompletos balanceados obtenidos a partir del software R. Por Alvarez & Novoa, 2020.

		Bloques							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Tratamientos	1	•	•	•	X	•	•	•	•
	2	•	•	•	•	•	•	X	•
	3	•	•	•	•	•	•	•	X
	4	•	X	•	•	•	•	•	•
	5	•	•	•	•	X	•	•	•
	6	•	•	•	•	•	X	•	•
	7	•	•	X	•	•	•	•	•
	8	X	•	•	•	•	•	•	•

• Tratamientos que sí se ensayan en el bloque  
X Tratamientos que no se ensayan en el bloque

Figura 2. Matriz de distribución de los tratamientos en cada bloque según el diseño experimental. Por Alvarez & Novoa, 2020.

Las muestras consisten en 100ml de agua destilada contenida en un recipiente plástico y sometida a calentamiento en horno microondas para el desarrollo del test Ames.

Según los resultados del diseño experimental, se obtuvo un total de 8 tratamientos, de ahora en adelante llamados tipos de recipiente, producto de la combinación de las variables seleccionadas. Los tipos de recipientes y sus características físicas se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. *Tipos de recipientes.*

<b>Tipo de recipiente</b>	<b>Plástico (Polipropileno/Otro)</b>	<b>Opacidad (Opaco / Transparente)</b>	<b>Presencia de BPA según la etiqueta (Libre de BPA/No reporta)</b>
<b>A</b>	Polipropileno	Opaco	Libre de BPA
<b>B</b>	Polipropileno	Opaco	No reporta
<b>C</b>	Polipropileno	Transparente	Libre de BPA
<b>D</b>	Polipropileno	Transparente	No reporta
<b>E</b>	Otro	Opaco	Libre de BPA
<b>F</b>	Otro	Opaco	No reporta
<b>G</b>	Otro	Transparente	Libre de BPA
<b>H</b>	Otro	Transparente	No reporta

*Nota:* Tipos de recipientes para el desarrollo de la investigación según sus características físicas. Por Alvarez & Novoa, 2020.

### **Fases metodológicas**

En el marco del macroproyecto en ejecución "Análisis de riesgo a partir de recipientes plásticos de bajo costo en contacto intermitente con alimentos en la ciudad de Villavicencio (Meta)", se desarrolló la presente investigación a partir de tres fases metodológicas. Fase 1: identificación de recipientes plásticos, fase 2: determinación del índice de mutagenicidad y fase 3: análisis estadístico de los datos. El diagrama de proceso se presenta en la figura 3.

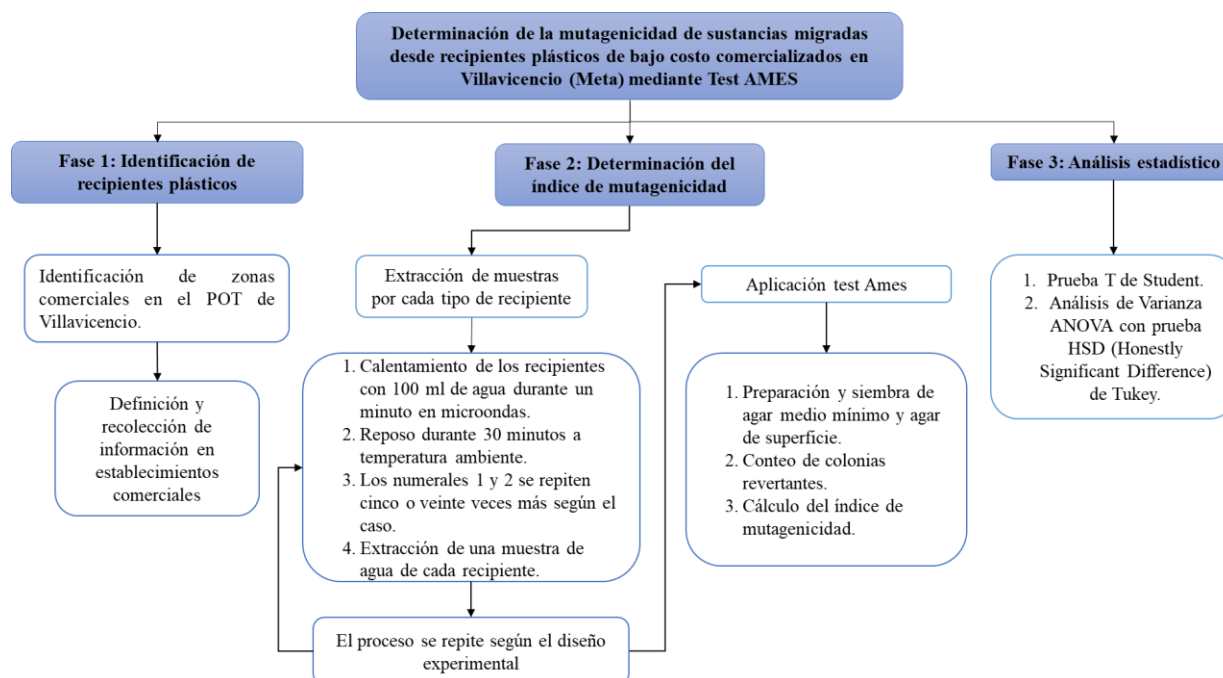


Figura 3. Diagrama de proceso de la metodología del proyecto. Por Alvarez & Novoa, 2020.

### Fase 1: Identificación de recipientes plásticos

En primer lugar, se utilizó el mapa de uso del suelo del Plan de Ordenamiento Territorial (POT) de la ciudad de Villavicencio (Concejo Municipal de Villavicencio, 2015) para identificar las áreas clasificadas como "zonas comerciales" y delimitar el área de estudio, tal como se observa en la figura 4. En cada zona se realizó un reconocimiento de los establecimientos que comercializan recipientes plásticos, en donde se registraron coordenadas con un GPS (Garmin eTrex 30x), para posteriormente generar un mapa con la ubicación de cada establecimiento a través del software ArcGis 10.4.

En cada establecimiento visitado se diligenció un formato de recolección de información (Anexo A) para identificar y cuantificar los recipientes plásticos comercializados en Villavicencio de acuerdo a los tipos establecidos en la Tabla 4. Así mismo, de acuerdo al diseño experimental, se realizó la compra de 56 recipientes plásticos (7 réplicas por cada uno de los 8 tipos de recipientes) para llevar a cabo el test Ames. Es preciso señalar que solamente se tuvieron en cuenta los recipientes plásticos cuyo precio estuviera comprendido entre \$1.000 y \$20.000,

puesto que la presente investigación está encaminada a evaluar el índice de mutagenicidad de agua en contacto con recipientes de bajo costo.

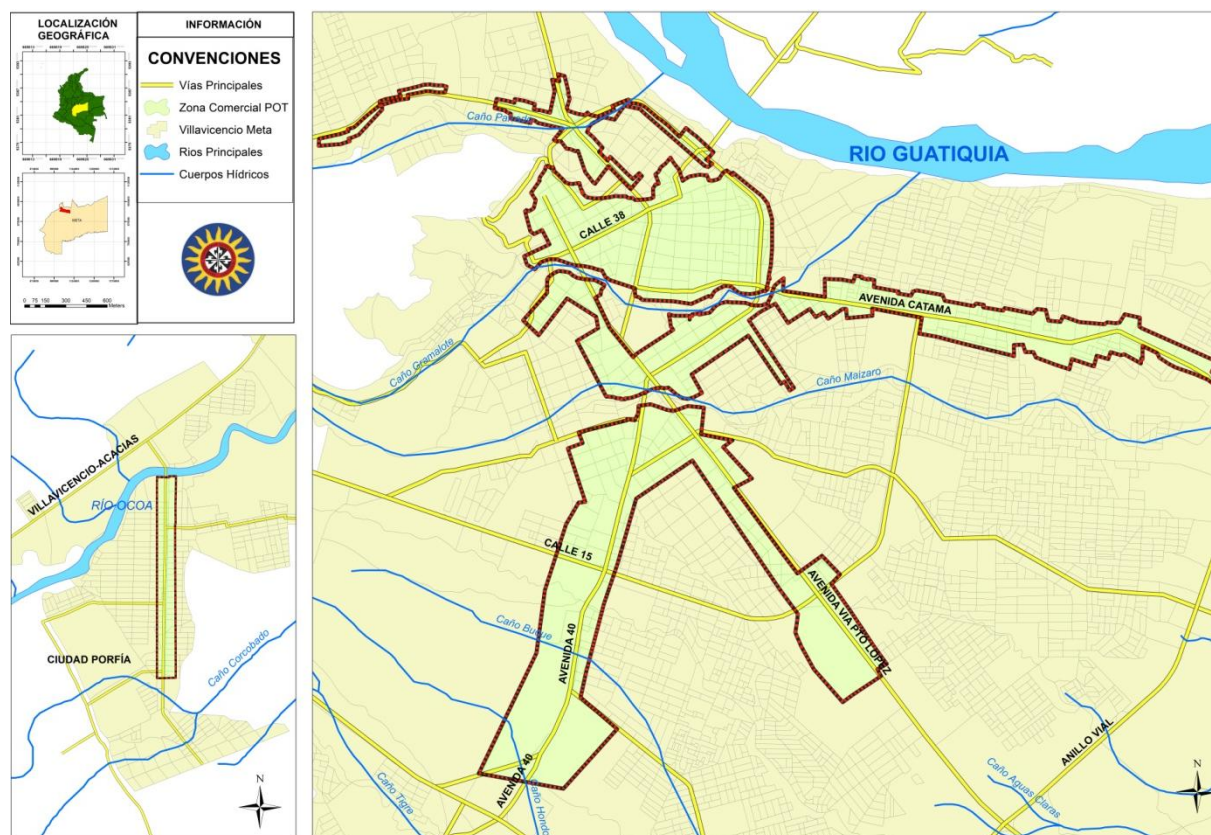


Figura 4. Áreas clasificadas como "zonas comerciales" según el plan de ordenamiento territorial de Villavicencio. Adaptado de (Concejo Municipal de Villavicencio, 2015); por Alvarez & Novoa, 2020.

## Fase 2: Determinación del índice de mutagenicidad

### Activación y mantenimiento de la cepa

Para el desarrollo del test de mutagenicidad Ames se tomó como principal referente el protocolo utilizado por Ames, Maccann & Yamasaki (1975, p. 350). Se utilizó la cepa de *Salmonella enterica subsp. enterica serovar tphimurium* (ATCC® 13311™) liofilizada y almacenada en un pellet kwik-stik a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  hasta el momento de su activación.

Tras la recepción de la cepa, se procedió a preparar placas con medio de cultivo "agar MacConkey" y "agar Salmonella-Shigella (SS)" para su activación y almacenamiento. Para la elaboración del medio de cultivo MacConkey, se disolvieron 10,3gr del medio de cultivo en

200ml de agua destilada; posteriormente, la mezcla se homogenizó en una placa de calentamiento con agitación magnética y se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. Para la elaboración del medio de cultivo Salmonella-Shigella (SS) se disolvieron 12gr del medio de cultivo en 200ml de agua destilada estéril; posteriormente, la mezcla se homogenizó y calentó con agitación frecuente, manteniendo en punto de ebullición durante un minuto (sin autoclavar). Ambos medios de cultivo se vertieron en placas de petri previamente esterilizadas, almacenándolas en refrigeración hasta el momento de su uso.

