

Instituto Tecnológico de Costa Rica  
Vicerrectoría de Investigación y Extensión  
Dirección de Proyectos

Informe Final

Documento I

***Evaluación de Subproductos de Cloración y su efecto mutagénico en agua para consumo humano.***

Centros de Investigación:

Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos-  
CEQIATEC.

Centro de Investigación en Protección Ambiental- CIPA

Investigadores participantes:

Virginia Montero Campos coordinadora- CEQIATEC

Ricardo Coy Herrera- CEQIATEC

Joaquín Jiménez Antillón- CIPA

Estudiantes:

Rodrigo Chinchilla Montero

Ana Laura Agüero Benavides

Alejandro Olarte Cano

Junio 2013

## TABLA DE CONTENIDO

Resumen .....	3
Introducción.....	4
Defición del problema.....	4
Objetivos.....	6
Revisión de literatura.....	6
Materiales y métodos .....	16
Resultados .....	17
Discusión.....	30
Conclusiones y recomendaciones.....	32
Aportes y Alcances.....	33
Referencias bibliograficas .....	34
Anexos .....	37

## Resumen

*Se investigó la presencia de subproductos de desinfección como trihalometanos (THMs) por medio de la técnica de microextracción en fase sólida (HEADSPACE / SPME Solid Fase Microextraction / GS-MS), utilizando un Cromatógrafo de Gases Varian 450 acoplado a Espectrómetro de Masas. Se analizaron en total 39 muestras de agua, provenientes de fuentes de agua subterránea (nacientes) administradas por la Municipalidad del Cantón Central de Cartago y agua de origen superficial (Plantas de tratamiento completo) dispensada por los sistemas de Tratamiento de AyA/Cantón Central de Cartago, y los Sistema de Tratamiento de AyA de Moravia, Guadalupe y Pavas, con un total de 156 subproductos determinados y cuantificados correspondiendo estos a: cloroformo, bromodichlorometano, dibromoclorometano y tribromoclorometano. En las muestras de agua de sistemas de tratamiento completo se encontró que de 80 subproductos analizados, 12 de estos superaron el máximo admisible de acuerdo al Reglamento Nacional de Calidad de Agua para consumo humano, mientras que de los acueductos abastecidos de aguas subterráneas administrados por la Municipalidad de Cartago, de 76 subproductos analizados solo uno de ellos superó el valor máximo permitido. Los trihalometanos encontrados de acuerdo a la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (por sus siglas en inglés IARC) se ubican en el grupo 2 B con evidencia de producir cáncer en animales. Se encontró gran variación de la presencia de estos subproductos en las muestras de agua de los abastecimientos que corresponden a agua con tratamiento completo (agua superficial tratada) correlacionando con lo reportado ya en la literatura, no obstante se reportó por primera vez la casi ausencia total de subproductos en cantidades que superen los máximos permitidos en aguas de origen subterráneo correlacionando con menor cantidad de carbono orgánico total, menor cantidad de cloro agregado (cloro combinado) y por ser acueductos más pequeños, menor cantidad de cloro residual. Con respecto a la formación de los subproductos, de acuerdo a la literatura, se pudo afirmar que la misma se ve favorecida con el aumento de la dosis de cloro (no necesariamente el cloro residual) y el aumento del tiempo de contacto agua-cloro, por cuanto el contenido de THMs a la salida de las plantas de tratamiento se incrementa posteriormente en muchos casos en la red, debido principalmente al mayor tiempo de contacto con la materia orgánica y con sustancias orgánicas de biofilmes en la red. De acuerdo a determinaciones anteriores en muestreos control de agua municipal el promedio de cloro residual de las plantas de tratamiento es de 1.1 mg/L y el de los sistemas de agua subterránea es de 0,6 mg/L.*

### PALABRAS CLAVE

Trihalometanos, subproductos de desinfección, cloración.

## INTRODUCCIÓN

### ANTECEDENTES:

Actualmente, se ha determinado que a pesar de que la desinfección del agua con cloro para consumo humano, ha representado una disminución en la incidencia de enfermedades infecciosas, se han encontrado sustancias o subproductos de la desinfección que presentan posibles efectos genotóxicos en la salud humana ( EPA, 2000 ).

En el proceso de cloración del agua se produce una serie de reacciones químicas entre el cloro utilizado en la desinfección y la materia orgánica presente en el agua a tratar. La naturaleza y concentración de los compuestos formados, son dependientes de variables físico- químicas de la materia orgánica del suelo, los cuales reaccionan originándose productos que son compuestos de diferente toxicidad, entre ellos mutagénicos y carcinogénicos, todos ellos en conjunto se les conoce como productos secundarios de cloración (siglas en inglés SPD), los que se incluyen compuestos llamados trihalometanos (THM's) y ácidos haloacéticos (HAA) (Calderón, 2002).

Esta circunstancia le puede conferir características de riesgo a la población al consumir esta agua clorada. El proyecto tuvo como objetivo correlacionar el tipo de tratamiento del agua para consumo humano como: tratamiento completo (AyA) en sus sistemas de potabilización de agua superficial como floculación, sedimentación filtración y cloración y con solo cloración como ocurre con el tratamiento de aguas subterráneas, principalmente en aguas utilizadas por ASADAS y Municipalidades, y esto con respecto a la naturaleza química del suelo, naturaleza química del producto secundario formado y pruebas de mutagénesis al agua de consumo de las poblaciones.

### DEFINICIÓN DEL PROBLEMA:

En la cloración del agua para consumo humano el riesgo no es consumir agua con cloro residual "per se", sino clorar cierto tipo de agua, específicamente con alto contenido de materia orgánica (más de 2 mg/L) como carbono orgánico total (TOC), relacionado con esto el tipo de compuesto químico formado ya que entre los THM's no todos tienen la misma toxicidad y potencial de mutagenicidad y carcinogenicidad.

Esto es preocupante ya que los mutágenos presentes en el agua de consumo llegan continuamente a la población durante largo tiempo lo que puede ocasionar enfermedades de origen mutacional tales como tumores benignos, malignos (cáncer) y otras patologías relacionadas con el sistema inmune y efectos adversos en mujeres embarazadas además varios estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo de agua clorada sin el

adecuado manejo y tratamiento está asociado con un incremento en el riesgo de cáncer gástrico, vejiga y de recto. (Nieuwenhuijsen, et al 2009).

Los THM's originados durante este proceso de cloración incluyen el cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ), el bromodichlorometano, clorodimometano, bromoformo, tetracloruro de carbono, entre otros compuestos volátiles. Se ha descrito que el cloroformo en altas dosis es cancerígeno y que los otros THM's son mutagénicos.

En general el Reglamento de Calidad de Agua para consumo humano en Costa Rica contempla la determinación y el análisis de 14 compuestos diferentes (cuadro 2). A la fecha en el país no se ha llevado a cabo una investigación similar, ni se ha determinado este tipo de compuestos en el agua de consumo por análisis de laboratorios nacionales.

En varios trabajos se ha encontrado que uno de los principales mutágenos formados en el agua clorada es el 3-cloro-4-diclorometil-5 hidroxil-2-furanona, este es un mutágeno directo que puede producir entre 4000 y 13000 mutaciones en pruebas in vitro de mutagénesis inducida además de producir cáncer de tiroides, hígado y adenomas foliculares de bronquios, pulmones y páncreas en ratas (Villanueva, et al 2007).

La preocupación acerca de la exposición a agentes mutagénicos en nuestro medio ambiente se basa fundamentalmente en la premisa de que los compuestos químicos que dañan el ADN de células germinales pueden incrementar la incidencia de mutaciones heredables y alteraciones genéticas, y los compuestos químicos que dañan el ADN de las células pueden influir en el inicio del cáncer (Villanueva, et al, 2007).

Muchos autores han puesto de manifiesto una alta correlación cualitativa en la capacidad de estos productos químicos para inducir mutaciones en bacterias y causar cáncer en animales de experimentación. En términos generales el "Test de Ames" permite estudiar la actividad mutagénica de muestras de cualquier líquido. Desde su aparición en 1975 ha sido muy empleado para determinar mutagénesis de muestras del medioambiente y biológicas, en esta investigación se propone desarrollar una variación altamente sensible como lo es la prueba de UMUC EASY AQ.

# OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia en el agua de consumo humano de los lugares marco de la investigación, de sustancias con potencial tóxico y productos secundarios de cloración (SPD) con potencialidad mutagénica, por Test de Ames.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

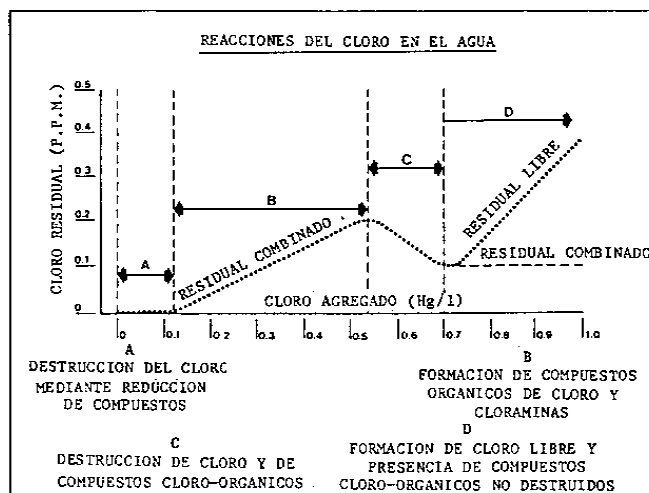
- 1- Optimizar la técnica de muestreo con micro-extracción en fase sólida y la presencia y cuantificación de sustancias con potencial tóxico en agua cruda y SPD en agua clorada por cromatografía de gas con detector de masa (GCMS).
- 2- Validar la técnica y analizar la actividad mutagénica de sustancias con potencial tóxico antes y después de la cloración por Test de Ames.
- 3- Correlacionar tipo de suelo con respecto a SPD formados y potencial mutagénico.
- 4- Recomendar técnicas de eliminación o minimización de SPD para el agua a los Entes Operadores de Acueductos.

# REVISIÓN DE LITERATURA

La desinfección del agua es un proceso que busca inactivar los agentes biológicos contaminantes, generalmente es la etapa final de una serie de procesos que tienen lugar en una planta potabilizadora de aguas superficiales y que se puede efectuar a través de agentes físicos, como la radiación de luz ultravioleta, y especialmente mediante la dosificación de agentes químicos, particularmente el cloro, las cloraminas, el dióxido de cloro y el ozono. (Ríos, 2004).

De ellas, la cloración, es la alternativa más ampliamente difundida en países en desarrollo, dado que constituye la tecnología más conocida por su eficacia, costo de aplicación y por estar histórica y epidemiológicamente comprobada. El cloro utilizado, permite controlar el crecimiento bacteriano, proporcionando un nivel residual desinfectante en el sistema de distribución, que controla la re-contaminación del agua en sistemas de largas tuberías que frecuentemente

tienen óxidos y presentan formación de biopelículas, fugas y grietas. (Sánchez Z, 2008). A continuación se muestra un gráfico del equilibrio de las distintas formas del cloro cuando es agregado al agua (no confundir cloro residual con cloro combinado).



Tomado del libro: Cloración del Agua. Santos y Dominguez.

Además de la característica mencionada anteriormente, el cloro también actúa como oxidante, favorece el control del sabor y el olor del agua, restringe el crecimiento de algas (Liviac D. M., 2010) puede eliminar o ayudar a eliminar algunas sustancias químicas como el sulfuro de hidrógeno; puede descomponer plaguicidas fácilmente oxidables, oxidar especies disueltas, como el manganeso (II) y el hierro, formar productos insolubles que pueden eliminarse mediante una filtración posterior; puede oxidar especies disueltas a formas más fáciles de eliminar (arsenito a arseniato) (OMS, 2006); impide el crecimiento de microorganismos que interfieren en el proceso de coagulación-floculación y filtración, mantiene los lechos filtrantes libres de posibles crecimiento de bacterias anaerobias, reduce el color orgánico, entre otras (Ochoa B, 2004).

En el caso de nuestro país, la desinfección del agua se encuentra normada bajo el “Reglamento de calidad del agua potable, Decreto N° 32327-S2”, en el cual, en el Artículo 12 se señala la utilización de la desinfección: como parte de una serie de operaciones y procesos de tratamiento unitario en una planta. En su forma más simple se aplica como único tratamiento de aguas naturales de excelente calidad (aguas subterráneas o de manantial) para garantizar ausencia de indicadores de contaminación fecal entre el punto de aplicación y el punto de entrega al usuario. La desinfección deberá aplicarse además para mantener un nivel residual, según lo indicado en el artículo 13, que garantice la calidad del agua de contaminaciones eventuales a través de todo el sistema de distribución.” (República de Costa Rica, 2005).

Se determina en este mismo reglamento, en el Artículo 13, que la dosis de desinfectante que se agrega al agua varía de acuerdo a la demanda de cada tipo de agua; para el caso del uso de cloro, se recomienda, para la destrucción de bacterias indicadoras el mínimo de cloro en la

red de distribución, lo cual va a depender del pH del agua y el tiempo mínimo de contacto, tomando en consideración el siguiente cuadro:

**Cuadro 1.** Consideraciones de la cantidad de cloro residual, tiempo de contacto y pH del agua.

Valor del pH	Cloro residual libre (mg/L) Tiempo mínimo de contacto de 20 minutos	Cloro residual combinado (mg/L) Tiempo mínimo de contacto de 60 minutos
6.1-7.0	0.3	1.0
7.1-8.0	0.5	1.5
8.1-9.0	0.6	1.8

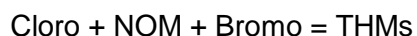
Fuente: Reglamento de calidad del agua potable, Decreto N° 32327-S

### Productos secundarios de la desinfección (DBPs)

Durante el proceso de potabilización y distribución del agua, ocurren una serie de reacciones químicas entre los agentes de desinfección y compuestos orgánicos presentes en el agua a tratar, que se conocen también como ácidos húmicos (cuyo nombre deriva del humus) y ácidos fúlvicos, los cuales se encuentran tanto en el agua superficial como en la profunda y son el producto de la degradación de sustancias vegetales (maderas, tallos, raíces, etc.) como la lignina (Berdonces, 2008) que le confieren color al agua.

Estos compuestos activos al entrar en contacto con los derivados del cloro propician la formación de subproductos de la desinfección SPDs o DBPs (siglas en inglés, desinfectant by product), muchos de los cuales se han identificado como potencialmente perjudiciales para la salud humana. (Ríos, 2004). Entre estos compuestos están los trihalometanos (THMs), ácidos haloacéticos (HAAs), además de los haloacetosnitrilos (HAN), haloaldehídos y halocetonas.

Los trihalometanos conforman el grupo de subproductos más difundido e identificado en las reglamentaciones de los distintos países. Se forman a partir de la sustitución de 3 átomos de hidrógeno del metano (CH<sub>4</sub>), por átomos de un halógeno (cloro o bromo, y eventualmente yodo) (Ríos, 2004).



Los trihalometanos se subdividen en triclorometanos (cloroformo, CHCl<sub>3</sub>), bromodiclorometano (BDCM, CHBrCl<sub>2</sub>), cloro dibromometano (CHBr<sub>2</sub>Cl) y tribromometano (CHBr<sub>3</sub>). El cloroformo es el trihalometano más común y el principal subproducto de la desinfección presente en el agua de consumo clorada.

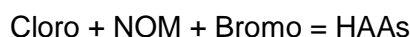
Es confirmado por varias determinaciones, en las que se ha comprobado una mayor concentración de CHCl<sub>3</sub> en aguas (Sarmiento, et al, 2003), superando en algunos casos el 50 % de los THMs, donde el bromoformo ni siquiera fue detectado (Mosquera, 2009) y en otros,



donde la cantidad correspondió al 95% de los THM totales, seguido por el bromodiclorometano (CHCl Br) con una concentración promedio de 4.1 µg/L (Sánchez, et al, 2010).

La mayoría de los trihalometanos presentes en el agua se transfieren al aire debido a su volatilidad, por lo que existen cuatro fuentes que contribuyen a la exposición total a trihalometanos volátiles: ingestión de agua de consumo, inhalación de aire en espacios interiores, inhalación y exposición cutánea durante la ducha o el baño, y la ingestión de alimentos. (Organización Mundial de la Salud, Guías para la calidad del agua potable, 2006).

Por otro lado, los ácidos acéticos halogenados (HAAs) son el segundo grupo en importancia, se forman a partir de la sustitución de átomos de hidrógeno de los ácidos acéticos (CH<sub>3</sub>COOH), por átomos de halógenos (cloro o bromo):



Existen tres categorías, el ácido monohaloacético (ácido monocloroacético y ácido monobromoacético) que tiene un átomo de halógeno, mientras que los ácidos dihaloacético (ácido dicloroacético, ácido dibromoacético y ácido bromocloroacético) y trihaloacético (ácido tricloroacético, ácido tribromoacético, ácido bromodicloroacético y ácido dibromocloroacético) cuentan con dos y tres halógenos respectivamente. (Ríos, 2004).

Los haloacetoneitrilos (se forman durante la reacción entre el cloro y acetonitrilo), haloaldehídos y halocetonas, son subproductos de la desinfección que están presentes en menores cantidades, se forman inmediatamente durante la desinfección del agua, pero se descomponen rápidamente mediante reacciones de hidrólisis o reacciones con desinfectantes residuales. Otros subproductos de la desinfección formados normalmente durante la cloración del agua son los halonitrometanos, halofenoles y halofuranos. (Sánchez Z, 2008)

### **Variables que intervienen en la formación de los SPDs o DBPs**

En algunas investigaciones realizadas, se ha considerado que la naturaleza y concentración de los DBPs son dependientes de variables como el tipo y concentración del desinfectante utilizado, cantidad de materia orgánica presente en el agua natural, temperatura, fuerza iónica, cantidad de cloro residual, concentración de bromo, tiempo de contacto con el agente desinfectante y el pH. (Vuolo, et al,2013 ),(Sánchez Z, 2008).

Según menciona Ochoa, 2004 la formación de subproductos se ve favorecido con el aumento de la dosis de cloro y con el aumento del tiempo de contacto agua-cloro, ya que está comprobado que los contenidos de THMs a la salida de las estaciones de tratamiento se incrementan posteriormente en muchos casos, ya en la red, debido principalmente al mayor

tiempo de contacto con la materia orgánica que sale de la estación y con sustancias orgánicas que forman biofilmes en la red. (Ochoa B, 2004).

Esto se evidencia con el estudio realizado por Sánchez et al, en el que concluyeron que la concentración de cloroformo se incrementó en 20 µg/L por efecto del aumento en la edad del agua, lo cual favorece un mayor tiempo de contacto del cloro con la materia orgánica presente en el agua. (Sánchez, et al, 2010).

Además, se considera que al aumentar la temperatura, manteniendo el pH y la dosis de cloro, se da una mayor formación de subproductos. (Mosquera, et al, 2009). Es por esta razón, que un estudio realizado en Venezuela señala el hecho de que la medición de los THMs en unas redes de agua a la intemperie, expuestas al sol, aumenta proporcionalmente con el incremento de la temperatura del agua. (Sarmiento, et al, 2003).

Por otro lado, como han evaluado otros autores en aguas naturales, el incremento del pH, favorece la formación de cada trihalometano y por ende los trihalometanos totales. Este fenómeno podría originarse en las diferencias en la naturaleza química de los ácidos húmicos y fúlvicos a distintos pH (Vuolo, et al 2013). Un estudio realizado por Rosero, Latorre, Torres, & Delgado, indicó que los mayores aportes se encontraron en los puntos de aplicación de cloro y la adición de cal, esto ratifica la relación directa entre el pH y la formación de THMs. (Rosero, Latorre, Torres, & Delgado, s.f.)

También, en un estudio en Barcelona se relacionó la fuerza iónica, ya que se obtuvo valores de THMs relativamente bajos en muestras de agua del río Ter, que se catalogó como de baja conductividad, predominando el cloroformo y bromodiclorometano, mientras que en las del río Llobregat, el cual se encuentra en una zona rica en minas de potasa, lo que aporta sales de potasio condicionando su alta conductividad, presentó valores de THMs más elevados, que superan los 100 µg/L, predominando el bromoformo y dibromoclorometano. (Calderón, Capell, Centrich, Artazcoz, González-Cabré, & Villalbí, 2002).

En cuanto a la presencia de ion bromuro, se ha identificado que reduce la formación de cloroformo, al tiempo que incrementa los trihalometanos bromados y trihalometanos totales, este efecto no se evidencia en presencia de fluoruro. (Vuolo, y otros). En un estudio desarrollado en las aguas de los ríos Sacramento y San Joaquin, en California, se determinó que la formación potencial de THMs fue mayor en el río San Joaquín, debido a las mayores concentraciones de los precursores, carbono orgánico disuelto y bromuro. (Chow, Dahlgren, & Harrison, 2007).

#### **Valores de referencia de DBPs o SPDs.**

A nivel internacional, diversos organismos han establecido valores de referencia para los productos secundarios de la desinfección. En el caso de la OMS, las "Normas internacionales para el agua potable" de los años 1958, 1963 y 1971 no hicieron referencia a los

trihalometanos, por su parte, en la primera edición de las “Guías para la calidad del agua potable” de 1984, se estableció un valor de referencia para el cloroformo de 0,03 mg/L, basado en los efectos sobre la salud, no para los otros THMs, ya que este era el compuesto que se detectaba con mayor frecuencia en los sistemas de abastecimiento de agua. (OMS, 2004).

En la segunda edición de las Guías, publicada en 1993, se establecieron valores de referencia basados en efectos sobre la salud de 0,1 mg/L para el bromoformo y el dibromoclorometano (DBCM); se calcularon valores de referencia de 0,06 mg/L para el bromodiclorometano (BDCM) y de 0,2 mg/L para el cloroformo, asociados a un valor máximo del riesgo adicional vitalicio de cáncer de  $10^{-5}$ . Además, se menciona que para establecer una norma para el total de trihalometanos, “*la suma de los cocientes de la concentración de cada uno y sus respectivos valores de referencia no debe ser mayor que 1*” (OMS, 2004).

Por otro lado la Agencia de Protección Ambiental de los Estados (United States Environmental Protection Agency, EPA) estableció en 1998, la “Regla de la Primera Etapa de Desinfectantes y Subproductos de Desinfección” o “**Stage 1 Disinfectants and Disinfection Byproducts Rule**”, la cual impone más protección contra los subproductos de desinfección. En el año 2002, se establecieron los nuevos estándares: **trihalometanos totales** 0.080 p.p.m.; **ácidos haloacéticos** 0.060 p.p.m. ; **clorito** 1.0 p.p.m.; **bromato** 0.010 p.p.m. (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, 2000).

La normativa Europea (Directiva 98/83/CE) establece que la concentración total de THMs en el agua de consumo no puede superar los 100-150  $\mu\text{g/L}$ , de acuerdo con esta Directiva, se estableció un límite máximo de THMs totales de 150  $\mu\text{g/L}$  hasta el año 2008 y 100  $\mu\text{g/L}$  a partir del año 2009. (Hernández Sánchez, Luis González, Rubio Armendáriz, Caballero Mesa, Ben-Charki El-Mousati, & Hardisson de la Torre, 2011).

Un estudio realizado por Gopal, Tripathy, Bersillon, & Dubey, 2006, señaló la importancia de que con el fin de reducir el riesgo para la salud pública se dé una regulación para la implementación de valores de referencia para reducir las concentraciones permisibles o exposición a estos compuestos, por esta razón, países como Canadá y Australia, donde la situación de la regulación es comparable, se han establecido normas al respecto, y en el caso de Alemania, el valor de referencia para los THM totales se ha determinado en 10  $\mu\text{g/L}$ . (Gopal, et al, 2006)

Sin embargo, las reglamentaciones de los países difieren bastante a este respecto, algunos incluso no requieren de forma expresa el empleo de desinfectantes en el tratamiento del agua (Ochoa, 2004). En otros se han establecido límites para la suma de las concentraciones de bromoformo, DBCM, BDCM y cloroformo que oscilan entre 0,025 y 0,25 mg/L, lo que representa un equilibrio entre las concentraciones que se pueden alcanzar en determinadas circunstancias y las concentraciones deseables. (OMS, 2004).

Muchos estudios han demostrado que la presencia de THMs, superan el límite permisible de la EPA (80  $\mu\text{g/l}$ ) (Sarmiento, et al, 2003), sobrepasando los 100  $\mu\text{g/l}$  y predominando el bromoformo y dibromoclorometano. (Calderón, et al 2002) o los valores establecidos en su

país, en especial en el caso del cloroformo, que superó en un estudio, el valor máximo permitido por la normativa colombiana. (Camargo, et al, s.f).

En el caso de nuestro país, los parámetros para subproductos de la desinfección están basados en los datos recomendados por la OMS y establecidos en el “Reglamento de calidad del agua potable, Decreto N° 32327-S2”. La frecuencia y número de muestras para los análisis del nivel 4, serán establecidos de acuerdo a cada situación particular (brotes de enfermedades de origen hídrico, contaminaciones accidentales, otros). (República de Costa Rica, 2005).

**Cuadro 2.** Determinaciones de los valores máximos de los parámetros admisibles de desinfectantes y subproductos de la desinfección.

Parámetro Admisible		Valor Máximo Parámetro Admisible, µg/L
<b>Desinfectantes</b>	Monocloramina	4000
<b>Subproductos de la desinfección</b>	Bromato	25
	Clorito	200
<b>a- Clorofenoles</b>	2,4,6-triclorofenol	200
	Formaldehido	900
<b>b- Trihalometanos</b>	Bromoformo	100
	Dibromoclorometano	100
	Bromodiclorometano	60
	Cloroformo	200
<b>c- Ácidos Acético Clorados</b>	Ác. Dicloroacético	50
	ác. Tricloroacético	100
	tricloroacetaldehído/cloralhidrato	100
<b>d- Haloacetoneitrilos</b>	Dicloroacetoneitrilo	90
	Dibromoacetoneitrilo	100
	Tricloroacetoneitrilo	11
<b>e- Cloruro de cianógeno (como CN-)</b>		70

Fuente: Reglamento de calidad del agua potable, Decreto N° 32327-S

### Efectos de los DBPs o SPDs en la salud humana

A nivel científico, existen fuertes discordancias acerca del posible riesgo que implican los procesos de desinfección y sus subproductos, especialmente los producidos por la cloración

del agua de consumo humano, debido a la existencia de compuestos potencialmente carcinogénicos en el agua desinfectada con cloro.

La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer ha clasificado al cloroformo y bromodichlorometano como cancerígenos potenciales, mientras que la información sobre el bromoformo y el dibromoclorometano es insuficiente para evaluar su carcinogenicidad.

En un estudio realizado con animales de laboratorio, por un período de 2 años, se concluyó que la exposición a ácido dibromoacético (DBA), indujo la formación de neoplasias en múltiples sitios en ratas y ratones, incluyendo la leucemia de células mononucleares, mesoteliomas en la cavidad abdominal en ratas, neoplasias del hígado (adenoma o carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma) y pulmonar (adenoma alveolar o carcinoma) en ratones. Además, el aumento de la incidencia de neoplasmas hepatocelulares en ratones machos fue significativo incluso a la concentración más baja como exposición de 50 mg/L, que es equivalente a un promedio dosis diaria de aproximadamente 5 mg/kg. (Melnick, et al, 2007).

Con respecto a los clorofenoles, no se conoce si su consumo en el agua de bebida tiene efectos adversos en la salud humana, sin embargo, en pruebas de laboratorio con ratas y conejos, se ha concluido que producen un daño significativo en los riñones, y cambios histológicos, pero es muy difícil extrapolar resultados obtenidos en animales de experimentación y extenderlos a los seres humanos. (Sánchez Z, 2008).

Algunas investigaciones han examinado la relación entre los THM y el cáncer, los cuales han sugerido que hay una asociación con el cáncer de vejiga (Yassi, et al, 2002), (Nieuwenhuijsen, et al, 2009). Villanueva et al, 2004, refuerzan esta hipótesis, ya han encontrado que el riesgo aumenta con la exposición a subproductos de la desinfección, a largo plazo en los niveles observados actualmente en muchos países industrializados. (Villanueva, y otros, 2004); además de un patrón de dosis-respuesta entre los hombres expuestos a trihalometanos. (Villanueva, y otros, 2007).