Para la activación de la cepa se realizaron siembras por agotamiento en los medios de cultivo MacConkey y SS manteniendo siempre condiciones estériles. Las placas de MacConkey se incubaron a 37°C entre 24 y 48 horas y las placas de SS se incubaron a 37°C entre 18 y 24 horas, tiempo después del cual se mantuvieron en refrigeración a 4±2°C.

Así mismo, se procedió a realizar un subcultivo de la cepa en caldo nutritivo para el desarrollo del test Ames. Para la elaboración del caldo nutritivo se pesaron 0,65gr de caldo nutritivo y se disolvieron en 50ml de agua destilada, para luego esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Posteriormente se inocularon 50ml de solución salina estéril al 0,085% con una densidad celular de  $6 \times 10^8$  células/ml y se agregaron 12,5ml al caldo nutritivo previamente preparado. Finalmente, el caldo nutritivo se incubó a 37°C durante 18 horas para alcanzar una densidad celular de  $1,2 \times 10^9$  células/ml, después de lo cual se mantuvo en refrigeración a 4±2°C.

### **Preparación de soluciones**

Posterior a la activación y mantenimiento de la cepa se procedió a preparar los medios y soluciones necesarias para efectuar el test Ames. En primer lugar, se preparó el agar medio mínimo, el cual consiste en una mezcla de solución agar, solución glucosa y solución medio Vogel-Bonner "E" 10X.

Para la preparación de la solución agar, se pesaron 7,5gr de agar y se diluyeron en 300ml de agua destilada. Por otro lado, para la preparación de la solución glucosa, se pesaron 10gr de glucosa y se diluyeron en 100ml de agua destilada mediante agitación. Finalmente, para la preparación de la solución medio Vogel-Bonner "E" 10X, se pesaron y agregaron en orden 10gr de sulfato de magnesio Heptahidratado, 100gr de ácido cítrico monohidratado, 500gr de fosfato

de potasio dibásico anhidro, 175gr de fosfato de sodio y amonio tetrahidratado y se disolvieron en 1000ml de agua destilada contenida en frasco ámbar; posteriormente, se tomaron 10 ml de la solución preparada y se adicionaron a 90ml de agua destilada. Las tres soluciones previamente preparadas se esterilizaron en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Para la preparación de agar medio mínimo se mezclaron 300ml de solución agar, 100ml de solución glucosa y 100ml de medio Vogel–Bonner, homogenizando y manteniendo en todo momento condiciones estériles. La mezcla se distribuyó en placas de petri de 100x15mm previamente esterilizadas y se mantuvieron en refrigeración ( $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) hasta el momento de su uso.

A continuación, se preparó el agar de superficie y la solución histidina-biotina. Para el agar de superficie se pesaron 18gr de agar, 15gr de Cloruro de sodio y se disolvieron en 100ml de agua destilada fría. Posteriormente, para la solución histidina-biotina se pesaron 0,117gr de histidina y 0,138gr de biotina y se disolvieron en 1000ml agua destilada en punto de ebullición. Ambas soluciones se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Finalmente, se agregaron 10 ml de la solución histidina-biotina al agar de superficie. La solución histidina-biotina se almacenó en refrigeración ( $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) durante un periodo máximo de 45 días.

Finalmente, para los controles positivos se preparó solución de ázida de sodio que actuó como agente mutagénico. Para preparar dicha solución se pesaron 0,00125gr de ázida de sodio y se disolvieron en 500ml de agua destilada estéril. La solución se almacenó en refrigeración ( $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) hasta el momento de su uso.

### **Extracción de muestras**

Se procedió a realizar la extracción de las muestras de agua de los recipientes plásticos en las instalaciones de la Universidad Santo Tomás, sede Villavicencio, específicamente en el laboratorio de Toxicología y Biotecnología. Las muestras de agua fueron extraídas bajo dos condiciones diferentes y consecutivas, para evaluar si existe desgaste suficiente del material que propicie la liberación de sustancias mutagénicas durante sus primeros usos:

\* Condición 1: cada uno de los recipientes, según la distribución de los tratamientos por bloque del diseño experimental, fue llenado con 100ml de agua destilada y se sometió a calentamiento en horno microondas convencional (LG MS0936GIR) durante 1 minuto; luego se

dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posterior al reposo, y sin desechar el agua contenida, se repitió el proceso hasta alcanzar 5 calentamientos, lo que representa una semana de uso en manos del consumidor (frecuencia considerada por los 5 días hábiles de la semana). El agua destilada restante después de los 5 calentamientos se tomó para ser analizada a través del test Ames.

Posteriormente, y con base en el protocolo de lavado de materiales de laboratorio (Colombiana de salud S.A., 2004, p. 7), se realizó el lavado de los recipientes con el fin de recrear las condiciones de uso que suelen tener en las manos de los consumidores (Mansilha et al., 2013, p. 6008).

\* Condición 2: Los mismos recipientes de la condición 1, fueron llenados con 100ml de agua destilada y se sometieron a calentamiento en horno microondas convencional (LG MS0936GIR) durante 1 minuto, luego se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posterior al reposo, y sin desechar el agua contenida, se repitió el proceso hasta alcanzar 20 calentamientos, lo que representa cuatro semanas de uso en manos del consumidor (frecuencia considerada por los 5 días hábiles de la semana). El agua destilada restante después de los 20 calentamientos se extrajo para ser analizada a través del test Ames.

Tanto en la condición 1 como en la 2, el agua contenida en los recipientes plásticos se mantuvo entre cada calentamiento, puesto que se pretendía determinar el efecto mutagénico de la concentración acumulada de las sustancias liberadas por dichos recipientes. Los reposos entre cada calentamiento se realizaron para evitar la evaporación del agua, lo cual podría llevar a una pérdida por arrastre de las sustancias liberadas por el material (Gallardo & Mallo, 1864, p. 297).

Se obtuvo un total de 112 muestras de agua (56 muestras en cada condición de calentamiento, en concordancia con el número de recipientes según el diseño experimental) que fueron analizadas a través del test Ames. Es preciso aclarar que, el calentamiento de los recipientes y la extracción de las muestras de agua se realizó paulatinamente según fuera requerido para aplicar el test Ames, y de acuerdo a los tratamientos establecidos para cada día de análisis de muestras (bloque) en el diseño experimental.

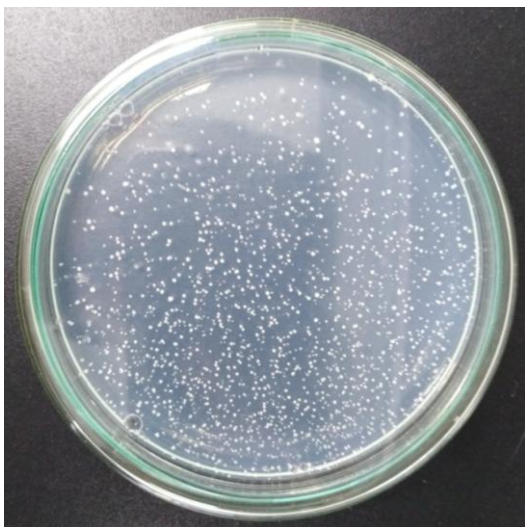
### **Aplicación del test Ames**

Posterior a la preparación de las soluciones y la extracción de las muestras se procedió a aplicar el test Ames para evaluar el índice de mutagenicidad de dichas muestras de agua. Es importante señalar que para cada muestra fue necesario efectuar el test Ames por triplicado, con el fin de garantizar mayor confiabilidad en los resultados y evitar pérdida de información por posible contaminación de las placas. Así pues, según el diseño experimental, para el desarrollo del test Ames en cada uno de los 8 días destinados al análisis de muestras (bloques), se dispuso en baño serológico a 50°C, 21 tubos de ensayo 13x100ml con tapa rosca, los cuales contenían por triplicado los extractos y el agar de superficie previamente preparado para evitar su solidificación.

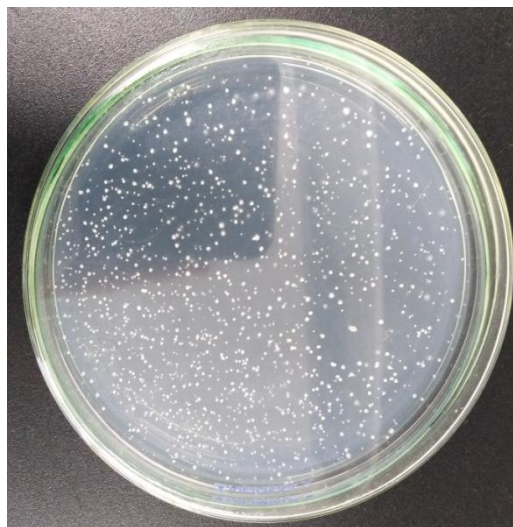
Establecido el montaje, se adicionó a los tubos de ensayo (por triplicado y en orden), 2ml de agar de superficie, 0,1ml de caldo de cultivo nutritivo inoculado con una densidad celular de  $1,2 \times 10^9$  células/ml y 1ml de la muestra de agua extraída. Cada tubo se agitó por 3 segundos con un vortex, vertiendo el contenido en las placas de agar mínimo previamente preparadas, realizando movimientos circulares a cada placa garantizando la distribución uniforme sobre el medio de cultivo. Las placas fueron dispuestas sobre una superficie plana durante 15 minutos hasta la solidificación del medio; posteriormente, se incubaron en forma invertida a 37°C durante 66 horas.

Así mismo, fue necesario realizar controles positivos y negativos de las pruebas para contrastar finalmente los resultados. Para los controles positivos, se realizó el mismo procedimiento de la prueba normal, con la variante de reemplazar la muestra de agua a analizar por 2 ml de la solución ázida de sodio previamente preparada. Los controles positivos se realizaron como placa de contraste para corroborar que la cepa presentara condiciones óptimas para el desarrollo del test Ames. Por otro lado, para los controles negativos, se realizó el mismo procedimiento de la prueba normal, con la variante de reemplazar la muestra de agua a analizar por 1 ml de agua destilada estéril. Los controles negativos permitieron obtener el número de colonias revertantes espontáneas de la cepa. Las placas de los controles positivos y negativos se incubaron de forma invertida a 37 °C durante 66 horas.

Seguidamente a la incubación, se procedió al conteo de las colonias revertantes de cada una de las placas que contenían las muestras a analizar (revertantes inducidas), los controles negativos (revertantes espontáneas) y los controles positivos (placa de contraste), a través de un cuenta colonias E&Q - CCD. La morfología de las colonias de *S. typhimurium* es muy característica, son blancas, translúcidas, con superficie lisa y bordes regulares (Sandoval, 2007), tal como se observa en las figuras 5 y 6.



*Figura 5.* Ejemplo 1 morfología colonias *S. typhimurium*. Por Alvarez & Novoa, 2020.



*Figura 6.* Ejemplo 2 morfología colonias *S. typhimurium*. Por Alvarez & Novoa, 2020.

Posterior al conteo, se procedió a obtener la media del número de colonias revertantes de los triplicados, para calcular finalmente el índice de mutagenicidad de cada muestra (Romana, 1993). Para el cálculo del índice de mutagenicidad se utilizó la siguiente fórmula, en donde RI corresponde al número de colonias revertantes inducidas y RE al número de colonias revertantes espontáneas (Ames et al., 1975):

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

Para la interpretación del índice de mutagenicidad, se consideran mutagénicos aquellos valores mayores o iguales a 2 ( $IM \geq 2$ ), ligeramente mutagénicos a los valores comprendidos entre 1,5 y 2 ( $1,5 \leq IM < 2$ ) y no mutagénicos a los valores menores a 1,5 ( $IM < 1,5$ ).

### **Fase 3: Análisis estadístico**

Después de obtener los valores del índice de mutagenicidad para cada uno de los tratamientos, se procedió a realizar el análisis estadístico de los datos a través del software IBM SPSS Statistics 25. En primer lugar, se aplicó la prueba t de Student para comparar las medias del índice de mutagenicidad de las dos condiciones de calentamiento, con el fin de determinar si hay una diferencia significativa entre ellas. Así mismo, se llevó a cabo un análisis de varianza ANOVA con el fin de determinar si los valores medios del índice de mutagenicidad de los tratamientos eran diferentes entre sí y determinar la influencia de los tratamientos en dicho índice.

Posteriormente, y habiendo verificado la diferencia de los valores medios, se aplicó la prueba HSD (Honestly Significant Difference) de Tukey para realizar comparaciones entre las medias de los tratamientos e identificar subconjuntos homogéneos de las medias que no se diferencian entre sí, determinando así los tipos de recipientes que poseían un índice de mutagenicidad medio más elevado o más bajo para seleccionar los tipos de recipientes plásticos más seguros para su uso en contacto con alimentos.

Así mismo, teniendo en cuenta que las 3 variables del estudio (Tipo de plástico, Opacidad y Presencia de BPA) poseen un comportamiento dicotómico (dos opciones de respuesta), se aplicó la prueba t de Student para comparar las medias del índice de mutagenicidad en cada variable, buscando determinar si existe relación entre las características del recipiente y el índice de mutagenicidad obtenido.

## Capítulo 5: Resultados y análisis

### 5.1. Selección de establecimientos comerciales

A partir del mapa del uso del suelo del plan de ordenamiento territorial (POT) de Villavicencio, se identificó un total de 49 establecimientos que comercializan recipientes plásticos para el almacenamiento, calentamiento y transporte de alimentos, ubicados en el centro de la ciudad y en los sectores aledaños a la avenida 40, la carrera 22 (vía Puerto López), la avenida Catama y ciudad Porfía, en contraste con las zonas comerciales de la ciudad, tal como se evidencia en la figura 7.

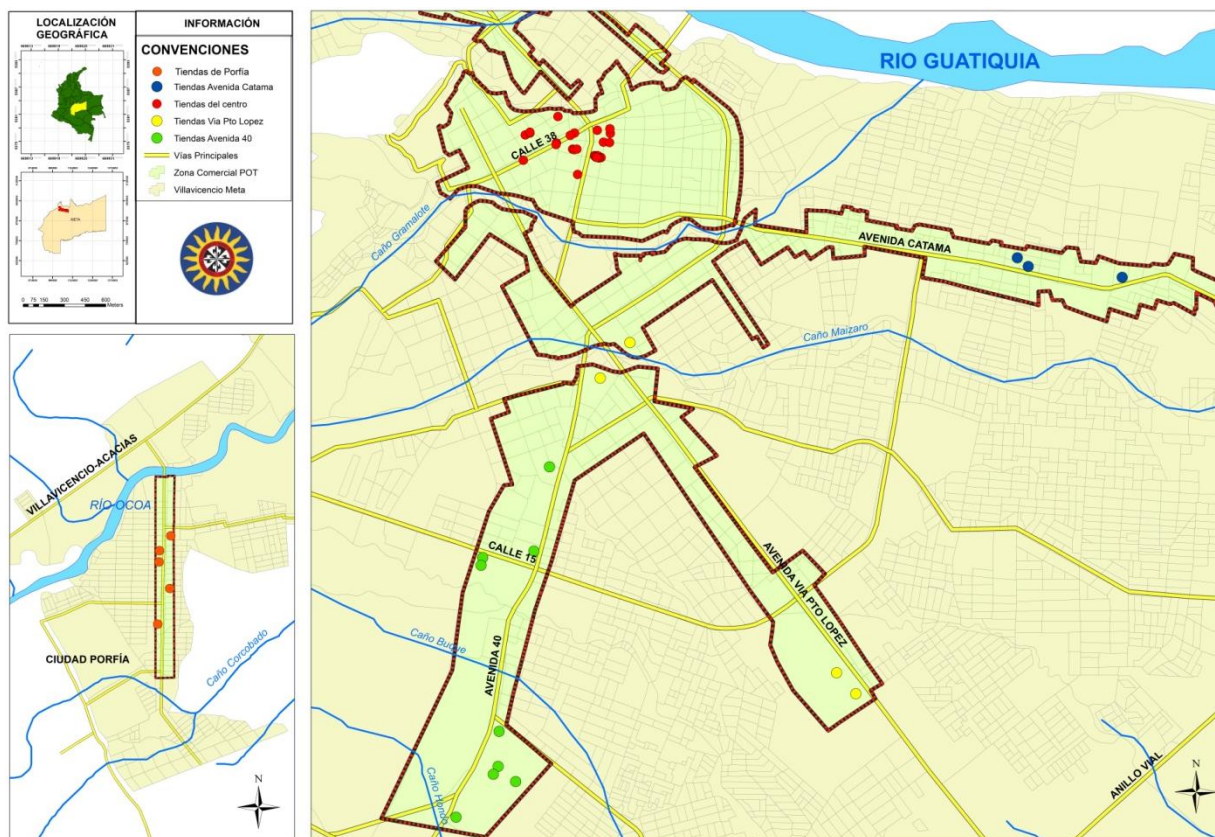


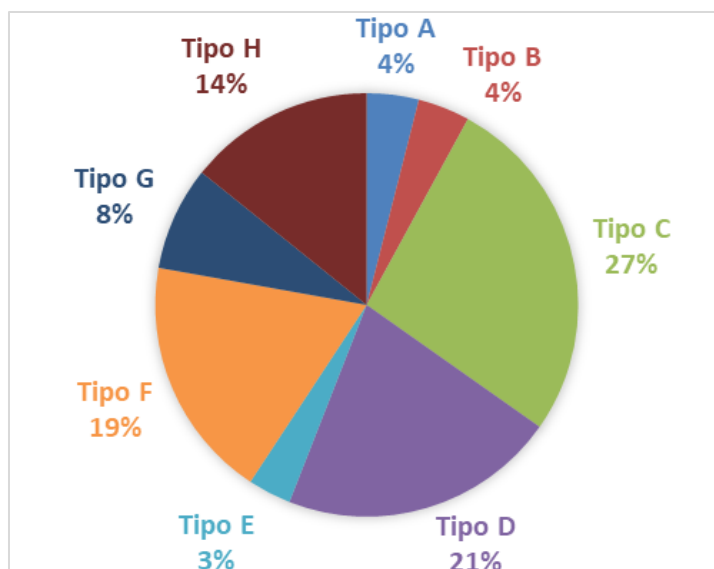
Figura 7. Establecimientos que comercializan recipientes plásticos dentro de las áreas clasificadas como "zonas comerciales" según el plan de ordenamiento territorial de Villavicencio. Adaptado de (Concejo Municipal de Villavicencio, 2015); por Alvarez & Novoa, 2020.

Tal como se observa en la figura 7, la mayor parte de los establecimientos que comercializan recipientes plásticos se encuentran en la zona centro de la ciudad, con un total de 27 establecimientos, seguido de la Avenida 40 (en donde se encuentran los principales almacenes de cadena) con 10 establecimientos, Ciudad porfía con 5 establecimientos, Vía Puerto López con 4 establecimientos y Avenida Catama con 3 establecimientos.

Es importante indicar que la presente investigación consideró el total de la población de establecimientos ubicados dentro de las zonas comerciales señaladas en el plan de ordenamiento territorial de Villavicencio, sin incluir aquellos ubicados fuera de dichas áreas, debido a que no representan una cantidad significativa en contraste con la totalidad de la población. Así mismo, los almacenes de cadena fueron tenidos en cuenta una sola vez dentro del estudio, a pesar de contar con diferentes puntos de venta dentro de la ciudad, en vista de que los productos comercializados no difieren significativamente entre cada almacén.

## **5.2. Identificación de recipientes plásticos**

Posteriormente, en cada uno de los establecimientos comerciales se realizó la identificación y clasificación de los recipientes plásticos, en donde se identificó un total de 302 recipientes diferentes, de los cuales la mayor parte pertenece al tipo C (polipropileno, transparente y libre de BPA) con un 27%, seguido del tipo D (polipropileno, transparente y no reporta ausencia de BPA) con un 21%, tal como se evidencia en la figura 8.



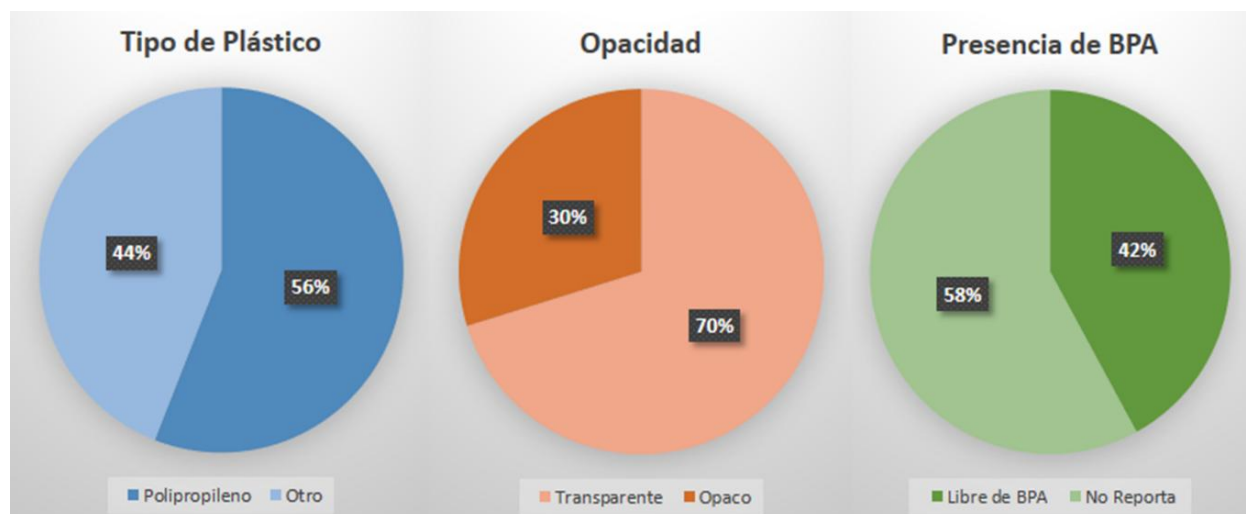
*Figura 8.* Distribución porcentual de los recipientes plásticos comercializados en Villavicencio según el tipo de recipiente. Por Alvarez & Novoa, 2020.