En cuanto a la relación con el cáncer colorrectal, un meta-análisis realizado por Rahman, et al 2010, apunta a una asociación entre la exposición a los subproductos de desinfección y un aumento en el riesgo de este cáncer, sin embargo, el escaso número de estudios y las limitaciones en la calidad del estudio impiden una inferencia causal, recomendando estudios de cohortes. (Rahman, et al 2010).

También, los THM se han asociado a un incremento de los cánceres de estómago, mamas, pulmón, páncreas, riñones y linfomas no-Hodgkin (Yassi, et al, 2002), pero la evidencia de una relación entre los subproductos y otros tipos de cáncer, incluyendo el cáncer colorrectal puede ser concluyentes y contradictorios. (Nieuwenhuijsen, et al 2009).

Por otro lado, se han realizado estudios para ver la asociación de los DBPs con problemas en el embarazo, cuyos resultados indican un potencial riesgo ligeramente elevado de retraso del crecimiento intrauterino, (Nieuwenhuijsen, et al, 2009), específicamente durante el segundo y

tercer trimestre para trihalometanos totales y cinco ácidos haloacéticos, pero no se obtuvo un efecto estadísticamente significativo (Porte, et al 2005).

De igual forma, se determinó una posible asociación positiva con nacimientos prematuros (Nieuwenhuijsen, et al, 2009), en el tercer trimestre en madres de bajo nivel económico por exposición a trihalometanos totales (TTHM), pero se recomienda investigar el riesgo en subgrupos susceptibles, la influencia de la raza o etnia y el estatus socioeconómico de la madre, en conjunto con la exposición de los resultados. (Lewis, et al 2007).

Por su parte, aunque un estudio realizado en Italia, no encontró asociación significativa entre la exposición a los THM's y partos prematuros, sí sugirió una relación dosis-respuesta con niveles de clorito  $\geq 200$  mg/L, combinado con los niveles bajos y altos de la exposición por inhalación. (Aggazzotti, et al, 2004).

Además, se han realizado investigaciones cuyos resultados proporcionan evidencia de un mayor riesgo de muerte fetal asociada con la exposición a subproductos de la cloración a través de la ingestión, ducha y baño, aunque no había una relación dosis-respuesta. (Dodds, et al, 2004), no así con anomalías congénitas, ya que hay poca evidencia de tal asociación. (Nieuwenhuijsen, et al, 2009).

Es importante mencionar que aunque la mayoría de los estudios se han centrado en THMs, algunos SPD emergentes parecen ser más tóxicos, por lo que resulta importante la medición de diferentes clases de subproductos de la desinfección, el muestreo de agua en los hogares y la incorporación del tema conductas de uso del agua en la evaluación de la exposición (King, et al 2004).

Un mejor conocimiento de las reacciones que conducen a la formación de subproductos de desinfección y la aplicación de métodos más precisos para estimar la toxicidad potencial de estos subproductos, es una herramienta útil para la investigación de la cloración. (Gopal, et al, 2006).

### **Ensayos de genotoxicidad de los DBPs o SPDs**

Se han realizado varios estudios sobre genotoxicidad de los compuestos secundarios de la desinfección, con ensayos como el test de MN (micronúcleos) y el ensayo cometa, utilizando la línea de linfoblastoide humana TK6 y linfocitos humanos de sangre periférica.

En estos estudios, se han detectado que tanto el bromonitrometano (BNMH) como el tricloronitrometano (TCNM), muestran inducción del daño genotóxico, siendo el BNM más citotóxico y genotóxico, y ambos inducen un alto nivel de daño oxidativo; sin embargo, el daño no llega a fijarse y es reparado eficientemente por la célula (Liviac, et al 2009).

Los mismos resultados se han obtenido de la evaluación del ácido mucrobrómico y el ácido mucoclórico (Liviác, et al, 2009); así como dos acetaldehídos halogenados, tribromoacetaldehído e hidrato de cloral (Liviác, et al, 2010).

En otros estudios realizados por los mismos autores, revelan que la nitrosodimetilamina, nitrosoetilemina son ligeramente tóxicas; tres ácidos haloacéticos (ácido yodoacético, ácido broacético y ácido cloroacético ) no son capaces de producir daño genético que pueda fijarse y evidenciarse y el ácido mucobrómico (MBA) puede ser considerado un compuesto mutagénico debido a su capacidad de incrementar la frecuencia de mutación en el ensayo de linfoma de ratón (Liviác D, 2010).

Asimismo se ha comprobado que el proceso de desinfección adicional al que se encuentra sometida el agua de piscina, incrementa significativamente su potencial genotóxico. (Liviác D, 2010) (Kogevinas, et al, 2010). En otro estudio similar, se lograron identificar más de 100 DBPs que contienen nitrógeno en aguas de piscinas cubiertas y una demostración clara de su mutagenicidad en niveles similares a la del agua potable (Richardson, et al, 2010).

En una investigación realizada en aguas residuales desinfectadas con ácido peracético (PAA) e hipoclorito de sodio (NaClO), se analizó la mutagenicidad en *Salmonella typhimurium* con cepas TA98 y TA100 y se realizaron estudios de genotoxicidad (prueba de aberración de la anafase de la raíz de *Allium cepa* y la prueba de micronúcleos de *Tradescantia*), en los cuales se determinó que en las condiciones aplicadas, no se da lugar a la formación de cantidades significativas de subproductos genotóxicos (Crebelli, et al, 2005).

Existe también, la prueba de Ames tradicional, la cual es una prueba validada de mutación reversa más utilizada, recomendada para programas de monitoreo y análisis de la actividad mutagénica de extractos orgánicos de aguas por su sensibilidad y confiabilidad (Sandoval & Ruíz, 1997), emplea varias cepas mutantes de *Salmonella typhimurium* que lleva mutaciones en el operón que codifica para la síntesis de histidina (ANIARA, 2010).

A pesar de que en algunas investigaciones realizadas en agua de consumo público, no se ha encontrado actividad mutagénica positiva con ninguna de las cepas de ensayo. (Albaladejo, et al, 1995), posiblemente por la presencia de pocas sustancias con potencial genotóxico o en bajas concentraciones, (Avila-Pérez, 2002) en otros casos, los resultados de las pruebas de mutagenicidad demostraron que hay un efecto mutagénico (Taquez, 2011).

Estos estudios de mutagénesis varían en cuanto a su complejidad y su habilidad para detectar posibles carcinógenos ambientales, ensayos como el test de Ames y el de *E.coli*, tienen la desventaja de que detectan solo mutaciones génicas, no siendo capaces de reconocer otro tipo de daño en el ADN, como las aberraciones cromosómicas. (Granados, et al 2004).

Actualmente se cuenta con el ensayo de mutagenicidad de Ames MPF, que se basa en el mismo principio pero con la modificación de líquido en microplacas, el cual ofrece un formato de velocidad más alta, colorimetría, fácil manipulación y la posibilidad de automatizar la siembra y lectura de placas. Además es rápido y eficiente, consume menos cantidad de reactivos y muestra una correlación con la prueba tradicional que se ha demostrado en varias

publicaciones, (ANIARA, 2010) sin embargo, no se tiene disponibles estudios recientes utilizando ésta técnica, la cual se propone hacer en esta investigación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

De acuerdo a los objetivos y actividades propuestas se planteó la siguiente secuencia en la determinación de la metodología a realizar:

1- Validación de los de los parámetros en la cuantificación de halometanos en agua potable por cromatografía de gases – masas (GC-MS).

2- Determinación de trihalometanos utilizando el Estándar de Trihalometanos “EPA 551A Halogenated Volatiles Mix” de Supelco compuesto por 10 sustancias: trihalometanos (bromoformo, cloroformo, bromodichlorometano y dibromodichlorometano), trihaloetanos (1,2 dibromoetano, 1,1,1 trichloroetano, trihaloetano, trichloroetileno), trihalopropanos (1,2 dibromo 3, cloropropano), tetrahalometano (tetracloruro de carbono).

Se utilizó la técnica de Microextracción en fase sólida (HEADSPACE / SPME Solid Fase Microextraction / GS-MS).

Para dicha determinación se utilizó un Cromatógrafo de Gases Varian 450 acoplado a un Espectrómetro de Masas.

3- Con respecto a la cuantificación de Carbono orgánico total (TOC) para agua cruda y tratada en el anexo 1 se muestra el cuidado con la cristalería, la preparación de reactivos y estándares. Se siguió el método SM 5310 C por oxidación con persulfato de sodio-oxidación ultravioleta. Se mide el carbono orgánico vía absorción IR del gas CO<sub>2</sub> que se produce cuando el carbono orgánico en la muestra es oxidado simultáneamente por la disolución de persulfato e irradiado con luz UV. El carbono inorgánico es convertido a CO<sub>2</sub> por acidificación a un pH < 2, y es purgado de la muestra antes del análisis. Concentraciones significativas de cloruro (> o = 0,1 %) y un pH bajo de la muestra (< 1) puede impedir el análisis.

Se utilizó frascos color ámbar con taparrosca de teflón. El frasco se llenó con agua sin burbujas o headspace; se tomó un volumen de muestra de 120 mL. Se mantuvieron las muestras en hielo a 4 °C y se analizaron lo antes posible en el laboratorio.

El espectrofotómetro debió ser calibrado previamente con ftalato ácido de potasio (KHP). Filtrar muestras con filtro membrana de 0,45 µm (Whatman). Lavar filtros previamente con agua tipo TOC (100 mL cada lavado) filtro de 47 mm. Leer muestras a pH ambiente. Leer el cero con agua tipo TOC (blanco). Lectura se efectúa con la medición de 2 muestras filtradas de la muestra a temperatura ambiente. El promedio se reporta en cm<sup>-1</sup>.

4- Para la determinación de la prueba umuC Easy AQ: Ensayo de Genotoxicidad en microplacas (Formato 1 Día) para pruebas de muestras de agua, se contó con la técnica descrita en el anexo 2.



## RESULTADOS

### **1- Validación de la cuantificación de trihalometanos en agua por cromatografía de gases con detector de masas**

Se evaluaron los parámetros de veracidad, repetibilidad, reproducibilidad, incertidumbre y los límites de cuantificación y detección, según los parámetros de la EURACHEM y la INTE/ISO-17025, el siguiente cuadro resume las definiciones adoptadas y los criterios de aceptación. Los valores que se toman como exactos se prepararon a partir de una disolución de concentración conocida lote LB61414.

Cuadro 3: Definición y criterios de aceptación de los parámetros de validación en la cuantificación de Trihalometanos en agua potable por cromatografía de gases – masas.

<b>Parámetro</b>	<b>Definición</b>	<b>Evaluación</b>	<b>Criterio de aceptación</b>
Veracidad	Es la proximidad de concordancia entre el valor promedio obtenido de una serie grande de resultados de prueba y un valor de referencia aceptado.	$Z =  x - X  / s$	$Z \leq 2$ satisfactorio $2 < Z < 3$ cuestionable $Z \geq 3$ no satisfactorio
Repetibilidad	Grado de concordancia entre datos obtenido aplicando un mismo procedimiento, sobre una misma muestra, con el mismo operador, en intervalos cortos de tiempo, utilizando el mismo equipamiento, dentro de un mismo laboratorio, es decir bajo las mismas condiciones.	$CV = s / X$  $s =$ desviación estándar  $X:$ promedio	$CV < 2$
Reproducibilidad	Grado de concordancia entre datos o resultados obtenido aplicando un mismo procedimiento, sobre una misma	$CV = s / X$  $s =$ desviación	Menor a tres veces al valor de repetibilidad.

	muestra, en diferentes laboratorios, distintos operadores, con diferente equipamiento.	estándar  X: promedio	
Incertidumbre	Es un parámetro, asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que pueden atribuirse razonablemente al mensurando.	1. Desviación estándar. 2. Arrastre de incertidumbre.	Se calcula tanto la desviación estándar como el arrastre de incertidumbre, se utiliza la incertidumbre mayor
Límite de detección	Concentración mínima de un analito en la matriz de una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo condiciones analíticas específicas.	$x_L = x_{BL} + k_{sbl}$	Menor al máximo permitido para el reglamento de aguas potables
Límite de cuantificación	Concentración mínima de analito en la matriz de una muestra que puede ser cuantificada con una exactitud y precisión aceptable bajo condiciones analíticas específicas.	$LQ = kQ\sigma_Q$	Menor al máximo permitido para el reglamento de aguas potables

Recopilación y síntesis de Ricardo Coy.

Cuadro 4: Resultados de validación de cuantificación de trihalometanos en agua potable por cromatografía de gases con detector de masas.

Parámetro validación	Cloroformo	Bromo diclorometano	Dibromoclorometano	tribromometano
<b>Exactitud</b>	Aceptable	Acetable	Aceptable	Aceptable
<b>Precisión</b>	25%	25%	25%	25%
<b>Límite detección (µg/L)</b>	39	12	40	29
<b>Límite cuantificación (µg/L)</b>	118	36	98	86
<b>Linealidad</b>	Aceptable	Aceptable	Aceptable	Aceptable

Cuadro 5: Valores del parámetro Z en la evaluación de la exactitud en la cuantificación de trihalometanos en aguas potables con cromatografía de gases con detector de masas.

Trihalometano	Fórmula	Valor Z
<b>Cloroformo</b>	CHCl <sub>3</sub>	0,2
<b>Bromo diclorometano</b>	CHBrCl <sub>2</sub>	0,1
<b>Dibromoclorometano</b>	CHBr <sub>2</sub> Cl	0,6
<b>Tribromometano</b>	CHBr <sub>3</sub>	0,3

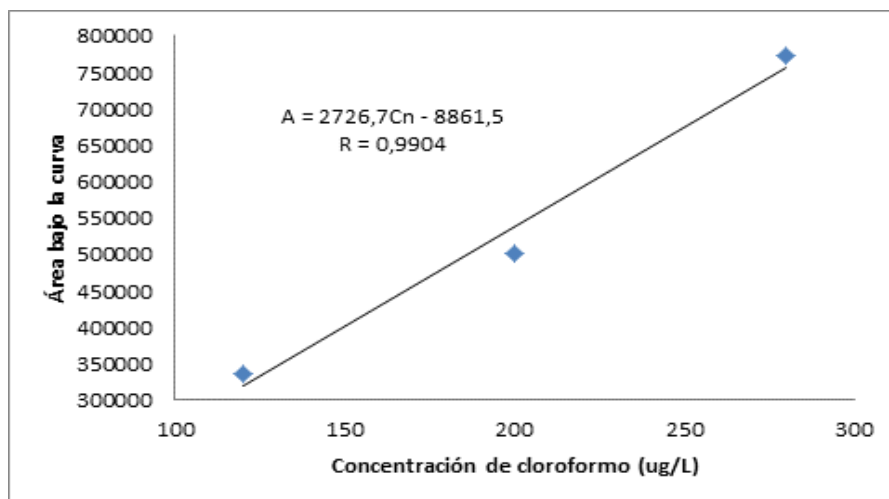


Figura 1: Curva de calibración para la cuantificación de cloroformo por cromatografía de gases con detector de masas.