Tal como se muestra en la figura 9, en cuanto al tipo de plástico, la mayor parte de los recipientes (56%) son fabricados con polipropileno, frente al 44% que son fabricados con otro tipo de plástico o no lo enuncian, siendo esta proporción un indicador que se presume positivo de la seguridad de los recipientes plásticos comercializados, puesto que el polipropileno es el material más adecuado para la fabricación de recipientes destinados a estar en contacto con alimentos según la FDA (US Food and Drug Administration, 2012, p. 34).

Por otro lado, en cuanto a la opacidad, el 70% de los recipientes comercializados son transparentes, frente al 30% que son opacos, siendo esta proporción un indicador cuestionable puesto que, si bien se ha demostrado que la transparencia propicia la degradación del material plástico al permitir una mayor exposición del recipiente a rayos UV, los aditivos necesarios para brindar opacidad al material plástico pueden ser altamente perjudiciales para la salud humana (Bach et al., 2012, p. 579, 2013, p. 672; Escuela Colombiana de Ingeniería, 2007, p. 12; Jane Muncke, 2011, p. 120; Suhrhoff & Scholz, 2015, p. 85).

Finalmente, en cuanto a la presencia de BPA, tan solo el 42% de los recipientes comercializados reportan ser libres de BPA, frente al 58% de los recipientes que no lo hacen, siendo esta una cifra preocupante debido a la multitud de estudios que asocian al BPA con diversas enfermedades debido al carácter mutagénico y de disruptor endocrino de dicha sustancia (Cooper et al., 2011, pp. 943–944; Duck Soo et al., 2009, pp. 1285–1287; García et al., 2017, pp.

441–443; Mansilha et al., 2013, pp. 6012–6016; Nepalia et al., 2018, pp. 393–399; L. N. Vandenberg, 2014, pp. 426–429; Laura N. Vandenberg et al., 2007, pp. 139–173; Xue & Shu, 2013, pp. 929–932), además de ser prohibida en el territorio nacional para procesos de manufactura (Ministerio de Salud y Protección Social, 2012a, pp. 1–11).



*Figura 9.* Distribución porcentual de los recipientes plásticos comercializados en Villavicencio según las variables de estudio. Por Alvarez & Novoa, 2020.

En cuanto a la distribución de los precios de los recipientes, los resultados se organizaron de acuerdo a 4 intervalos de precios con un rango de \$5.000 tal como se evidencia en la figura 10. Así pues, en el intervalo más bajo (0 - \$4.900) se comercializan en su mayoría recipientes de los tipos F, H y D, recipientes que en su mayoría no poseen etiqueta o información alguna de la trazabilidad del producto, además de presentar algunos rayones, deformidades o imperfecciones en su estructura física. En cuanto al segundo intervalo (\$5.000 - \$9.900) se comercializan grandes cantidades de los recipientes tipo D y C, disminuyendo considerablemente la oferta de los recipientes tipo F y H. Así mismo, en el tercer intervalo (\$10.000 - \$14.900) la oferta de recipientes plásticos tipo C se mantiene elevada en comparación con los demás tipos de recipientes cuya oferta disminuye. Finalmente, en cuanto al cuarto intervalo (\$15.000 - \$20.000) se observa que, aunque la cantidad comercializada de recipientes tipo C disminuyó, aún se mantiene elevada en comparación con los otros tipos, siendo estos recipientes únicamente comercializados en almacenes de cadena y centros comerciales.

Del mismo modo, se observa una tendencia a la disminución de la cantidad de recipientes comercializados conforme aumenta el intervalo de precio, encontrándose 113 recipientes

plásticos en el primer intervalo, 108 en el segundo intervalo, 52 en el tercer intervalo y 29 en el último intervalo.

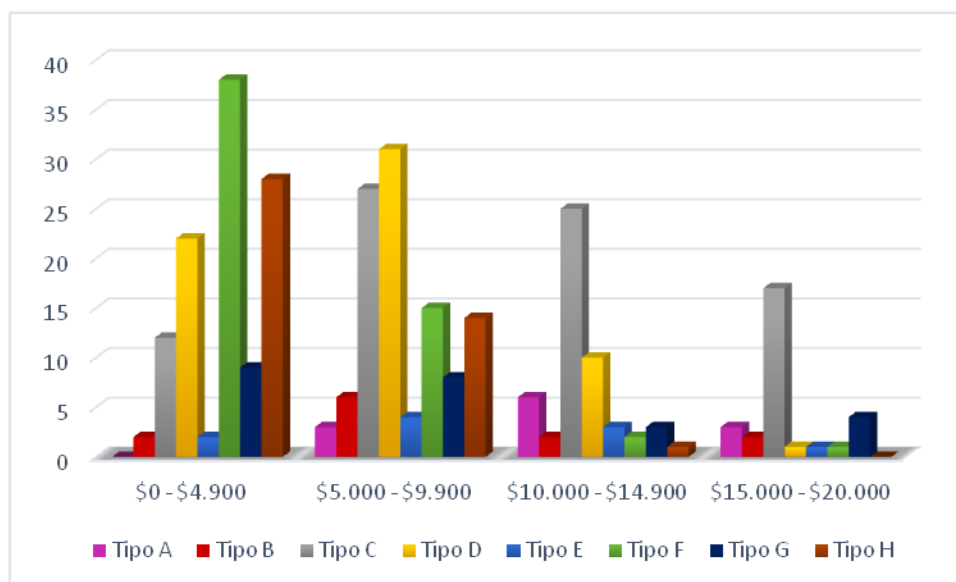


Figura 10. Distribución de recipientes plásticos comercializados en Villavicencio por rango de precio. Por Alvarez & Novoa, 2020.

### 5.3. Test de mutagenicidad de Ames

En las tablas 5 y 6 se presentan los resultados del índice de mutagenicidad por tipo de recipiente para 5 y 20 calentamientos respectivamente.

Tabla 5. Resultados del índice de mutagenicidad por tipo de recipiente para 5 calentamientos.

Tipo de recipiente	Día de análisis de muestras								Media	Interpretación
	1	2	3	4	5	6	7	8		
A	0,94	0,83	0,81	-	0,94	0,84	1,01	0,95	0,91	NM
B	1,10	1,08	1,09	0,99	1,17	1,04	-	1,12	1,08	NM
C	0,80	0,64	0,78	0,73	0,68	0,78	0,77	-	0,74	NM
D	0,91	-	0,85	0,74	0,86	0,84	0,90	0,88	0,85	NM
E	1,00	0,86	0,98	1,02	-	0,96	1,08	1,05	0,99	NM
F	1,11	1,25	1,19	1,17	1,16	-	1,19	1,31	1,20	NM
G	0,76	0,64	-	0,72	0,85	0,84	0,89	0,86	0,79	NM
H	-	1,13	1,11	1,12	1,23	1,06	1,20	1,06	1,13	NM

Nota: NM: No mutagénico. Índice de mutagenicidad según el tipo de recipiente (tratamiento) y día de análisis de las muestras de agua (bloque) después de 5 calentamientos. Adaptado de "Software IBM SPSS Statistics"; Por Alvarez & Novoa, 2020.

Tabla 6. Resultados del índice de mutagenicidad por tipo de recipiente para 20 calentamientos.

Tipo de recipiente	Día de análisis de muestras								Media	Interpretación
	1	2	3	4	5	6	7	8		
A	1,18	1,14	1,14	-	1,27	1,14	1,27	1,15	1,18	NM
B	1,44	1,53	1,38	1,38	1,40	1,40	-	1,40	1,42	NM
C	0,92	0,81	0,97	0,92	0,91	0,96	0,97	-	0,92	NM
D	1,14	-	1,20	1,00	1,15	1,16	1,19	1,12	1,14	NM
E	1,35	1,40	1,36	1,30	-	1,29	1,37	1,22	1,33	NM
F	1,40	1,54	1,51	1,50	1,58	-	1,56	1,54	1,52	LM
G	1,13	1,05	-	1,99	1,10	1,11	1,11	1,08	1,08	NM
H	-	1,54	1,50	1,52	1,54	1,42	1,53	1,45	1,50	LM

*Nota:* NM: No mutagénico. LM: Ligeramente mutagénico. Índice de mutagenicidad según el tipo de recipiente (tratamiento) y día de análisis de las muestras de agua (bloque) después de 20 calentamientos. Adaptado de "Software IBM SPSS Statistics"; Por Alvarez & Novoa, 2020.

Tal como se observa en las tablas 5 y 6, los recipientes tipo H (Plástico otro, transparente y no reporta ausencia de BPA) y tipo F (Plástico otro, opaco y no reporta ausencia de BPA) son los que presentaron un índice de mutagenicidad medio más alto en las dos condiciones de calentamiento (5 y 20 calentamientos) en comparación con el resto de los recipientes. Así pues, las muestras extraídas de ambos recipientes resultaron "No mutagénicas" (NM) para la primera condición y "Ligeramente mutagénicas" (LM) para la segunda. Por otro lado, los recipientes con los índices de mutagenicidad medios más bajos fueron el tipo C (Polipropileno, transparente y libre de BPA) y el tipo G (plástico otro, transparente y libre de BPA) en las dos condiciones de calentamiento, siendo "No mutagénicas" (NM) en ambos casos. Así mismo, se destaca que los resultados obtenidos para el índice de mutagenicidad medio para 20 calentamientos (tabla 6) aumentaron entre 0,18 y 0,37 en comparación con los resultados obtenidos para 5 calentamientos (tabla 5).

#### 5.4. Análisis estadístico

Partiendo de la necesidad de determinar la influencia del número de calentamientos en el índice de mutagenicidad obtenido en cada muestra, se aplicó la prueba t de Student, buscando diferencias significativas entre los índices obtenidos en ambos calentamientos y así comprobar la influencia de la temperatura y el desgaste de los revestimientos superficiales de los recipientes en el índice de mutagenicidad obtenido. Los resultados de la prueba t de Student se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Prueba t de Student del índice de mutagenicidad por número de calentamientos.

Variables de estudio		Estadística de grupo			Prueba t de Student	
		N	Media	Desviación estándar	Diferencia de medias	p
Número de calentamientos	5 calentamientos	56	0,963	0,169	0,299	0,000
	20 calentamientos	56	1,262	0,209		

*Nota:* p: Significancia estadística. Prueba t de Student del índice de mutagenicidad de muestras de agua por número de calentamientos. Adaptado de "Software IBM SPSS Statistics"; Por Alvarez & Novoa, 2020.

Como se evidencia en la tabla 7, se obtuvo una diferencia de medias de 0,299 y un nivel de significancia  $p < 0,05$ , lo que denota que existen diferencias significativas de los resultados del índice de mutagenicidad entre ambas condiciones de calentamiento. Por lo anterior, como respuesta a la primera parte de la pregunta problema referente a la variación del índice de mutagenicidad en función del uso del recipiente (expresado por el número de calentamientos aplicados), se comprueba que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los índices de mutagenicidad obtenidos de las muestras de cada condición de calentamiento, en donde dicho índice aumenta en función del aumento del número de calentamientos de recipiente. Así pues, es posible afirmar que el incremento en el índice de mutagenicidad medio entre las dos condiciones de calentamiento, está fuertemente relacionado con el desgaste del material al que se exponen los recipientes, con el cual se van perdiendo los revestimientos superficiales que aseguran su calidad y seguridad, puesto que al someter los recipientes plásticos a un aumento de temperatura prologado o estrés mecánico, puede generar migración de los compuestos utilizados para su fabricación (Fasano, Bono-Blay, Cirillo, Montuori, & Lacorte, 2012, p. 132; Nepalía et al., 2018, p. 391).

Así mismo, se obtuvieron valores medios del índice de mutagenicidad de 0,963 y 1,262 para 5 y 20 calentamientos respectivamente, valores que son considerados como "No mutagénicos" dentro de la escala de evaluación del test Ames; sin embargo, surge la necesidad de analizar cada condición de calentamiento por separado para determinar si existen diferencias entre índice de mutagenicidad obtenido para cada tipo de recipiente.

Posteriormente, teniendo en cuenta la normalidad de los datos y los requerimientos específicos del diseño experimental utilizado, se realizó un análisis de varianza ANOVA para determinar diferencias significativas en los índices de mutagenicidad obtenidos, partiendo de la

hipótesis nula ( $H_0$ ) de que las medias del índice de mutagenicidad son iguales, en contraste con la hipótesis alternativa ( $H_1$ ) de que al menos una de las medias difiere de las demás. Por consiguiente, tal como se observa en las tablas 8 y 9, para ambas condiciones de calentamiento se obtuvo un nivel de significancia  $p < 0,05$ , rechazando la igualdad de medias de la hipótesis nula, lo que denota diferencias significativas en las medias del índice de mutagenicidad de los 8 tratamientos (tipos de recipientes), pudiendo inferir así que las características inherentes a cada tipo de recipiente influyen significativamente en el índice de mutagenicidad obtenido y, por ende, en la calidad y seguridad de los mismos.

Tabla 8. ANOVA del índice de mutagenicidad para 5 calentamientos.

ANOVA					
Índice de mutagenicidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	p
Entre grupos	1,343	7	0,192	40,388	0,000
Dentro de grupos	0,228	48	0,005		
Total	1,570	55			

*Nota:* p: Significancia estadística. Análisis de varianza ANOVA del índice de mutagenicidad de muestras de agua después de 5 calentamientos. Adaptado de "Software IBM SPSS Statistics"; Por Alvarez & Novoa, 2020.

Tabla 9. ANOVA del índice de mutagenicidad para 20 calentamientos.

ANOVA					
Índice de mutagenicidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	p
Entre grupos	2,251	7	0,322	100,514	0,000
Dentro de grupos	0,154	48	0,003		
Total	2,405	55			

*Nota:* p: Significancia estadística. Análisis de varianza ANOVA del índice de mutagenicidad de muestras de agua después de 20 calentamientos. Adaptado de "Software IBM SPSS Statistics"; Por Alvarez & Novoa, 2020.

Seguidamente, y tras determinar que existen diferencias significativas en los datos, se realiza la prueba HSD de Tukey para comparar las medias de los índices de mutagenicidad entre tratamientos, agrupando los recipientes con índices de mutagenicidad estadísticamente similares y ordenándolos ascendentemente en subconjuntos. Los resultados de la prueba de Tukey se presentan en las tablas 10 y 11.

Tabla 10. Prueba HSD de Tukey del índice de mutagenicidad para 5 calentamientos.

		HSD Tukey <sup>a</sup>				
Tipo Recipiente	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
C	7	0,7411				
G	7	0,7947	0,7947			
D	7	0,8537	0,8537			
A	7		0,9054	0,9054		
E	7			0,9938	0,9938	
B	7				1,0846	1,0846
H	7					1,1326
F	7					1,1963
<i>p</i>		0,066	0,074	0,265	0,236	0,069

Nota: *p*: Significancia estadística. Prueba HSD de Tukey del índice de mutagenicidad de muestras de agua después de 5 calentamientos. Adaptado de "Software IBM SPSS Statistics"; Por Alvarez & Novoa, 2020.

Tabla 11. Prueba HSD de Tukey del índice de mutagenicidad para 20 calentamientos.

		HSD Tukey <sup>a</sup>					
Tipo Recipiente	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
C	7	0,9234					
G	7		1,0804				
D	7		1,1369	1,1369			
A	7			1,1849			
E	7				1,3278		
B	7				1,4182	1,4182	
H	7					1,5020	1,5020
F	7						1,5191
<i>p</i>		1,000	0,577	0,756	0,077	0,126	0,999

Nota: *p*: Significancia estadística. Prueba HSD de Tukey del índice de mutagenicidad de muestras de agua después de 5 calentamientos. Adaptado de "Software IBM SPSS Statistics"; Por Alvarez & Novoa, 2020.

Al aplicar la prueba HSD de Tukey a los resultados del índice de mutagenicidad de los recipientes para 5 calentamientos, se obtuvo un total de 5 subconjuntos de las medias del índice de mutagenicidad de cada recipiente, agrupando las medias que no poseen diferencias estadísticamente significativas. Así pues, tal como se observa en la tabla 10, en el primer subconjunto se encuentran agrupados los recipientes con el índice de mutagenicidad medio más

bajo (recipientes C, D y G) y cuyas medias no poseen una diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ), siendo estos tres tipos de recipientes similares en cuanto a calidad y seguridad para el consumidor. Así mismo, en los subconjuntos 2, 3 y 4 se encuentran los recipientes con un índice de mutagenicidad que puede ser considerado como intermedio, entre los que se encuentran los tipos A y E. Finalmente, en el quinto subconjunto se encuentran agrupados los recipientes con el índice de mutagenicidad medio más alto (recipientes B, F y H) y cuyas medias no poseen una diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ), lo que indica la posibilidad de que el uso de dichos recipientes pueda ser perjudicial a largo plazo.

Esta misma tendencia se observa en los resultados del índice de mutagenicidad para 20 calentamientos (tabla 11), en donde los resultados se encuentran agrupados en 6 subconjuntos, haciendo especial énfasis en el primero de ellos en el que solamente se encuentra el tipo de recipiente C y el último subconjunto en el que se encuentran los recipientes F y H ( $p > 0,05$ ). Así pues, la prueba de tukey arroja los primeros indicios de la seguridad de los recipientes, al ordenarlos estadísticamente de acuerdo al índice de mutagenicidad medio obtenido, permitiendo así afirmar que, en términos generales, el recipiente tipo C (Polipropileno, transparente y libre de BPA) es el más adecuado para estar en contacto con alimentos y bebidas, seguido del recipiente tipo G (Plástico otro, transparente y libre de BPA), según los resultados del índice de mutagenicidad obtenido en ambas condiciones de calentamiento. Así mismo, los recipientes tipo F (Plástico otro, opaco y no reporta ausencia de BPA) y H (plástico otro, transparente y no reporta ausencia de BPA) pueden ser señalados como los menos recomendados para el contacto con alimentos y bebidas, debido a los elevados índices de mutagenicidad obtenidos, especialmente en la segunda condición de calentamiento.

Finalmente, y basado en las características físicas asignadas a cada tipo de recipiente (Tabla 4), se realizó la prueba t de Student para comparar las medias del índice de mutagenicidad de cada variable, determinando así las características físicas más favorables de los recipientes en cuanto a calidad y seguridad para el consumidor. Los resultados de la prueba t de Student se presentan en las tablas 12 y 13.

Tabla 12. Prueba *t* de Student del índice de mutagenicidad por variable para 5 calentamientos.

Variables de estudio		Estadística de grupo			Prueba <i>t</i> de Student	
		N	Media	Desviación estándar	Diferencia de medias	<i>p</i>
Tipo de plástico	Polipropileno	28	0,892	0,141	0,134	0,002
	Otro	28	1,026	0,170		
Opacidad	Opaco	28	1,045	0,128	0,165	0,000
	Transparente	28	0,880	0,166		
Presencia de BPA	Libre de BPA	28	0,858	0,123	0,209	0,000
	No reporta	28	1,066	0,143		

*Nota:* *p*: Significancia estadística. Prueba *t* de Student del índice de mutagenicidad de muestras de agua por variable después de 5 calentamientos. Adaptado de "Software IBM SPSS Statistics"; Por Alvarez & Novoa, 2020.

Tabla 13. Prueba *t* de Student del índice de mutagenicidad por variable para 20 calentamientos.

Variables de estudio		Estadística de grupo			Prueba <i>t</i> de Student	
		N	Media	Desviación estándar	Diferencia de medias	<i>p</i>
Tipo de plástico	Polipropileno	28	1,166	0,188	0,191	0,000
	Otro	28	1,357	0,186		
Opacidad	Opaco	28	1,362	0,137	0,202	0,000
	Transparente	28	1,160	0,221		
Presencia de BPA	Libre de BPA	28	1,129	0,159	0,265	0,000
	No reporta	28	1,394	0,165		

*Nota:* *p*: Significancia estadística. Prueba *t* de Student del índice de mutagenicidad de muestras de agua por variable después de 20 calentamientos. Adaptado de "Software IBM SPSS Statistics"; Por Alvarez & Novoa, 2020.

Tal como se observa en las tablas 12 y 13, los recipientes fabricados con el tipo de plástico polipropileno obtuvieron un índice de mutagenicidad medio más bajo en comparación con aquellos fabricados con otros tipos de plásticos, con un nivel de significancia  $p < 0,05$  para ambas condiciones de calentamiento. Así mismo, en cuanto a la opacidad, los recipientes transparentes obtuvieron un índice de mutagenicidad medio menor en comparación con los recipientes opacos, con un nivel de significancia  $p < 0,05$  para ambas condiciones de calentamiento. Finalmente, en cuanto a la presencia o ausencia de BPA según la información de la etiqueta, los recipientes plásticos que enunciaban ser libres de BPA obtuvieron un menor índice de mutagenicidad medio en comparación con aquellos que no lo enunciaban o no poseían información alguna en su etiqueta, con un nivel de significancia  $p < 0,05$  para ambas condiciones de calentamiento.