Cuadro 6 : Valores de la incertidumbre de la recta de mejor ajuste y cálculo estadístico de los límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LC) para la cuantificación de cloroformo por cromatografía de gases con detector de masas.

Incertidumbre Recta Mejor Ajuste							
$Y_{int}$	$(Y - Y_{int})$	$(Y - Y_{int})^2$	n	$S_{y/x}$	$x^2$	$S_m$	$S_b$
336070,000	-139,000	1,9E+04	3	52891,3653	14400,00000	467	98360
554209,000	-52891,000	2,8E+09			40000,00000	LD	LC
772348,000	-139,000	1,9E+04			78400,00000	39	118

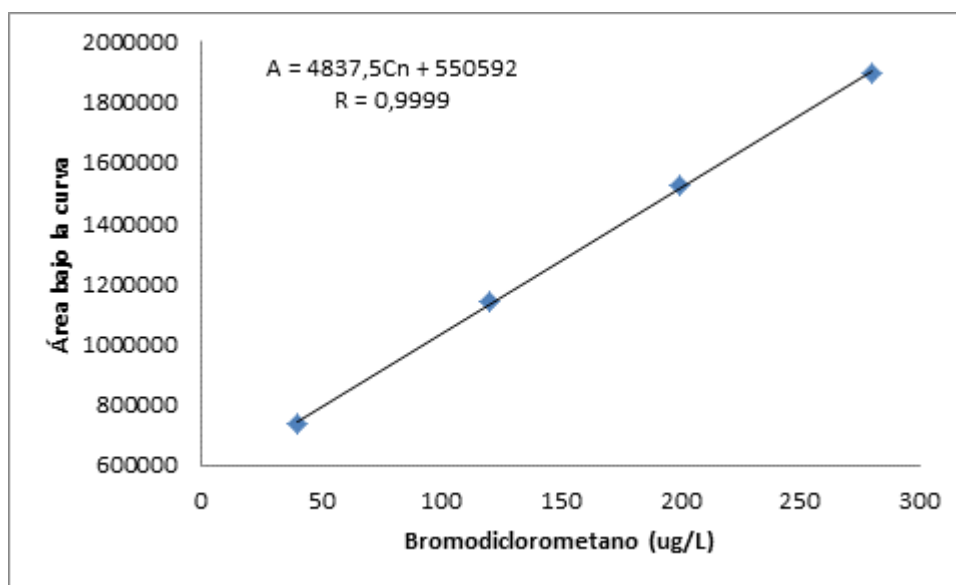


Figura 2: Curva de calibración de cuantificación para bromodichlorometano por cromatografía de gases con detector de masas.

Cuadro 7 : Valores de la incertidumbre de la recta de mejor ajuste y cálculo estadístico de los límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LC) para la cuantificación de bromodichlorometano por cromatografía de gases con detector de masas.

Incertidumbre Recta Mejor Ajuste							
$Y_{int}$	$(Y-Y_{int})$	$(Y-Y_{int})^2$	n	$S_{y/x}$	$x^2$	$S_m$	$S_b$
744092,200	-7683,200	5,9E+07	4	10124	1600	57	10374
1131091,900	9074,100	8,2E+07			14400		
1518091,600	4901,400	2,4E+07			40000	LD	LC
1905091,300	-6292,300	4,0E+07			78400	12	36

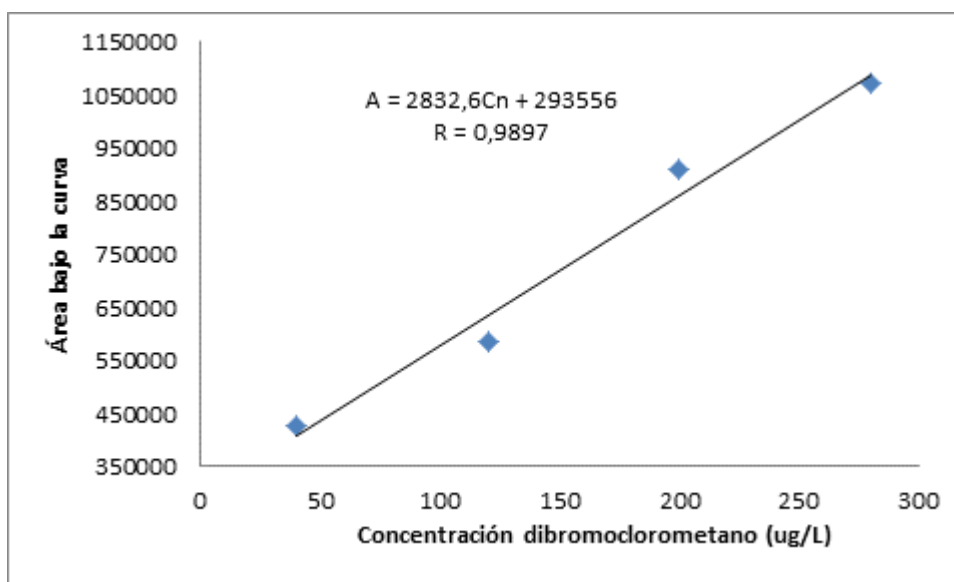


Figura 3: Curva de calibración para la cuantificación de dibromoclorometano por cromatografía de gases con detector de masas.

Cuadro 8 : Valores de la incertidumbre de la recta de mejor ajuste y cálculo estadístico de los límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LC) para la cuantificación de dibromoclorometano por cromatografía de gases con detector de masas.

Incertidumbre Recta Mejor Ajuste							
$Y_{int}$	$(Y-Y_{int})$	$(Y-Y_{int})^2$	n	$S_{y/x}$	$x^2$	$S_m$	$S_b$
406860,400	17610,600	3,1E+08	4	51884	1600	290	53165
633468,800	-50406,800	2,5E+09			14400		
860077,200	47981,800	2,3E+09			40000	LD	LC
1086685,600	-15185,600	2,3E+08			78400	33	98

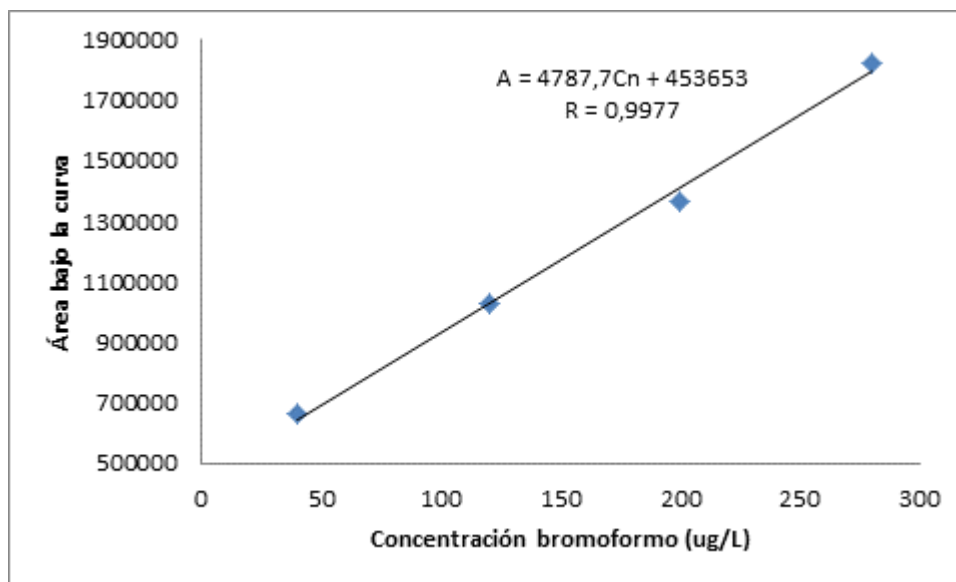


Figura 4: Curva de calibración para la cuantificación de bromometano por cromatografía de gases con detector de masas.

Cuadro 9 : Valores de la incertidumbre de la recta de mejor ajuste y cálculo estadístico de los límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LC) para la cuantificación de bromoformo por cromatografía de gases con detector de masas.

Incertidumbre Recta Mejor Ajuste							
$Y_{int}$	$(Y - Y_{int})$	$(Y - Y_{int})^2$	$n$	$S_{y/x}$	$x^2$	$S_m$	$S_b$
645161,300	16241,700	2,6E+08	4	41072	1600	230	42086
1028177,600	-1265,600	1,6E+06			14400		
1411193,900	-46193,900	2,1E+09			40000	LD	LC
1794210,200	31217,800	9,7E+08			78400	29	86

## **2 - Determinación y cuantificación de Trihalometanos (THMs).**

### **Uso de las fibras de extracción de los compuestos:**

El análisis se llevo a cabo mediante la técnica de micro extracción en fase solida, que consiste en la absorción y concentración de los análitos de interés en una fase estacionaria de polaridad adecuada para su posterior desorción mediante un gas de arrastre en un cromatógrafo de gases.

Se utilizaron fibras de Carboxen/Polidimetilsiloxane Stable Flex de 85 µm light Blue (85 µm CAR/PDMS) de Supelco dado que estudios realizados anteriormente señalan esta fase estacionaria y grosor como las mas optimas para la determinación de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) halogenados.

### **Parámetros HS-SPME**

Tanto las muestras de agua potable como los estándares de compuestos halogenados volátiles se procesaron en viales de vidrio ámbar de 2 oz con septum de Politetrafluoroetileno (PTFE). El volumen de extracción utilizado fue de 30 mL con una profundidad de fibra de 3,2 cm expuesta a la cabeza de aire (HS), la temperatura de extracción utilizada fue de 45°C con una agitación de 300 RPM. El tiempo de absorción fue de 30 minutos mientras que el de desorción en el inyector se fijó en 4 minutos, posterior a la inyección las fibras se acondicionaron por 25 min en contacto con una corriente de Helio a 270 °C para eliminar residuos remanentes y su posterior reutilización

En el tiempo de estudio se procesaron las siguientes muestras:

Cuadro 10: Códigos, fechas y naturaleza de las muestras procesadas.

Muestra			Código	Fecha y hora de la toma	Fecha y hora del análisis
Planta (Laboratorio CEQIATEC).	Tratamiento de agua potable	Cartago	LP-001	10/12/12 a las 10:00 horas	10/12/12 a las 10:10 horas
Planta (Laboratorio de agua potable)	Tratamiento	Cartago	LP-002	10/12/12 a las 14:00 Horas	10/12/12 a las 14:10 horas
Planta (Laboratorio de agua potable)	Tratamiento	Cartago	LP-003	13/12/12 a las 10:05 Horas	13/12/12 a las 11:30 Horas
Planta (Laboratorio de agua potable)	Tratamiento	Cartago	LP-004	13/12/12 a las 10:05 Horas	13/12/12 a las 13:30 Horas
Planta (Laboratorio de agua potable)	Tratamiento	Cartago	LP-005	17/12/12 a las 10:50 Horas	17/12/12 a las 11:30 Horas
Planta (Laboratorio de agua potable)	Tratamiento	Cartago	LP-006	17/12/12 a las 10:50 Horas	17/12/12 a las 13:03 Horas
Planta (Laboratorio de agua potable)	Tratamiento	Cartago	LP-007	16/02/13 a las 15:30 Horas	16/02/13 a las 15:35 Horas
Planta (Laboratorio de agua potable)	Tratamiento	Cartago	LP-008	02/03/13 a las 12:40 Horas	02/03/13 a las 12:45 Horas
Planta (Laboratorio de agua potable)	Tratamiento	Cartago	LP-009	24/06/13 a las 12:00 Horas	24/06/13 a las 12:10 Horas
Planta de Tratamiento (casa)	AyA Moravia		CD-001	18/12/12 a las 08:20 Horas	18/12/12 a las 10:51 Horas
Planta de Tratamiento (casa)	AyA Moravia		CD-002	18/12/12 a las 08:20 Horas	18/12/12 a las 11:58 Horas
Planta de Tratamiento de (casa)	AyA Guadalupe		CD-003	18/12/12 a las 08:40 Horas	18/12/12 a las 13:48 Horas
Planta de Tratamiento de (casa)	AyA Guadalupe		CD-004	18/12/12 a las 08:40 Horas	18/12/12 a las 14:48 Horas
Planta de Tratamiento (casa)	AyA Pavas		CD-005	15/02/13 a las 19:50 Horas	16/02/13 a las 14:30 Horas
Sistema Lankaster, Ebais San Blas			CD-006	19/12/12 a las 08:30 Horas	19/12/12 a las 10:48 Horas
Sistema Lankaster, Ebais San Blas			CD-007	19/12/12 a las 08:30 Horas	19/12/12 a las 11:49 Horas
Sistema Rio Loro, Costado Norte Esc			CD-008	19/12/12 a las 09:00 Horas	19/12/12 a las 13:20 Horas
Sistema Rio Loro, Costado Norte Esc			CD-009	19/12/12 a las 09:00 Horas	19/12/12 a las 14:20 Horas
Sistema Navarro 1°Casa			CD-010	21/12/12 a las 09:30 Horas	21/12/12 a las 12:50 Horas
Sistema Navarro 1°Casa			CD-011	21/12/12 a las 09:30 Horas	21/12/12 a las 14:10 Horas
Planta Potabilizadora Av 5			CD-012	02/03/13 a las 11:00 Horas	02/03/13 a las 11:45 Horas
Planta Potabilizadora 100 sur corte			CD-013	13/04/13 a las 10:00 Horas	13/04/13 a las 10:45 Horas
Planta Tratamiento Plantel			CD-014	26/04/13 a las 12:00 Horas	27/04/13 a las 12:45 Horas
Planta de Tratamiento (casa)	AyA Pavas		CD-015	17/05/13 a las 20:30 Horas	18/05/13 a las 10:30 Horas
Planta de Tratamiento de (casa)	AyA Guadalupe		CD-016	17/05/13 a las 21:30 Horas	18/05/13 a las 11:30 Horas
Planta de Tratamiento de (casa).	AyA Moravia		CD-017	18/05/13 a las 7:30 Horas	18/05/13 a las 12:30 Horas
Naciente Arriaz			CD-018	17/05/13 a las 15:00 Horas	18/05/13 a las 13:30 Horas
Planta de Tratamiento de (casa).	AyA Moravia		CD-019	24/06/13 a las 07:30 Horas	24/06/13 a las 10:00 Horas
Planta de Tratamiento de (casa)	AyA Guadalupe		CD-020	24/06/13 a las 08:20 Horas	24/06/13 a las 11:00 Horas
Ladrillera Naciente			NC-001	21/12/12 a las 09:30 Horas	21/12/12 a las 11:40 Horas
Naciente San Blas Fab. Papas			NC-002	15/02/13 a las 16:00 Horas	16/02/13 a las 11:10 Horas
Naciente San Blas Fab. Papas			NC-003	15/02/13 a las 16:00 Horas	16/02/13 a las 12:10 Horas