Así mismo, se observa un aumento en la diferencia de medias de cada variable entre los resultados de las tablas 12 y 13, permitiendo inferir que el desgaste del material, aumenta la dependencia del índice de mutagenicidad medio obtenido hacia las características físicas propias de cada recipiente. Por lo anterior, la elección del consumidor frente a las características físicas del recipiente toma mayor importancia conforme aumenta el uso del recipiente.

Así pues, como respuesta a la segunda parte de la pregunta problema referente a la variación del índice de mutagenicidad en función del tipo de recipiente, se comprueba que existen diferencias significativas entre los índices de mutagenicidad obtenidos de los diferentes tipos de recipientes, en donde las características físicas (tipo de plástico, opacidad y presencia de BPA) inherentes a cada tipo juegan un papel determinante en el índice de mutagenicidad obtenido y por ende en la seguridad y calidad del recipiente.

## Discusión

---

Los resultados obtenidos a partir de la presente investigación, permitieron determinar el índice de mutagenicidad de muestras de agua en contacto con diferentes tipos de recipientes plásticos, evidenciando cuáles resultan más adecuados para el almacenamiento, calentamiento y transporte de alimentos y bebidas, analizando las características físicas y seleccionando los atributos más recomendables de dichos recipientes; lo anterior en el marco de los objetivos planteados y la problemática general del desconocimiento de la población en cuanto al uso y seguridad de los recipientes plásticos.

Así mismo, dichos resultados pueden ser fácilmente contrastados con otras investigaciones en las que se ha utilizado el test Ames, esencialmente porque los valores del índice de mutagenicidad (IM) obtenidos están comprendidos dentro de la escala establecida para la interpretación de resultados del test Ames (MT: mutagénico ( $IM \geq 2$ ), LM: ligeramente mutagénico ( $1,5 \leq IM < 2$ ) y NM: no mutagénico ( $IM < 1,5$ )) (Ames et al., 1975). Particularmente, en términos del uso del test Ames para evaluar mutagenicidad en materiales plásticos, los índices de mutagenicidad medios obtenidos de las muestras de agua analizadas en la presente investigación, son significativamente más bajos en comparación con los valores obtenidos por (Nepalia et al., 2018) al evaluar la mutagenicidad en muestras de agua en contacto con materiales plásticos, donde se obtuvieron índices de mutagenicidad superiores a 2 en más del 40% de las muestras; así como también los resultados obtenidos por (Okunola et al., 2019) al evaluar mutagenicidad de los lixiviados crudos y lixiviados simulados de un vertedero de materiales plásticos, donde se obtuvieron índices de mutagenicidad superiores a 2 en todos los casos.

Es importante destacar que, cada fase del protocolo de procesamiento de la muestra influye en la exactitud y precisión de la misma; por tanto, los bajos índices de mutagenicidad obtenidos se podrían robustecer al emplear una técnica de obtención del extracto de mayor sensibilidad, puesto que la aplicada responde a disponibilidad de materiales, equipos y reactivos ofrecidos por los laboratorios de la Universidad Santo Tomás sede Villavicencio. De la misma manera, se destaca que en condiciones controladas de calentamiento en horno microondas y lavado de

material, se reportan estos bajos índices, deduciendo que la manipulación real de éstos recipientes por parte de la comunidad, generaría un desgaste superior relacionado directamente con la migración de sustancias mutagénicas a los alimentos.

Por otra parte, la presente investigación permitió demostrar que las características propias de cada recipiente influyen significativamente en el índice de mutagenicidad obtenido y, por ende, en la calidad y seguridad de los recipientes para los consumidores. Así pues, partiendo de la tendencia observada en las tablas 12 y 13, los recipientes plásticos más adecuados para estar en contacto con alimentos y bebidas, en términos del índice de mutagenicidad obtenido, son aquellos fabricados en polipropileno, transparentes o que enuncian en su etiqueta o rotulado que son libres de BPA. Sin embargo, lo anterior no significa que dichos recipientes no representen un riesgo para la salud humana a largo plazo, pues también se ha documentado evidencia científica en donde se asocian dichas características con alteraciones en la salud humana, sino que representan la opción menos perjudicial para la salud del consumidor.

Particularmente, las muestras provenientes de recipientes fabricados con polipropileno arrojaron un índice de mutagenicidad estadísticamente significativo menor que las muestras provenientes de recipientes fabricados con otros tipos de plásticos. Este resultado es concordante con las regulaciones de la FDA, la cual establece al polipropileno como el material más adecuado para la fabricación de recipientes destinados a estar en contacto con alimentos y bebidas (US Food and Drug Administration, 2012, p. 34); sin embargo, también existe evidencia científica de la migración de sustancias químicas tóxicas provenientes de los revestimientos de polipropileno hacia simuladores de alimento al exponerlos a diferentes temperaturas (Chang et al., 2018).

Por otro lado, las muestras obtenidas de recipientes opacos resultaron en un índice de mutagenicidad estadísticamente mayor que las muestras obtenidas de recipientes transparentes, esencialmente por la posible migración de las sustancias químicas y aditivos utilizados para brindar opacidad al material plástico, los cuales se han documentado como altamente perjudiciales para salud humana (Bach et al., 2012); sin embargo, también se han generado estudios en los que se ha relacionado la transparencia de los materiales para contacto con alimentos, con la degradación del material debido a la exposición del recipiente a rayos UV (Bach et al., 2012; Jane Muncke, 2011; Suhrhoff & Scholz, 2015).

Por lo anterior, la elección del tipo de recipiente a utilizar para el almacenamiento, calentamiento y transporte de alimentos toma un papel fundamental en la salud de la población; sin embargo, existen factores externos que pueden influenciar dicha elección, tales como el precio o la estética de los recipientes plásticos.

Particularmente en cuanto al precio, según la investigación realizada por (Muñoz & Santos, 2019), el principal criterio de compra de los habitantes de la ciudad a la hora de adquirir un recipiente plástico es el precio, situación que resulta poco favorable debido a que los recipientes más económicos (figura 10) y más accesibles al consumidor, son los tipos F y H, catalogados por el presente estudio como los menos seguros para estar en contacto con alimentos en términos del índice de mutagenicidad obtenido. Sumado a esto, existen establecimientos que comercializan recipientes plásticos ubicados fuera de las zonas comerciales establecidas por el Plan de Ordenamiento Territorial y que, por lo tanto, no fueron contempladas por el presente estudio, lo cual podría incrementar considerablemente el porcentaje de recipientes tipo F y H comercializados en la ciudad y, de tal forma, aumentar la exposición de la población de Villavicencio a la posible migración de sustancias mutagénicas provenientes del plástico.

## Conclusiones

---

Se encontraron índices de mutagenicidad significativamente más elevados en las muestras de agua de la segunda condición de calentamiento para todos los tratamientos, en donde el aumento oscilaba entre 0,18 y 0,37 en comparación con los resultados de la primera condición de calentamiento, demostrando así la influencia de la temperatura en la liberación y migración de sustancias desde los revestimientos superficiales del recipiente.

Las muestras de agua contenidas en los recipientes de los tipos F (plástico otro, opaco y no reporta ausencia de BPA) y tipo H (plástico otro, transparente y no reporta ausencia de BPA) demostraron un índice de mutagenicidad estadísticamente superior a los demás tipos de recipientes en ambas condiciones de calentamiento, alcanzando valores clasificados como "ligeramente mutagénicos" para la segunda condición de calentamiento. Así mismo, las muestras de agua contenida en los recipientes tipo C (Polipropileno, transparente y libre de BPA) y G (Plástico otro, transparente y libre de BPA) demostraron un índice de mutagenicidad inferior a los demás tipos de recipientes y son considerados como los más adecuados para el contacto con alimentos y bebidas.

En cuanto a las variables de estudio, se encontró que las muestras contenidas en recipientes fabricados con polipropileno, transparentes o que enunciaban ser libres de BPA, arrojaron un índice de mutagenicidad medio inferior a sus contrapartes en ambas condiciones de calentamiento. Así mismo, se presentó un aumento significativo en la diferencia de medias de cada variable entre las dos condiciones de calentamiento, por lo que se concluye que al aumentar el desgaste del material, aumenta la dependencia del índice de mutagenicidad medio obtenido hacia las características físicas propias de cada recipiente.

Si bien ninguno de los índices de mutagenicidad obtenidos arrojó valores superiores a 2 para ser considerados "mutagénicos", se recomienda desincentivar el uso de este tipo de recipientes para el transporte, calentamiento y almacenamiento de alimentos y bebidas, debido a la evidencia científica que asocia el uso de estos recipientes con diferentes afectaciones en la salud humana, así como las implicaciones ambientales que acarrea una inadecuada disposición final de los

mismos y de tal forma, incentivar la implementación de recipientes elaborados a partir de vidrio u otro tipo de material inocuo, cuyo uso genere un menor impacto a la salud humana y el medio ambiente.

Tan solo el 35% de los recipientes ofertados en la ciudad, poseen las características consideradas por el presente estudio como aptas para el transporte, almacenamiento y calentamiento de alimentos y bebidas, razón por la cual se hace necesario establecer políticas públicas encaminadas a ejercer control en el tipo de mercancía comercializada en la ciudad, en aras de evitar posibles repercusiones en la salud de la población.

La información recolectada en la presente investigación y los resultados obtenidos a partir de la aplicación del test Ames arrojan un primer diagnóstico de la situación a la que se enfrenta la población de Villavicencio, sirviendo como insumo inicial en la formulación e implementación de medidas por parte de las autoridades competentes para hacer frente a una problemática cuyos efectos son cada día más evidentes.

## Recomendaciones

---

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación, se recomienda aplicar métodos de extracción y concentración de la muestra de mayor sensibilidad, con el fin de incrementar la precisión para la obtención de los índices de mutagenicidad.

Así mismo, en caso de contar con los recursos necesarios, aunque se han realizado diversos estudios empleando una sola cepa bacteriana, la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés), recomienda emplear cepas diferentes de *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA97, TA97a, TA1538, TA102 y otros), así como *Escherichia coli* (WP2(uvrA) y otros), principalmente debido a la sensibilidad que presenta cada cepa, para determinar aquellas que se ajusten mejor a las muestras que se pretenden analizar. De igual forma, el mantenimiento de la cepa es prioritario, para la presente investigación se conservaron con glicerol (20%) como crioprotector, no obstante, se recomienda la optimización de la técnica que permita conservar la viabilidad y condiciones genéticas.

Del mismo modo, el presente estudio aporta información base que permite detectar la mutagenicidad de una mezcla de sustancias, algunas de estas no son mutagénicas hasta que son activadas enzimáticamente por el metabolismo de mamíferos; por tanto, y con el ánimo de robustecer los resultados obtenidos, se recomienda incluir en la prueba el uso del activador enzimático “fracción microsomal de hígado de rata S9”, empleado para imitar el metabolismo de mamíferos, induciendo una transformación enzimática que permite que se una al ADN y por ende provoque mutaciones.