Naciente Arriaz	NC-004	16/02/13 a las 09:30 Horas	16/02/13 a las 13:05 Horas
Naciente Arriaz	NC-005	16/02/13 a las 09:30 Horas	16/02/13 a las 14:00 Horas
Padre Méndez, Urb Atardecer	NC-006	23/02/12 a las 9:30 Horas	02/03/13 a las 14:10 Horas
Naciente Mata Guineo	NC-007	13/04/13 a las 10:00 Horas	13/04/13 a las 11:30 Horas
Red Loma larga Naciente Ortiga	NC-008	19/4/13 a las 11:00 Horas	27/4/13 a las 10:50 Horas
Naciente Red Alumbre	NC-009	19/4/13 a las 11:28 Horas	27/4/13 a las 11:30 Horas
Naciente la Misión San Blas	NC-010	26/4/13 a las 12:00 Horas	27/4/13 a las 12:00 Horas

A continuación se presentan los resultados de la cuantificación de THM en las muestras

Cuadro 11. Concentración de trihalometanos (THM) en las muestras correspondientes a Sistemas de tratamiento completo. En rojo los valores más alto del máximo permitido por Reglamento.

Código Muestra	Cloroformo (µg/L) (max permitido 200 µg/L)	Bromodichlorometano (µg/L) (max permitido 60 µg/L)	Dibromoclorometano (µg/L) (max permitido 100 µg/L)	Tribromometano (µg/L) (max permitido 100 µg/L)
LP-001	122,09	8,362	12,089	134,15
LP-002	75,12	6,206	8,015	23,276
LP-003	98,35	7,529	8,808	18,595
LP-004	135,23	7,841	9,474	20,585
LP-005	240,99	24,756	114,511	298,341
LP-006	272,76	22,918	101,771	246,035
LP-007	128	1,446	10,27	28,528
LP-008	37,5	2,36	3,71	8,83
LP-009	72,85	0	0	0
CD-001	373,02	27,531	105,366	244,348
CD-002	505,07	37,768	157,121	368,44
CD-003	355,08	21,703	62,781	117,907
CD-004	407,33	24,045	70,249	125,269
CD-005	5,57	1,446	6,496	9,094
CD-014	40,99	29,09	18,41	48,73
CD-015	0	0	0	2,97
CD-016	100,27	0,48	0	0
CD-017	187,47	0	0	0
CD-019	81,6	20,68	24,05	53,22
CD-020	153,46	4,8	0	0

El resaltado de color amarillo corresponde a muestras por duplicado muestreadas en la misma fuente y en el mismo momento, la diferencia en el tiempo de montaje es de 3 horas mantenidas a temperatura de refrigeración, nótese entonces el efecto de formación de subproductos continua en el tiempo.

Cuadro 12. Concentración de trihalometanos (THM) en las muestras correspondientes a Sistemas de cloración de Nacientes (solo cloro agregado).

Código Muestra	Cloroformo (µg/L) (max permitido 200 µg/L)	Bromodichlorometano (µg/L) (max permitido 60 µg/L)	Dibromoclorometano (µg/L) (max permitido 100 µg/L)	Tribromometano (µg/L) (max permitido 100 µg/L)
CD-006	6,08	1,628	3,748	5,699
CD-007	0	1,322	3,064	3,672
CD-008	10,32	1,809	2,729	4,719
CD-009	12,34	1,885	2,712	3,152
CD-010	14,63	2,959	5,187	10,24
CD-011	16,68	3,534	7,856	9,966
CD-012	31,5	2,96	10,94	22,79
CD-013	63,1	24,63	26,62	45,1
CD-018	18,36	16,1	6,68	18,47
NC-001	22,47	4,632	10,234	19,259
NC-002	0	8,442	19,444	26,429
NC-003	0	8,165	19,252	24,459
NC-004	0	0	5,131	11,676
NC-005	0	0	5,637	9,094
NC-006	0	1,46	3,66	4,45
NC-007	0,26	0,4	4,45	5,49
NC-008	0,00	2,19	3,65	24,24
NC-009 (1.6 mg/L)	183,9	294,68	83,4	90,25
NC-010	3,86	45,36	46,54	39,14

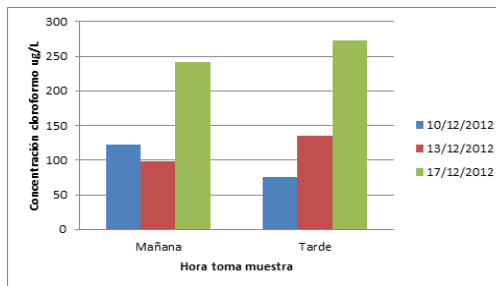
Como se puede notar solo una muestra del agua de naciente, en un subproducto, supera el máximo permitido (en rojo), a su vez se denota que esta muestra en específico posee un cloro residual extraordinariamente alto por error (1,6 mg/L) en el sistema de cloración, según fue mencionado por la Ing Ana Guzmán de la Municipalidad.

Las muestras correspondientes a las nacientes fueron recolectadas por la Municipalidad y llevadas al laboratorio. De acuerdo a controles anteriores se ha determinado un cloro residual promedio para este tipo de sistemas de 0,6 mg/L, mientras que para Sistemas de tratamiento completo en Cantón Central de Cartago, se maneja un promedio de 1,1 mg/L; la relación de cloro residual de las muestras con residuos de subproductos no tiene sentido, lo importante sería el cloro agregado o combinado en relación a la cantidad de materia orgánica disuelta en la muestra.

A continuación se muestran resultados comparativos por subproducto con respecto a día y hora, se muestra la variación de dichos valores tal y como se ha advertido en la literatura.

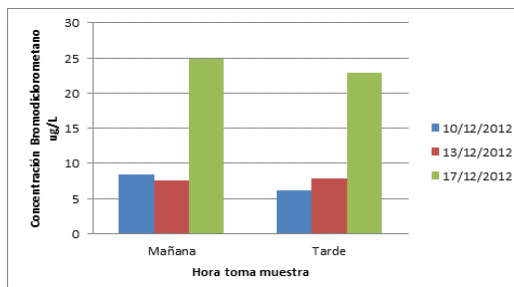
Cuadro 13: Comparación de cuantificación de **cloroformo** en muestras de agua potable de una misma fuente, a partir de la información del cuadro 10.

Muestra	Concentración en la mañana (µg/L)	Concentración en la tarde (µg/L)
10/12/2012	122±31	75±19
13/12/2012	98±25	135±34
17/12/2012	241±60	273±68



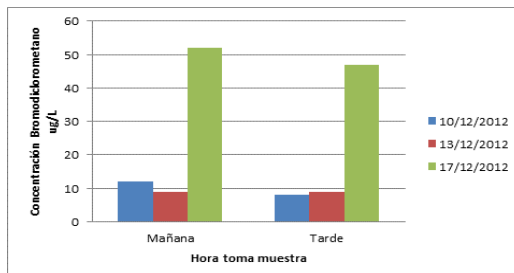
Cuadro 14: Comparación de cuantificación de **bromodichlorometano** en muestras de agua potable de una misma fuente, a partir de la información del cuadro 10.

Muestra	Concentración en la mañana (µg/L)	Concentración en la tarde (µg/L)
10/12/2012	8,4±1,2	6,2±1,6
13/12/2012	7,5±1,9	7,8±2,0
17/12/2012	24,8±6,2	22,9±5,7



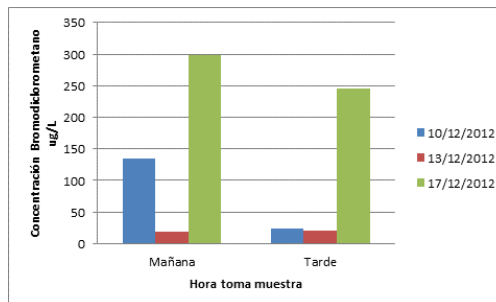
Cuadro 15: Comparación de cuantificación de **dibromoclorometano** en muestras de agua potable de una misma fuente, a partir de la información del cuadro 10.

Muestra	Concentración en la mañana (µg/L)	Concentración en la tarde (µg/L)
10/12/2012	12±3	8±2
13/12/2012	9±2	9±2
17/12/2012	52±13	47±12



Cuadro 16: Comparación de cuantificación de **bromoformo** en muestras de agua potable de una misma fuente, a partir de la información del cuadro 10.

Muestra	Concentración en la mañana (µg/L)	Concentración en la tarde (µg/L)
10/12/2012	134±34	23±6
13/12/2012	19±5	21±5
17/12/2012	298±75	246±62



**3- Con respecto a los resultados de Carbono orgánico total (TOC) se obtuvo tiene lo siguiente:**

A continuación se muestran los resultados del montaje de la curva de calibración para el estándar de carbono en la determinación del carbono orgánico total para niveles de concentración en rangos menores a 3,5 mg/L, correspondientes a los valores esperados para muestras de agua cruda subterránea y agua superficial tratada, a partir de muestras listas para cloración en los sistemas. En el cuadro 17 las absorbancias de los estándares y el agua tipo TOC (libre de orgánicos).

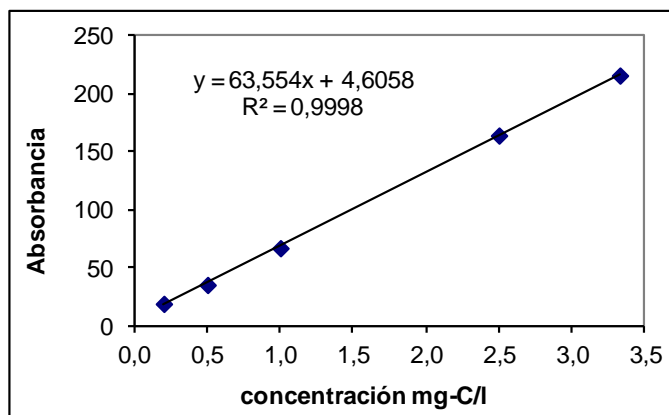


Figura 5: Curva de mejor ajuste para estándares de carbono para un rango bajo de concentración.

Cuadro 17: Datos requeridos para calibrar el analizador de carbono orgánico total.

<b>Muestra</b>	<b>concentración (mg/L)</b>	<b>absorbancia ajustada</b>	<b>absorbancia NDIR</b>
estándar 0,2	0,200	18,95	25,77
estándar 0,5	0,500	35,28	42,09
estándar 1,0	1,000	67,03	73,89
estándar 2,5	2,500	164,26	171,28
estándar 3,33	3,330	216,07	223,28
agua toc	0,033	6,72	13,75

Cuadro 18: Resultados nacientes y planta de tratamiento para carbono orgánico total

<b>Muestra</b>	<b>Valor Promedio (mg/L)</b>
<b>Planta de Tratamiento Río Tapantí (agua superficial)</b>	2,3 ± 0,3
<b>Naciente San Blas</b>	0,51 ± 0,03
<b>Naciente El Rodeo</b>	1,26 ± 0,10
<b>Naciente San Guillermo</b>	0,29 ± 0,03
<b>Naciente El Vapor</b>	0,31 ± 0,03

Las muestras de agua de naciente de El Rodeo, San Guillermo y el Vapor mostraron absorbancias de carbono orgánico total apenas 3 unidades de absorbancia más que la absorbancia del agua libre de orgánicos y 10 unidades de absorbancia inferior al estándar de menor concentración de 0,200 mg-C/L. Por tanto, las muestras de agua de las nacientes indicadas mostraron concentraciones inferiores a 0,200 mg-C/L, dado la baja cantidad de carbono orgánico encontrada en las nacientes, la práctica ausencia de subproductos

encontrados en las muestras cloradas se descarta relación de influencia del tipo de suelo en la formación de tipos específicos de subproductos.

Las muestras de agua cumplen con el criterio de conformidad con la técnica de potabilización con relación a la concentración de carbono orgánico total que debe ser menor a 2,0 mg/L de TOC. No obstante, este valor debe ser obtenido como un promedio anual calculado con base a muestreos cada tres meses o cada mes.

#### **4- Ensayos de genotoxicidad :**

A este respecto se tiene que el proyecto se atrasó en el montaje de las muestras por dos años, debido a problemas con el equipo de medición (GC-MS). Al inicio del proyecto se compró los estándares de los trihalometanos MIX A y MIX B de los cuales solo se pudo usar el MIX A pues MIX B ya estaba descompuesto en el momento de usarlo, así como el Kit de genotoxicidad. De los 12 reactivos necesarios para montar los ensayos 2 estaban descompuestos razón por la cual y por la premura de la entrega de este informe no se pudieron adquirir los que faltaban (se deben de importar directamente desde Brasil), no obstante los mismos ya están pedidos y el ensayo se montará en el segundo semestre y se tomará en cuenta este resultado para la escritura de un artículo.

### **Discusión**

El gran reto de la medición a nivel de ultratrazas es la incertidumbre asociada, a niveles más bajos de concentración, la repetibilidad y la reproducibilidad de las mediciones son mayores, esto se refleja incluso en los insumos adquiridos como patrón primario, el cual reporta una desviación estándar del 25% en las concentraciones, lo cual sería inaceptable a nivel de análisis de trazas o componentes menores.

A pesar del nivel de desvío reportado (del 25%) las mediciones experimentales mostraron tener una buena precisión, sin embargo en el momento de reportar los valores obtenidos, no es conveniente asignar un valor de precisión menor que el reportado para el valor de concentración del patrón primario, el cual se utiliza para hacer la curva de calibración (obtuvimos incertidumbres menores al 25%, decidimos no ponerlo así, porque el patrón ya tenía un desvío del 25%).

Los valores de exactitud muestran qué tanta desviación hay del valor calculado por el método de cromatografía de gases con detector de masas del valor considerado como real. Para la medición se utilizó un estándar tipo primario con trazabilidad al NIST. Para la determinación se utilizaron patrones con las concentraciones más diluidas de las curvas de concentración, debido a que son las que tendrían más problemas por incertidumbre asociada a la medición. En

las condiciones descritas, los trihalometanos utilizados presentaron desviación por debajo de las tres desviaciones estándar.

Los límites de detección y cuantificación se calcularon de dos maneras distintas. La primera manera considera distribuciones gaussianas, (nos referimos a métodos que consideran desviación estándar según las definiciones del cuadro de validación), sin embargo presenta el problema de que los datos de área bajo la curva son valores altos, lo que incrementa la incertidumbre en el eje de las ordenadas. Por otro lado también se calcularon de forma empírica, en donde el método mostró tener mayor robustez que la predicción estadística. Los valores de cuantificación se tomaron a partir de reportes de la literatura.

Se contó con muestras de agua de varias fuentes: agua cruda subterránea (naciente) sin clorar (para carbono orgánico total), agua subterránea clorada y agua de sistemas de tratamiento de agua (superficial) obviamente clorada.

Para la determinación de los subproductos de desinfección como trihalometanos, fueron analizadas 39 muestras de agua, provenientes de fuentes de agua subterránea (nacientes) administradas por la Municipalidad del Cantón Central de Cartago y agua de origen superficial (Plantas de tratamiento completo) dispensada por los sistemas de Tratamiento de AyA/Cantón Central de Cartago, y los Sistemas de Tratamiento de AyA de Moravia, Guadalupe y Pavas, con un total de 156 subproductos determinados y cuantificados, correspondiendo estos a: cloroformo, bromodiclorometano, dibromoclorometano y tribromoclorometano.

En las muestras de agua de sistemas de tratamiento completo se encontró que de 80 subproductos analizados, 12 de estos superaron el máximo admisible de acuerdo al Reglamento Nacional de Calidad de Agua para consumo humano, mientras que de los acueductos abastecidos de aguas subterráneas administrados por la Municipalidad de Cartago, de 76 subproductos analizados solo uno de ellos superó el valor máximo permitido.

Se pudo determinar tal y como lo muestra la literatura, que la formación de subproductos se ve favorecida con el aumento en la dosis de cloro (no con el cloro residual) y con el aumento del tiempo de contacto agua-cloro, ya que está comprobado que los contenidos de THMs a la salida de las plantas de tratamiento se incrementan posteriormente en muchos casos en la red, debido principalmente al mayor tiempo de contacto con la materia orgánica, con sustancias orgánicas que forman biofilmes en la red, cuando las muestras presentaban subproductos en altas concentraciones, estos tienden a aumentar con el tiempo incluso entre ensayos de muestras duplicadas tomadas en el mismo momento en la misma fuente, esto se pudo determinar en esta investigación también, y se mostró con las muestras (sombreadas en amarillo) del cuadro 11.

Lo anterior toma relevancia en aguas de plantas de tratamiento completo que permanecen almacenadas en tanques cerrados, pues dichos subproductos cuando están en alta cantidad tienden a aumentar con el tiempo sin poderse determinar cuánto.

En cuanto a la toxicidad de los subproductos encontrados se tiene que, con respecto al bromodiclorometano los efectos de exposición prolongada o repetida a dicho compuesto

pueden afectar al riñón e hígado por ingestión, dando lugar a alteraciones funcionales, y es posiblemente carcinógeno para los seres humanos.

Estudios en animales indican que la exposición prolongada al bromoformo o al dibromoclorometano puede producir cáncer del hígado y riñones. Aunque no se puede atribuir definitivamente casos de cáncer en seres humanos a la exposición a estas sustancias, esto es materia de preocupación especial, ya que mucha gente está expuesta a bajos niveles de bromoformo y dibromoclorometano en el agua potable clorada (ATSDR, 2005).

La probabilidad de ingerir bromoformo o dibromoclorometano en el agua potable clorada varía con la temporada, la temperatura del agua, la presencia de otras sustancias químicas en el agua, el método de desinfección y otros factores. Sin embargo, si hay evidencia de contaminación patógena (tales como bacterias, virus, etc.), los riesgos a la salud asociados con el consumo de agua no desinfectada son mucho más altos que el riesgo de exposición al bromoformo o al dibromoclorometano.

Hay métodos para tratar el agua que la gente usa en sus hogares que podrían reducir la exposición al bromoformo y el dibromoclorometano a través del agua potable clorada. Estos incluyen simples procedimientos como por ejemplo conectar filtros de carbón activado a los grifos para el agua.

La mayoría de estos subproductos solubles no duran mucho tiempo en el cuerpo, se estima un total de 8 horas, no obstante se debe tener verdadero cuidado en la ingesta de agua que se sienta con cargas altas de cloro residual, especialmente si provienen de sistemas de tratamiento de aguas superficiales, se adjunta la hoja de seguridad como ATSDR, 2005.

El agua para consumirse de forma segura debe clorarse, no obstante nuestro Reglamento de Calidad de Agua establece un máximo para Entes Operadores de Acueductos de 0,6 mg/L, todas las plantas de Tratamiento de Agua potable manejan niveles superiores a este, y no es usual que aguas de nacimiento cloradas superen ese límite.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El método de cuantificación por cromatografía de gases con detector de masas, mostró ser adecuado y robusto para la detección y cuantificación de trihalometanos, es conveniente seguir los estudios de reproducibilidad y repetibilidad para completar los parámetros necesarios para conseguir un análisis acreditado.

Se encontró que la aparición de subproductos es intermitente en las aguas muestreadas en un punto específico de sistemas de tratamiento completos o sea de agua superficial, tanto en Cartago como en San José, esto hace que medidas remediales como disminuir la concentración de cloro agregado y por ende el de cloro residual pueden tener un efecto positivo en el sentido de no superar los valores máximos permitidos de subproductos específicos, más del Reglamento de Calidad de Agua del país.



La diferencia entre la aparición de subproductos en cantidades que superan el máximo admisible de agua superficial y agua subterránea es diferente siendo en este sentido el consumo de agua de nacientes tratada, bastante segura para la población según los resultados de esta investigación.

Como medida adoptada por la Municipalidad del Cantón Central de Cartago se disminuyó el cloro agregado en el punto final de su planta de tratamiento y evitar las precloraciones por lo tanto están trabajando actualmente con residuales de 0,8 mg/L mucho menores que los valores anteriores de trabajo de 1,2 mg/L.

Por el tipo de resultados obtenidos no se encontró relación entre subproductos formados en aguas de nacientes cloradas y el tipo de suelo, (pues todas las nacientes corresponden a suelos diferentes según resultados de investigaciones anteriores), aunado a la poca concentración en las zonas de estudio del carbono orgánico total en el agua muestreada, solo la naturaleza de proveniencia del agua para consumo (superficial o subterránea) tuvo efecto en la formación de subproductos, esto implica cloro agregado al sistema de acuerdo al tipo de tratamiento o al tamaño de la población abastecida.

Valorar otro mix de estándares para otros subproductos mas tóxicos e inestables que está disponible actualmente en el mercado internacional, en nuestro caso lo compramos pero como el proyecto se atraso tanto no lo pudimos utilizar pues estaba descompuesto en el momento en que ya estaba listo el equipo y es el EPA 551B Halogenated Volatiles Mix que tiene estándares para los subproductos de: Bromocloroacetoneitrilo, Cloropicrina, Dibromoacetoneitrilo, Tricloroacetoneitrilo, 1-1-Dicloro-2 propanona, 1-1-1-Tricloropropanona.

En estudios posteriores se recomienda para abastecimientos de agua superficial el seguimiento de subproductos en altas concentraciones en agua almacenada.

Hacer seguimiento de formación de subproductos en invierno, pues se sabe que el cloro agregado en esa época es mayor.

## APORTES Y ALCANCES

Este trabajo se considera relevante en el manejo del agua en Costa Rica por cuanto es la primera vez que se determinan este tipo de subproductos en aguas y se contrastan tipos de agua superficial y subterránea.

Se documenta la presencia de subproductos tóxicos en el agua de consumo provenientes de plantas de tratamiento superficial, tales como el cloroformo, bromodiclorometano, dibromoclorometano y tribromoclorometano.

Es importante dimensionar el problema y educar a la población costarricense principalmente los Entes Operadores de Acueductos incluido el Laboratorio Nacional de Acueductos y Alcantarillados con respecto al riesgo de formación de subproductos: entre mas cloro se agregue a las aguas dispensadas, mayor es el riesgo en la formación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos. (Mayo de 2000). *Environmental Protection Agency EPA*. Recuperado el 30 de Mayo de 2013, de <http://water.epa.gov/drink/agua/losninos.cfm>
2. Aggazzotti, G., Righi, E., Fantizzi, G., Biasotti, B., Ravera, G., Kanitz, S., y otros. (2004). Chlorination by-products (CBPs) in drinking water and adverse pregnancy outcomes in Italy. *Journal of Water and Health* , 233-247.
3. Albaladejo, R., Villanueva, R., Ortega, P., Astasio, P., Gil, A., Granados, B., y otros. (1995). Evaluación de la actividad mutagénica de aguas de consumo público por medio del test de Ames. *Rev. Esp. Salud Pública* , 69, 393-408.
4. ANIARA. (October de 2010). ANIARA. Recuperado el 01 de Junio de 2013, de <https://www.aniara.com/pdf/SS-ANIARA-Technical-Doc-MPF.pdf>.
5. Avila-Pérez, P. (2002). Evaluación de la genotoxicidad del agua y sedimento de la presa J.A. Alzate. *XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, 27 al 31 de octubre 2002*. Cancún, México.
6. Berdonces, J. L. (2008). La problemática del tratamiento del agua potable. *Medicina naturista* , 2 (2), 69-75.
7. Calderón, J., Capell, C., Centrich, F., Artazcoz, L., González-Cabré, M., & Villalbí, J. (2002). Subproductos halogenados de la cloración en el agua de consumo público. *Gaceta Sanitaria* , 16 (3), 241-243.
8. Camargo, M., González, S., & Escobar, H. (s.f.). Control de subproductos de desinfección en sistemas de abastecimiento de dos municipios colombianos. *Seminario Internacional: Visión Integral en el Mejoramiento de la Calidad del Agua*, (págs. 1-9).
9. Dodds, L., King, W., Allen, A., Armson, A., Fell, D., & Nimrod, C. (2004). Trihalomethanes in Public Water Supplies and Risk of Stillbirth. *Epidemiology* , 15 (2), 179-186.
10. Granados, B., Albaladejo, R., Villanueva, R., Anadón, M., & Dominguez-Rojas, V. (2004). Mutagenicidad en aguas de consumo mediante el test de reversión trp-en *Escherichia coli*. *Rev. Toxicol.* , 21, 87-91.
11. Gopal K, S, Bersillon J, Dubey S. (2006). Chlorination byproducts, their toxicodynamics and removal from drinking water. *J Hazard Mater*, 140(1-2):1-6.
12. Hernández Sánchez, C., Luis González, G., Rubio Armendáriz, C., Caballero Mesa, J., Ben-Charki El-Mousati, N., & Hardisson de la Torre, A. (2011). Trihalometanos en aguas de consumo humano. *Rev.Toxicol.* , 28, 109-114.

13. King, W., Dodds, L., Armson, A., Allen, A., Fell, D., & Nimrod, C. (2004). Exposure assessment in epidemiologic studies of adverse pregnancy outcomes and disinfection byproducts. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* , 14, 466-472.
14. Kogevinas, M., Villanueva, C., Font-Ribera, L., Liviach, D., Bustamante, M., Espinoza, F., y otros. (2010). Genotoxic Effects in Swimmers Exposed to Disinfection By-products in Indoor Swimming Pools. *Environmental Health Perspectives* , 118 (11), 1531-1537.
15. Lewis, C., Suffet, I., Hoggatt, K., & Ritz, B. (2007). Estimated Effects of Disinfection By-products on Preterm Birth in a Population Served by a Single Water Utility. *Environmental Health Perspectives* , 115 (2), 290-295.
16. Liviach, D. M. (2010). *Riesgo genotóxico de los subproductos de la desinfección del agua*. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Departamento de Genética i de Microbiologia, Barcelona.
17. Liviach, D., Creus, A., & Marcos, R. (2010). DNA damage induction by two halogenated acetaldehydes, byproducts of water disinfection. *Water Research* , 44, 2638-2646.
18. Liviach, D., Creus, A., & Marcos, R. (2009). Genotoxicity analysis of two halonitromethanes, a novel group of disinfection by-products (DBPs), in human cells treated in vitro. *Environmental Research* , 109, 232-238.
19. Liviach, D., Creus, A., & Marcos, R. (2009). Genotoxicity analysis of two hydroxyfuranones, byproducts of water disinfection, in human cells treated in vitro. *Environmental and Molecular Mutagenesis* , 50, 413-420.
20. Mosquera, M., Hidalgo, J., & Forjan, E. (2009). Evaluación del contenido en trihalometanos en aguas de consumo de municipios de una Zona de Abastecimiento. *Hig. Sanid. Ambient.* , 9, 404-411.
21. Nieuwenhuijsen, M., Grellier, J., Smith, R., Iszatt, N., Bennett, J., Best, N., y otros. (2009). The epidemiology and possible mechanisms of disinfection by-products in drinking water. *Philosophical Transactions of The Royal Society A* , 367, 4043-4076.
22. Nieuwenhuijsen, M., Martínez, D., Grellier, J., Bennett, J., Best, N., Iszatt, N., y otros. (2009). Chlorination Disinfection By-Products in Drinking Water and Congenital Anomalies: Review and Meta-Analyses. *Environmental Health Perspectives* , 117 (10), 1486-1493.
23. Nieuwenhuijsen, M., Smith, R., Golfinopoulos, S., Best, N., Bennett, J., Aggazzotti, G., y otros. (2009). Health impacts of long-term exposure to disinfection by-products in drinking water in Europe: HIWATE. *Journal of Water and Health* , 185-207.
24. Ochoa Barajas, H. A. (2004). *Desinfectante y nuevas tecnologías utilizadas en el tratamiento del agua potable. Trabajo de investigación para optar por el título de especialista en Química Ambiental* . (D. G. Ortiz, Ed.) Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química.
25. Organización Mundial de la Salud, (OMS). (2006). *Organización Mundial de la Salud*. Recuperado el 20 de Mayo de 2013, de [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq3\\_es\\_full\\_lowres.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_full_lowres.pdf)
26. Organización Mundial de la Salud, O. (Noviembre de 2004). *World Health Organization*. Recuperado el 20 de Mayo de 2013, de [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/WSHFact-Spanish.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/WSHFact-Spanish.pdf)
27. Porter, C., Putnam, S., Hunting, K., & Riddle, M. (2005). The Effect of Trihalomethane and Haloacetic Acid Exposure on Fetal Growth in a Maryland County. *American Journal of Epidemiology* , 162 (4), 334-344.
28. Rahman, B., Driscoll, T., Cowie, C., & Armstrong, B. (2010). Disinfection by-products in drinking water and colorectal cancer: a meta-analysis. *International Journal of Epidemiology* , 39, 733-745.
29. República de Costa Rica. (Martes 03 de Mayo de 2005). Reglamento de calidad del agua potable, N° 32327-S. *Diario Oficial La Gaceta N° 84* , págs. 80-60.