Por otro lado, se sugiere incluir un mayor número de calentamientos en horno microondas y otros métodos de calentamiento y procesos de desgaste (uso de diferentes detergentes, alcoholes, entre otros), que ocasionen mayor degradación de los revestimientos superficiales de los recipientes plásticos, presumiendo que al aumentar la degradabilidad del material se incrementará considerablemente el índice de mutagenicidad.

Igualmente, se recomienda identificar los compuestos químicos migrados presentes en las muestras extraídas, así como las cantidades puntuales de los mismos, y de tal forma, identificar

la sustancia específica que está generando la acción mutagénica y la dosis que pueden estar siendo ingerida por la población de Villavicencio.

Se recomienda ampliar este tipo de investigaciones hacia otros elementos de uso cotidiano destinados a estar en contacto con alimentos y bebidas, ya sean estos fabricados a partir de plástico u otros materiales, con el fin de garantizar la seguridad e inocuidad de los productos que llegan a manos de los consumidores en la ciudad de Villavicencio. Finalmente, se sugiere informar a las autoridades competentes los resultados obtenidos, con el fin de divulgar y sentar precedentes científicos necesarios para fortalecer los controles en la comercialización y uso de productos plásticos, que representan un riesgo para la salud pública.

### Referencias bibliográficas

---

- American Society for Testing and Materials. (2013). *Standard practice for coding plastic manufactured articles for resin identification*.  
<https://www.astm.org/Standards/D7611.htm>
- Ames, B., Mccann, J., & Yamasaki, E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research*, 31, 347–364. Retrieved from  
[https://www.riksgalden.se/templates/RGK\\_Templates/Published/Published\\_Startpage\\_\\_\\_1307.aspx](https://www.riksgalden.se/templates/RGK_Templates/Published/Published_Startpage___1307.aspx)
- Arvanitoyannis, I. S., & Bosnea, L. (2004). Migration of Substances from Food Packaging Materials to Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(2), 63–76.  
<https://doi.org/10.1080/10408690490424621>
- Aßmann, N., Emmrich, M., Kampf, G., & Kaiser, M. (1997). Genotoxic activity of important nitrobenzenes and nitroanilines in the Ames test and their structure-activity relationship. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 395(2–3), 139–144. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(97\)00158-7](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(97)00158-7)
- Bach, C., Dauchy, X., Chagnon, M. C., & Etienne, S. (2012). Chemical compounds and toxicological assessments of drinking water stored in polyethylene terephthalate (PET) bottles: A source of controversy reviewed. *Water Research*, 46(3), 571–583.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.062>
- Bach, C., Dauchy, X., Severin, I., Munoz, J. F., Etienne, S., & Chagnon, M. C. (2013). Effect of temperature on the release of intentionally and non-intentionally added substances from polyethylene terephthalate (PET) bottles into water: Chemical analysis and potential toxicity. *Food Chemistry*, 139(1–4), 672–680.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.046>
- Baldomero, M., Santos, D., Escudero, M., & Escudero, J. (2005). *Tecnología: Programación didáctica y 15 unidades didácticas de 3º de ESO* (Primera ed). Sevilla: Editorial MAD, S.L.
- Ballesteros, A., Rubio, S., & Pérez, D. (2009). Analytical methods for the determination of bisphenol A in food. *Journal of Chromatography A*, 1216(3), 449–469.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.06.037>

- Barbosa, C., Muskus, C., Orozco, L., & Pabón, A. (2017). Efecto mutagénico y genotóxico , y expresión de los genes Rad51C , Xiap , P53 y Nrf2 inducidos por extractos antipalúdicos de plantas recolectadas en el Vaupés medio , Colombia. *Biomédica*, 37(3), 378–379. <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v37n3/0120-4157-bio-37-03-00378.pdf>
- Barreto, M., Castillo, M., & Retamal, P. (2016). Salmonella enterica: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. *Infectología Al Día*, 33(5), 547–557. Retrieved from [www.sochinf.cl](http://www.sochinf.cl)
- Beleño, R., Quijano, A., & Melendez, I. (2013). Actividad mutagénica y genotóxica del material particulado PM 2,5 en Cúcuta, Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 18, 3731–3737. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-02682013000400018&script=sci\\_abstract&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-02682013000400018&script=sci_abstract&tlng=es)
- Cámara de Comercio de Villavicencio. (2017). *Análisis de factores que afectan el desempeño económico del comercio en el centro de Villavicencio*. CCV. Villavicencio
- Chang, Y., Kang, K., Park, S. J., Choi, J. C., Kim, M. K., & Han, J. (2018). *Experimental and theoretical study of polypropylene: Antioxidant migration with different food simulants and temperatures*. *Journal of Food Engineering* (Vol. 244). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.09.028>
- Chung, K. T., Kirkovsky, L., Kirkovsky, A., & Purcell, W. (1997). Review of mutagenicity of monocyclic aromatic amines: Quantitative structure-activity relationships. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 387, 1–16. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(97\)00019-7](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(97)00019-7)
- Colombiana de salud S.A. (2004). *Protocolo de Limpieza y Desinfección de material de vidrio de laboratorio clínico*. Retrieved from [http://www.colombianadesalud.org.co/LABORATORIO\\_CLINICO/POES](http://www.colombianadesalud.org.co/LABORATORIO_CLINICO/POES) PROTOCOLOPO DE LIMPIEZA Y DESINFECCION DE MATERIAL DE VIDRIO.pdf
- Concejo Municipal de Villavicencio. Acuerdo 287 de 2015 (2015).
- Cooper, J. E., Kendig, E. L., & Belcher, S. M. (2011). Assessment of bisphenol A released from reusable plastic, aluminium and stainless steel water bottles. *Chemosphere*, 85(6), 943–947. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.060>
- Dalgleish, T., Williams, J. M. G. ., Golden, A.-M. J., Perkins, N., Barrett, L. F., Barnard, P. J., ... Watkins, E. (2008). *Plastic packaging. Interactions with food and pharmaceuticals*. (O. Piringer & A. Baner, Eds.), *Journal of Experimental Psychology: General* (2nd ed., Vol. 136). WILEY-VCH.

- De Mendiburu, F. (2016). *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research* (version 1.2-4).  
[https://www.researchgate.net/publication/303256192\\_Agricolae\\_Statistical\\_Procedures\\_for\\_Agricultural\\_Research](https://www.researchgate.net/publication/303256192_Agricolae_Statistical_Procedures_for_Agricultural_Research)
- Duck Soo, L., Seung Jun, K., Kyu Bong, K., Hyung Sik, K., & Byung Mu, L. (2009). Potential risk of bisphenol a migration from polycarbonate containers after heating, boiling, and microwaving. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 72(21–22), 1285–1291. <https://doi.org/10.1080/15287390903212329>
- Enríquez, A. (2017). *Identificación de los factores explicativos de la presencia de los disruptores endocrinos en el agua embotellada en Bogotá*. Tesis de maestría. Pontificia Universidad Javeriana. <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/40186>
- Erler, C., & Novak, J. (2010). Bisphenol a exposure: Human risk and health policy. *Journal of Pediatric Nursing*, 25(5), 400–407. <https://doi.org/10.1016/j.pedn.2009.05.006>
- Escuela Colombiana de Ingeniería. (2007). *Plásticos: Curso de Procesos de Manufactura*.
- European Chemical Agency (ECHA). (2018). Bisfenol A. Retrieved October 27, 2018, from <https://echa.europa.eu/es/hot-topics/bisphenol-a>
- Fasano, E., Bono-Blay, F., Cirillo, T., Montuori, P., & Lacorte, S. (2012). Migration of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and di(2-ethylhexyl)adipate from food packaging. *Food Control*, 27(1), 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.03.005>
- Gallardo, A., & Mallo, P. (1864). Revista médico-quirúrgica. *Higiene*, 1(17), 293–312.
- García, M., Cipa, M., Rodríguez, R., Rivas, A., Olea, F., Vílchez, J., & Zafra, A. (2017). Determination of bisphenols with estrogenic activity in plastic packaged baby food samples using solid-liquid extraction and clean-up with dispersive sorbents followed by gas chromatography tandem mass spectrometry analysis. *Talanta*, 178, 441–448. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.067>
- Gómez, C., Mejía, G., Segura, Á., Arango, C., Hernández, S., Patiño, D., & Barraza, A. (2018). Exposición a Bisfenol A (BPA) en mujeres embarazadas y su relación con la obesidad en sus hijos: revisión sistemática. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 36(1), 66–74. <https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v36n1a08>
- González, S., Gaspar, J., Calle, E., Pereira, S., Mariano, A., Rueff, J., & Casado, J. (2004). Stereochemical effects in the metabolic activation of nitrosopiperidines: Correlations with genotoxicity. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 558(1–2), 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.10.020>

- Guan, Y., Wang, X., Wong, M., Sun, G., An, T., Guo, J., & Zhang, G. (2017). Evaluation of genotoxic and mutagenic activity of organic extracts from drinking water sources. *PLOS ONE*, 12, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170454>
- Hiramoto, K., Hiromi, N., Kato, T., & Kikugawa, K. (1995). Thiamine is a precursor of DNA strand breakage and mutagenic substance(s) when mixed with nitrite. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, 6, 447–451. <https://doi.org/10.1248/cpb.37.3229>
- Hotchkiss, J. H. (1988). An overview of food and food packaging interactions. In *Food and Packaging Interactions* (pp. 1–10). Stocking Hall. <https://doi.org/10.1021/bk-1988-0365.ch001>
- Kier, L. D., Yamasaki, E., & Ames, B. N. (1974). Detection of mutagenic activity in cigarette smoke condensates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(10), 4159–4163. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.10.4159>
- Kremenutzky, E., & Vásquez, A. (2015). *Guía de Genética Mutaciones*. Retrieved from [http://alevazquez.com.ar/archivos/pdfs/G15\\_01.pdf](http://alevazquez.com.ar/archivos/pdfs/G15_01.pdf)
- Lara, A., & García, J. (1998). *Diseño Estadístico de Experimentos: análisis de la varianza*. <http://www.ugr.es/~cursps/archivos/Introduccion/TrIntrDise.pdf>
- Lopez, M., Granada, A., Araque, P., Molina, J., Puertollano, M., Rivas, A., ... Olea, N. (2007). Oestrogenicity of paper and cardboard extracts used as food containers. *Food Additives and Contaminants*, 24(1), 95–102. <https://doi.org/10.1080/02652030600936375>
- Mansilha, C., Silva, P., Rocha, S., Gameiro, P., Domingues, V., Pinho, C., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2013). Bisphenol A migration from plastic materials: Direct insight of ecotoxicity in *Daphnia magna*. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(9), 6007–6018. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1614-0>
- Melendez, I., Martínez, M., & Quijano, A. (2012). Actividad mutagénica y genotóxica en el material particulado fracción respirable MP 2,5 en Pamplona, Norte de Santander, Colombia. *Iatreia*, 25. [http://www.unipamplona.edu.co/unipamplona/portalIG/home\\_50/recursos/01\\_general/04102012/articulo1.pdf](http://www.unipamplona.edu.co/unipamplona/portalIG/home_50/recursos/01_general/04102012/articulo1.pdf)
- Melendez, I., Quintero, G., & Quijano, A. (2016). Mutagenicidad y genotoxicidad en fracciones de PM 2,5 del aire de Villa del Rosario, Colombia. *Actualidades Biológicas*, 38(105), 191–196. <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v38n105a06>