30. Ríos, D. (s.f.). *Riesgos biológicos y subproductos de la desinfección en el agua bebida*. Tesis de Maestría: Magister en Ingeniería Ambiental, Universidad Oriental del Uruguay, Facultad de Ingeniería, Uruguay. Fuente original: Xie F. Yuefeng. 2004. *Disinfection By Products in Drinking Water. Formation, Analysis and Control*, Lewis Publishers, 154 pp.
31. Rosero, M., Latorre, J., Torres, W., & Delgado, L. (s.f.). Presencia de materia orgánica y subproductos de la desinfección con cloro. Caso sistema de tratamiento de agua para consumo humano, Puerto Mallarino, Cali-Colombia. *Seminario Internacional: Visión Integral en el Mejoramiento de la Calidad del Agua*, (págs. 1-10).
32. Sánchez Zafra, A. (2008). Efectos de los trihalometanos sobre la salud. *Higiene y Salud Ambiental* (8), 280-290.
33. Sánchez, L. D., Rodríguez, S., Escobar, J. C., & Torres, P. (2010). Modelación del cloro residual y subproductos de la desinfección en un sector piloto del sistema de distribución de agua potable de la ciudad de Cali. *Ingeniería y Competitividad*, 12 (1), 127-138.
34. Sandoval, A. M., & Ruíz, A. (1997). Recuperado el 01 de Junio de 2013, de <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/impactos/mexicon/R-0197.pdf>
35. Sarmiento, A., Rojas, M., Medina, E., Olivet, C., & Casanova, J. (2003). Investigación de trihalometanos en agua potable del Estado de Carabobo, Venezuela. *Gaceta Sanitaria*, 17 (2), 137-143.
36. Taquez, M. A. (2011). *Evaluación de la mutagenicidad en aguas del río Cauca en la ciudad de Cali utilizando el test de Ames*. Trabajo de grado para optar por el título de Química, Universidad del Valle, Facultad de Ciencias Naturales y exactas, Programa Académico de Química, Santiago de Cali.
37. Villanueva, C., Cantor, K., Cordier, S., Jaakkola, J., King, W., Lynch, C., y otros. (2004). Disinfection Byproducts and Bladder Cancer: A pooled Analysis. *Epidemiology*, 15, 357-367.
38. Villanueva, C., Cantor, K., Grimalt, J., Malats, N., Silverman, D., Tardon, A., y otros. (2007). Bladder Cancer and Exposure to Water Disinfection By-Products through Ingestion, Bathing, Showering and Swimming in Pools. *American Journal of Epidemiology*, 165 (2), 148-156.
39. Vuolo, J., Domenech, A., Friedrichs, M., Siroti, D., Casamayore, M., Temporale, R., y otros. (s.f.). (O. P. (PAHO), Ed.) Recuperado el 15 de Mayo de 2013, de <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/argentina14/vuolo.pdf>
40. Yassi, A., Kjellstrom, T., De Kok, T., & Guidotti, T. L. (2002). *Salud Ambiental Básica* (Primera edición ed.). Oficina Regional para América Latina y el Caribe: Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, Organización Mundial de la Salud y el Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología de Cuba.

ATSDR. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. Resumen de Salud Pública para Bromoformo y Dibromoclorometano, 2005

## ANEXOS

### ANEXO 1:

#### **Preparación de la cristalería, reactivos, estándares para la medición del carbono orgánico total (TOC) en agua cruda y tratada**

1. Toda la cristalería volumétrica y pipetas deben ser clase A y deben ser utilizadas únicamente para el análisis de TOC. Cada estándar de concentración dada debe contenerse en una única cristalería. Para estándares con concentraciones inferiores a 1 ppm C, se debe emplear balón aforado de 2 L, porque hay menos área superficial por volumen y por tanto, menos probabilidad de contaminación con carbono. Toda la cristalería se lava con detergente biodegradable, se enjuaga con agua del tubo, luego agua ultra pura y finalmente con acetona y se deja secando en estufa a 150 °C durante 2 horas. Sumergir toda la cristalería, botellas y cierres en HNO<sub>3</sub> al 0,5 % por 8 horas.
2. Se llena la cristalería y botellas con disolución ácida, se colocan septos y cierres en un beaker con disolución ácida. Se enjuaga 5 veces con agua tipo 1.
3. Para la cristalería que contiene las disoluciones de estándares se reutiliza el mismo contenedor y frasco volumétrico para cada concentración. Para la cristalería que contiene el agua tipo 1 como botellas del automuestreador y los viales, no relave con jabón. El relavado contamina la superficie limpia con carbono, en su lugar, se empieza en el paso 2 horas.

#### **Preparación de reactivos y de estándares**

##### Reactivo ácido (w/w)

Añadir 188 ml de agua tipo 1 a botella de vidrio lavada, luego añada 37 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 85 %. Tiempo de anaquel 1 mes.

##### **Reactivo Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> al 10 % en H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 5 % (w/w)**

Medir 50 g de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> y añadir a botella de vidrio lavada. Luego añadir 426 ml de agua tipo 1, mezclar; añadir 18 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y mezclar. Mantener alejado de luz solar y esperar al menos 8 horas antes de usar. Sonicar en baño de agua sin la tapa por 5 minutos para eliminar el dióxido de carbono. Alternativamente, la disolución puede dejarse en agitación magnética (sin tapa) durante el período de 8 horas. Tiempo de anaquel es de hasta 3 semanas.

#### **Preparación de estándares**

Disolución madre de KHP-1000 mg-C/L

Desecar a 105 °C el KHP durante 2 horas antes de preparar la disolución. Pesar exactamente 2,1250 g de KHP en papel para pesar y transferir sólido a beaker para su disolución. Trasvasar cuantitativamente a balón de 1 l con agua tipo 1. Pesar papel más residuo. Llevar a marca de aforo y homogenizar.

Estándar de 10 mg-C/L: tome alícuota de 5 ml de la disolución madre y lleve a balón de 500 ml, aforo con agua tipo 1.

Estándar de 8 g-C/L: tome alícuota de 4 ml de la disolución madre y lleve a balón de 500 ml, aforo con agua tipo 1.

Estándar de 6 mg-C/L: tome alícuota de 3 ml de la disolución madre y lleve a balón de 500 ml, aforo con agua tipo 1.

Estándar de 2 mg-C/L: tome alícuota de 1 ml de la disolución madre y lleve a balón de 500 ml, aforo con agua tipo 1.

Estándar de 0,5 mg-C/L: tome alícuota de 1 ml de la disolución madre y lleve a balón de 2000 ml, aforo con agua tipo 1.

Tomar una muestra del supernatante para análisis de TOC utilizando pipetas de boca ancha de 25 mL a una profundidad de 10 cm debajo de la superficie. Utilizar frascos color ámbar con taparrosca de teflón. El frasco se llena sin que queden burbujas o headspace; tomar un volumen de muestra de 120 ml. Preservar muestras en hielo a 4 °C o refrigerar y analizar lo antes posible en el laboratorio.

## ANEXO 2

### **Prueba umuC Easy AQ: Ensayo de Genotoxicidad en microplacas (Formato 1 Día) para pruebas de muestras de agua**

#### **Contenido del kit:**

- 2 viales que contienen *S. typhimurium* TA1535 [pSK1002] en un medio semi-sólido. Cada vial contiene 50 µL al que se le tiene que añadir 200µL de medio de TG justo antes del uso.
- 4 viales que contienen ampicilina estéril (4 x 50 µL at 50 mg/mL)
- 2 x 1,1 ml de solución de sustrato ONPG
- 100 µL de 2-mercaptoetanol
- 120 mL 1x medio TG (medio de concentración simple)
- 5 mL de 10x medio TG (medio concentrado 10 veces)
- 35 mL de B-buffer

- 30 mL reactivo de parada

### Equipos y material de trabajo que no se incluye en el Kit

- Agitador ambiental capaz de 37 ° C y 28 ° C, 150 a 250 rpm incubaciones
- Incubadora seca a 37 ° C
- Espectrofotómetro para medir la densidad óptica a 600 nm y cubetas
- Lector de microplacas capaz de leer a 420 y 600 nm
- Pipetas ajustables de 20 µL y 200µL y puntas estériles
- Pipetas de 8 canales de 5-50µL y 50-200 µL pipetas de 8 canales
- Tubos de 50 ml con tapa (filtro)
- Placas de microtitulación de 96 pocillos
- Depósitos de reactivos
- Pipetas de 5 ml y 10 mL
- Solventes para la dilución de muestras y control negativo (control de la dosis cero)
- Componentes del buffer S9 (S9 microsomal de extracto de hígado de rata) y cofactores

### Solución madre cofactor para S9:

Concentración del Patrón	Reactivo	PM	Volumen total	Cantidad	Almacenamiento
1.00 M	KCl	74.55	50 ml	3.728 g	4°C
0.25 M	MgCl <sub>2</sub> x6 H <sub>2</sub> O	203.31	50 ml	2.541 g	4°C
0.20 M	Glucose-6-P <sup>a</sup>	282.10	10 ml	0.564 g	-20°C
0.04 M	NADP <sup>b</sup>	765.40	10 ml	0.306 g	-20°C

a Glucosa-6-fosfato Sal sódica

b NADP sal sódica hidratada, PM de la forma anhidra

- Filtrar, esterilizar y almacenar como se indica (KCl y MgCl<sub>2</sub> también pueden ser esterilizados en autoclave)

### ❖ Procedimiento Día 1: Preparación Cultivo de una noche

Utilizando una técnica estéril, prepare un cultivo de una noche de la cepa siguiendo los siguientes pasos:

- Retire el vial de TA1535/pSK1002 del congelador. Deje reposar a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 minutos. Añadir 200µL de 1x medio de TG en el vial.
- Retire el vial de la ampicilina almacenada a -20 ° C y deje que se descongele a temperatura ambiente.
- Añada 10 ml de medio de TG 1x a un tubo de cultivo de 50 mL y 3 ml de 1x medio de TG a un tubo de control de esterilidad

- Añadir 10 $\mu$ L de ampicilina (50 mg / ml) al tubo con 10 ml de 1x TG medio (= medio TGA)
- Coloque una punta estéril en la pipeta y rompa mecánicamente con la punta, el pellet negro semi-sólido. Pipetee arriba y abajo hasta que se obtenga una suspensión uniforme que se puede pipetear repetidamente sin la obstrucción de la punta y que muestra visualmente una distribución homogénea de los fragmentos oscuros.
- Pipetee 50 $\mu$ L de la dispersión en el tubo con 10 ml de TGA medio y etiquételo como “cultivo”.
- Coloque las tapas en los tubos sin apretar y asegurar con cinta adhesiva. Después de asegurarlas, agítelo de un lado a otro sucesivamente. Esto interrumpe el sello y asegura que los cultivos reciban suficiente aireación para el crecimiento durante la noche completa.
- Incubar los tubos en un agitador a temperatura ambiente de 37 ° C, 250 rpm durante 14 -16 horas.

### ❖ Procedimiento Día 2

#### ***Determinación de los valores DO<sub>600</sub> de los cultivos de una noche***

Medición de la DO<sub>600</sub> del cultivo incubado durante la noche:

1. Añada 900 $\mu$ L de medio TG 1x a 2 cubetas.
2. Añada 900 $\mu$ L del tubo de control de esterilidad cultivado durante a la noche a la tercera cubeta.
3. Agite el contenido del tubo de cultivo y transfiera una alícuota de 100 $\mu$ L a una de las cubetas que contienen 900 $\mu$ L de 1x medio TG. Mezcle el contenido de la cubeta.
4. Ponga en el espectrofotómetro a 600 nm, la cubeta que contiene solo los 900 $\mu$ L de medio TG, la cual será el blanco.
5. Lea la DO<sub>600</sub> de las cubetas que contienen el cultivo de toda la noche y el control de esterilidad.
6. Multiplique la lectura de la DO<sub>600</sub> de las cubetas con cultivo por diez para obtener la densidad óptica real para el cultivo de una noche.
7. Compruebe que los valores DO<sub>600</sub> para el cultivo es de al menos 2,0 , y que el valor de DO<sub>600</sub> de control de la esterilidad es  $\leq 0,005$ . Utilice los cultivos para los siguientes pasos sólo si se cumplen estos criterios.