- Monneret, C. (2017). What is an endocrine disruptor? *Comptes Rendus - Biologies*, 340(9–10), 403–405. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2017.07.004>
- Montes, D., & Olivero, J. (2013). Computer-aided identification of novel protein targets of bisphenol A. *Toxicology Letters*, 222(3), 312–320. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.08.010>
- Mortelmans, K., & Zeiger, E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1–2), 29–60. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00064-6](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00064-6)
- Muncke, J., Backhaus, T., Geueke, B., Maffini, M. V., Martin, O. V., Myers, J. P., ... Scheringer, M. (2017). Scientific challenges in the risk assessment of food contact materials. *Environmental Health Perspectives*, 125(9), 1–9. <https://doi.org/10.1289/EHP644>
- Muncke, Jane. (2011). Endocrine disrupting chemicals and other substances of concern in food contact materials: An updated review of exposure, effect and risk assessment. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127, 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.10.004>
- Muñoz, J., & Santos, A. (2019). *Valoración económica de la disposición a pagar (dap) para controlar la venta de portacomidas asociados*. Trabajo de grado. Universidad Santo Tomás. <https://repository.usta.edu.co/handle/11634/17074>
- Navarro, J., Bonilla, A., Trujillo, A., & Upegui, L. (2006). Evaluación del potencial genotóxico de fitoproductos autóctonos activos contra Leishmania y Trypanosoma mediante el test de ames y el ensayo cometa, 28(85), 139–153. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/actbio/article/view/329394>
- Nepalia, A., Singh, A., Mathur, N., Kamath, R., & Pareek, S. (2018). Assessment of mutagenicity caused by popular baby foods and baby plastic-ware products: An imperative study using microbial bioassays and migration analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 162(July), 391–399. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.002>
- Ocampo, Y., Caro, D., Rivera, D., & Franco, L. (2017). Safety of sucrose esters from *Physalis peruviana* L. in a 28-day repeated-dose study in mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 90, 850–862. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.046>
- Okunola, A., Adewale, S., & Yetunde, A. (2019). In vitro mutagenicity and genotoxicity of raw and simulated leachate from plastic waste dumpsite. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 15, 1–8. <https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1566426>

- Omran, G., Gaber, H., Mostafa, N., Abdel, R., & Salah, E. (2018). Potential hazards of bisphenol A exposure to semen quality and sperm DNA integrity among infertile men. *Reproductive Toxicology*, *81*, 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.08.010>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (1985). *Environmental health. Criteria 51*.
- Pabón, A., Blair, S., Carmona, J., Zuleta, M., & Saez, J. (2003). Evaluation of the mutagenicity of antimalarial products isolated from *Solanum nudum* (Solanaceae). *Pharmazie*, *58*(4), 263–267.  
[https://www.researchgate.net/publication/10758453\\_Evaluation\\_of\\_the\\_mutagenicity\\_of\\_antimalarial\\_products\\_isolated\\_from\\_Solanum\\_nudum\\_Solanaceae](https://www.researchgate.net/publication/10758453_Evaluation_of_the_mutagenicity_of_antimalarial_products_isolated_from_Solanum_nudum_Solanaceae)
- Pabón, A., Lopera, T., Carmona, J., & Blair, S. (2001). Evaluation of mutagenic activity of several antimalarial extracts from *Eupatorium inulaefolium*. *Pharmazie*, *56*(5), 412–414.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11400559/>
- Pajaro, N., Caballero, K., & Olivero, J. (2014). Identification of volatile organic compounds (VOCs) in plastic products using gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS). *Ambiente & Agua*, *9*(4), 610–620. <https://doi.org/10.4136/1980-993X>
- Pawar, P., Shirgaonkar, S., & Patil, R. (2016). Plastic marine debris : Sources , distribution and impacts on coastal and ocean biodiversity. *PENCIL Publication of Biological Sciences*, *3*(February), 40–54.  
[https://www.researchgate.net/publication/295919494\\_Plastic\\_marine\\_debris\\_Sources\\_distribution\\_and\\_impacts\\_on\\_coastal\\_and\\_ocean\\_biodiversity](https://www.researchgate.net/publication/295919494_Plastic_marine_debris_Sources_distribution_and_impacts_on_coastal_and_ocean_biodiversity)
- Plastics Europe. (2018). *Plastics the Facts: An analysis of European plastics production, demand and waste data*.  
[https://www.plasticseurope.org/application/files/6315/4510/9658/Plastics\\_the\\_facts\\_2018\\_AF\\_web.pdf](https://www.plasticseurope.org/application/files/6315/4510/9658/Plastics_the_facts_2018_AF_web.pdf)
- Resolución 4143 (2012), por la cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios que deben cumplir los materiales, objetos, envases y equipamientos plásticos y elastoméricos y sus aditivos, destinados a entrar en contacto con alimentos y bebidas para consumo humano en el territorio nacional.. Ministerio de Salud y Protección Social. Colombia. Retrieved from <https://www.invima.gov.co/images/pdf/normatividad/alimentos/resoluciones/resoluciones/2012/4143.PDF>

- Resolución 683 (2012), por medio de la cual se expide el Reglamento Técnico sobre los requisitos sanitarios que deben cumplir los materiales, objetos, envases y equipamientos destinados a entrar en contacto con alimentos y bebidas para consumo humano. Ministerio de Salud y Protección Social. Colombia. Retrieved from [https://www.invima.gov.co/images/pdf/normatividad/alimentos/resoluciones/resoluciones/2012/2RESOLUCION\\_683\\_DE\\_2012\\_reglamento\\_general\\_envases.pdf](https://www.invima.gov.co/images/pdf/normatividad/alimentos/resoluciones/resoluciones/2012/2RESOLUCION_683_DE_2012_reglamento_general_envases.pdf)
- Quijano, A., Castillo, C., & Melendez, I. (2015). Potencial Mutagénico Y Genotóxico De Aguas Residuales De La Curtiembre Tasajero En La Ciudad De Cúcuta, Norte De Santander, Colombia. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 18(1), 13–20. Retrieved from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-42262015000100003&lang=pt](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262015000100003&lang=pt)
- Romana, V. (1993). *Evaluacion De La Mutagenicidad Inducida Por Concentrados Organicos Derivados De Aguas De Consumo Publico Por Medio Del Test De Ames*. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=14722>
- Sandoval, A. M. (2007). Ensayo de mutagenicidad con la bacteria *Salmonella typhimurim* . Prueba de Ames. *Instituto Nacional de Ecología*, 319–344. <https://micrositios.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/573/cap21.pdf>
- Selukar, N., Lande, C., & Ingole, C. (2014). Waste Thermocol to Adhesive for Better Environment. *International Journal of Innovative Research in Advanced Engineering (IJIRAE)*, 1(6), 98–101. <https://www.ijirae.com/images/downloads/vol1issue6/JYPE10080%2814%29.01.pdf>
- Sierra, C., Cajas, N., Hoyos, L., Zuleta, M., Whorton, E., & Au, W. (1998). In vitro and in vivo genotoxic activity of miral, an organophosphorus insecticide used in Colombia. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 415(1–2), 59–67. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(98\)00054-0](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(98)00054-0)
- Suhrhoff, T., & Scholz, B. (2015). Qualitative impact of salinity, UV radiation and turbulence on leaching of organic plastic additives from four common plastics - A lab experiment. *Marine Pollution Bulletin*, 102(1), 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.11.054>
- Sundar, R., Jain, M. R., & Valani, D. (2018). *Mutagenicity Testing. Mutagenicity: Assays and Applications*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809252-1.00010-9>

- Trossero, C., Caffarena, G., Hure, E., & Rizzotto, M. (2006). Detección de mutagenicidad en compuestos N-nitroso con el Test de Ames. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 25(1), 139–144. [http://www.latamjpharm.org/trabajos/25/1/LAJOP\\_25\\_1\\_5\\_1\\_AHEJ519796.pdf](http://www.latamjpharm.org/trabajos/25/1/LAJOP_25_1_5_1_AHEJ519796.pdf)
- US Food and Drug Administration. (2012). Code of federal regulation. *US Government Printing Office*, 1–806. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Title+21+Food+and+Drugs#0%5Cnhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Title+21:+Food+and+Drugs#0>
- Vandenberg, L., Luthi, D., & Quinerly, A. (2015). Plastic bodies in a plastic world: multi-disciplinary approaches to study endocrine disrupting chemicals. *Journal of Cleaner Production*, 140, 373–385. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.01.071>
- Vandenberg, L. N. (2014). *Hazards of Food Contact Material: Bisphenol A and Endocrine Disruption. Encyclopedia of Food Safety* (Vol. 2). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00428-5>
- Vandenberg, Laura N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., & Welshons, W. V. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology*, 24(2), 139–177. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.07.010>
- Vivas, A. H., Arboleda, M. A., Sánchez, R., Benitez, N., Bravo, E., Soto, A., ... Larmat, F. (2015). Evaluación de la mutagenicidad causada por metales pesados presentes en agua del río Cauca en la ciudad de Cali, Colombia. *Revista Colombiana de Química*, 43(2), 18–24. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v43n2.53119>
- Watson, J., Gann, A., Baker, T., Levine, M., Bell, S., Losick, R., & Harrison, S. (2014). *Molecular Biology of The Gene* (7th editio). New York: Pearson. <https://doi.org/10.2142/biophys.17.240>
- Wolstenholme, J. T., Goldsby, J. A., & Rissman, E. F. (2013). Transgenerational effects of prenatal bisphenol A on social recognition. *Hormones and Behavior*, 64(5), 833–839. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.09.007>
- Xue, C., & Shu, J. (2013). Migration study of bisphenol A from tea bottle of polycarbonate plastic to tea water. *Advanced Materials Research*, 821–822, 929–932. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.821-822.929>
- Zuluaga, M., Valencia, A., & Ortíz, I. (2009). Efecto genotóxico y mutagénico de contaminantes atmosféricos. *Medicina UPB*, 28(1), 33–41. <https://www.redalyc.org/pdf/1590/159013067005.pdf>

## Anexos

---

### *Anexo A.* Formato de recolección de información de recipientes plásticos

<b>DETERMINACIÓN DE LA MUTAGENICIDAD DE SUSTANCIAS MIGRADAS DESDE RECIPIENTES PLÁSTICOS DE BAJO COSTO COMERCIALIZADOS EN VILLAVICENCIO (META) MEDIANTE TEST AMES</b>							Fecha:
							Hora:
							Página:
Nombre del investigador							
Tipo de Recipiente							
N°	Lugar (almacén)	Plástico (Polipropileno/otro)	Opacidad (Opaco / Transparente)	Presencia de BPA (Libre de BPA/No reporta)	Marca	Observaciones	
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							