***Re-incubación de bacterias:*** Este paso asegura el crecimiento exponencial de las bacterias.

Diluya el cultivo de una noche 1:4 (2 ml de cultivo + 6 ml de 1x TG + 8 $\mu$ L de ampicilina) e incube durante aproximadamente 1,5 a 2 horas para obtener una DO<sub>600</sub> correspondiente a alrededor del 70-80% del DO original del cultivo de una noche. Una vez más, observe la correcta aireación del tubo. Durante este tiempo, prepare las diluciones de la muestra y las placas de prueba.

Mida la OD<sub>600</sub> y diluya - si es necesario - a la DO<sub>600</sub> requerida usando 1x medio TG.

#### ***La exposición a muestras de ensayo***

- Prepare los siguientes controles positivos:



Sin S9: 4-Nitroquinolone (4-NQO), 12,5 µg/ml en DMSO. La concentración final en el ensayo será de 463 ng/ml.

Con S9: 2-aminoantraceno (2-AA), 50 µg/ml en DMSO. La concentración final en el ensayo será de 1,85 µg/ml.

- Añada 180 µL de agua destilada estéril a todos los pocillos en las columnas 4 a 12.
- Añada 360 µL de muestra de prueba en las columnas **1 a 3**, filas **A - C** y **E - G**.
- Añada 170µL de agua destilada estéril a las columnas **1 a 3**, filas **D y H** (Pocillos de control positivo)

**Rows A - D without S9 - Rows E - H with S9**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
<b>A</b>	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1 - S3	Samples 1 - 3
<b>B</b>	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	PC	Positive control
<b>C</b>	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	SC	Solvent control
<b>D</b>	PC	PC	PC	SC	SC	SC	NC	NC	NC	BL	BL	BL	NC	Negative control
<b>E</b>	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	BL	Blank
<b>F</b>	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2		
<b>G</b>	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3		
<b>H</b>	PC	PC	PC	SC	SC	SC	NC	NC	NC	BL	BL	BL		
	1.5x			3x			6x			12x			Final sample dilution	

- Añada 10 µL de control positivo adecuada a las columnas **1 a 3**, de la fila **D (-S9)** y la fila **H (+ S9)**.
- Retire y deseche 10µL de los pozos de control con disolvente en filas **D y H**, columnas **4 a 6**.
- Añada 10 µL del disolvente control (DMSO) a las columnas **4 a 6** de las filas **D y H**.
- Coloque las puntas de una pipeta multicanal, en los canales **1 a 3** y **5 a 7**.

Prepare las diluciones 3x de las muestras **S1**, **S2** y **S3** y **S1+**, **S2+** y **S3+**, por transferencia y mezcle 180 µL de las filas **A - C** y **E - G**, columna **1** en **4**, **2** en **5**, **3** en **6**.

Repita este procedimiento para las diluciones **6x** y **12x** (columna **4** en la columna **7** y así sucesivamente). Deseche los 180 µL de las últimas 3 columnas.

• **Para 1 placa:** añadir 22µL de ampicilina (50 mg / ml) a 2,2 ml de medio TG 10x (10x = TGA) y mezcle. Añada 20µL de TGA 10x a todos los pozos.

- Prepare una solución fresca de co-factor de las soluciones madre para las filas **E - H (+ S9)**

Volumen	Reactivo	Concentración patrón	Concentración en mezcla de bacteria y	Concentración final en el ensayo
70 µl	KCl	1.00 M	19 mM	5 mM
67 µl	MgCl <sub>2</sub>	0.25 M	4.6 mM	1.2 mM
53 µl	Glucose-6-P	0.20 M	2.89 mM	0.75 mM
211 µl	NADP	0.04 M	2.3 mM	0.6 mM

- Mezcle, luego retire y guarde 30 $\mu$ L para el blanco.

**Para los pozos sin S9 (filas A - D):**

- Añada 70 $\mu$ L de medio TG 1x a pozos **D10 - D12** (blanco)
- Añada 3,3mL de bacterias re-incubadas en recipiente y añada 70 $\mu$ L a todos los pocillos de las filas **A – D** excepto **D10 - D12** (blanco) (Use 4 puntas, retire 1 punta después de llenar la columna 9)

**Para los pozos S9 (filas E - H):**

- Añada 235 $\mu$ L de TG 1x y 7,9 $\mu$ L de S9 a los 30  $\mu$ L de mezcla co-factor para el blanco y añada 70 $\mu$ L de la misma en los pocillos de blanco **H10 a H12**
- Añada la solución de cofactor recién preparada (371 $\mu$ L) en un recipiente.
- Añada 2,93 ml de bacterias re-incubadas
- Añadir 98 $\mu$ L de S9 (preparado recientemente y conservado en hielo), mezcle (= 2,88%).
- Añada 70 $\mu$ L de mezcla bacteria/S9 en todos los pocillos de las filas **E - H** excepto **H10-H12** (blanco) (Usar 4 puntas, retirar 1 punta después de llenar la columna 9). Esto da una concentración final de S9 del 0,75%.
- Mezcle toda la placa con 8 puntas de derecha a izquierda. Cubra la placa con una tapa e incube durante 2 horas a 37 ° C, 120 a 150 rpm

**Dilución y Segunda Etapa de incubación**

Durante las 2 horas de exposición, prepare una segunda placa, pipeteando 270 $\mu$ L de medio 1x TG con ampicilina recién añadida, en todos los pocillos (para 1 placa: 28 $\mu$ L de stock ampicilina (50 mg / ml) a 28 ml de medio de TG 1x). Cubra con una tapa y coloque en una incubadora para precalentar el medio.

- Después de 2 horas de incubación, mezcle y transfiera 30 $\mu$ L de los contenidos de la primera placa a la segunda placa, columna por columna, de derecha a izquierda.
- Lea la DO<sub>600</sub> de la segunda placa (quitar las burbujas si es necesario, leer sin tapa).
- Incube la segunda placa durante 2 horas a 37 ° C, con agitación (120-150 rpm)
- Durante este tiempo: descongele la solución de ONPG a temperatura ambiente en la oscuridad.
- Prepare una tercera placa con 150  $\mu$ L de mezcla B-buffer/ONPG (**para 1 placa:** 15 ml de B Buffer, 40,5 $\mu$ L de 2-mercaptoetanol, 1 ml de solución de ONPG) y pre-caliente a 28 ° C. Si no está disponible una incubadora a 28 ° C, incube a 37 ° C durante 15 minutos. \*
- Al final de las 2 horas de incubación: mezcle y después lea la DO<sub>600</sub> de la segunda placa.
- Ajuste la temperatura del agitador a 28 ° C antes de leer la DO<sub>600</sub> \*

**Medición de la inducción UmuC**

- Retire la tercera placa de la incubadora a 28 ° C o 37 ° C.

- Mezcle y transfiera 30 $\mu$ L de cada pocillo de la segunda placa a la tercera placa (derecha a izquierda) Incube durante 30 minutos a 28 ° C, con agitación (120-150 rpm) \*
- Después de 30 min. añada 120 $\mu$ L de reactivo de parada a cada pocillo. Mezcle y elimine las burbujas. Lea la DO<sub>420</sub>

### **Cálculo y Definiciones**

Para cada dilución de la muestra calcular el factor de crecimiento, la actividad  $\beta$ -galactosidasa (unidades relativas), y la Relación de inducción I<sub>R</sub> de la siguiente manera:

$$\text{Growth factor G: } G = \frac{A_{600, S} - A_{600, B}}{A_{600, N} - A_{600, B}}$$

where  $A_{600, S}$  is the absorbance of the sample S at 600 nm

$A_{600, B}$  is the absorbance of the blank at 600 nm

$A_{600, N}$  is the absorbance of the negative control at 600 nm

$$\beta\text{-galactosidase activity (relative units) } U_S: U_S = \frac{A_{420, S} - A_{420, B}}{A_{600, S} - A_{600, B}}$$

$$\text{Induction Ratio } I_R: I_R = \frac{1}{G} \times \frac{A_{420, S} - A_{420, B}}{A_{420, N} - A_{420, B}}$$

Dilución inefectiva más baja D<sub>L</sub> = La dilución más baja de la serie de dilución con un I<sub>R</sub> <1,5

Mayor concentración ineficaz C<sub>HI</sub> = La concentración más alta de la serie de dilución con una I<sub>R</sub> <1,5

### **Evaluación de datos, criterios de validez**

Toda la prueba se considerará válida si los controles positivos alcanzan una proporción de inducción I<sub>R</sub> de  $\geq 2$ . El DO<sub>600</sub> promedio de los controles negativos de la segunda placa debe aumentar en un factor de  $\geq 2$  durante las 2 horas de incubación (control del crecimiento).

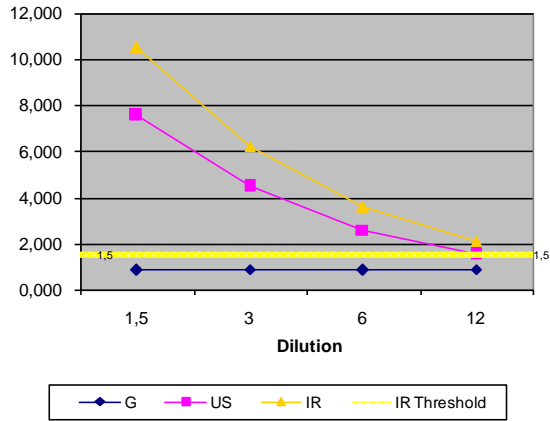
Una dilución de la muestra se considera genotóxico si la inducción I<sub>R</sub>  $\geq 1,5$  y el factor de crecimiento G  $\geq 0,5$ . Para llamar genotóxico a un compuesto ensayado con la prueba umuC Easy UmuC, recomendamos que debe observarse una respuesta a la dosis.

Los resultados obtenidos durante la prueba se registrarán en la hoja de calculo "UmuC Easy AQ Excel calculation sheet" la cual, proporciona los gráficos que permiten analizar la información según los resultados.

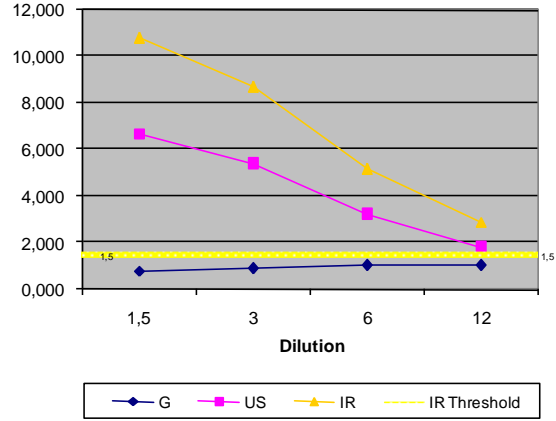
#### **I. Resultados Proyectados**

Los resultados de la prueba UmuC Easy AQ se visualizarán en los gráficos proporcionados por la hoja de cálculo, de la siguiente manera:

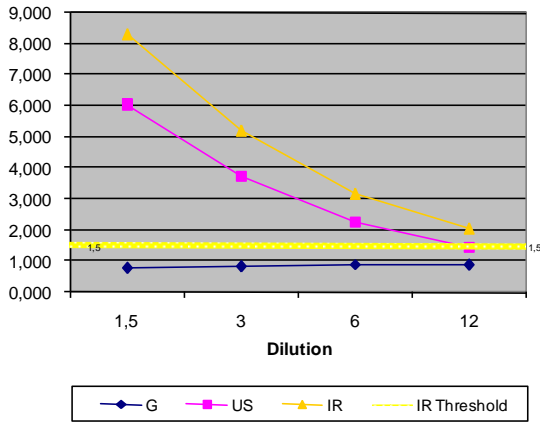
**Substance 1 -S9**



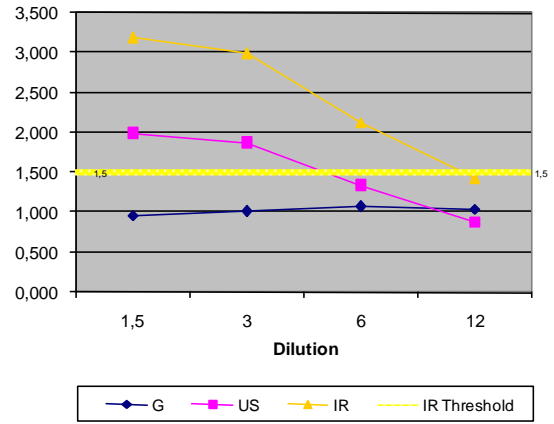
**Substance 1 +S9**



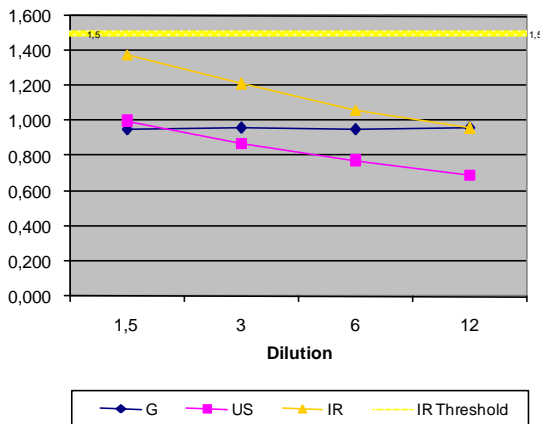
**Substance 2 -S9**



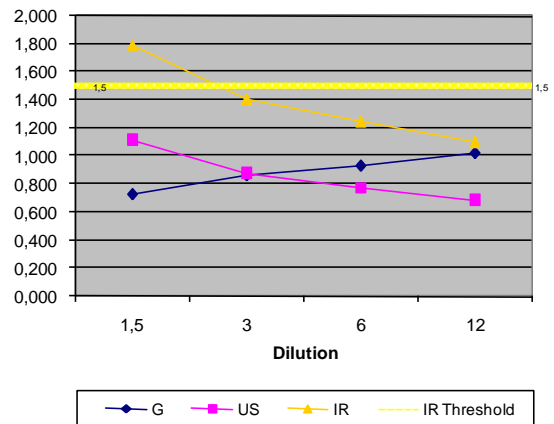
**Substance 2 +S9**



**Substance 3 -S9**



**Substance 3 +S9**



En donde:

- G = Factor de crecimiento

- Us = Relación de la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa
- IR = Relación de inducción
- IR Threshold = límite de IR de 1.5

Gráficos de prueba de las determinaciones de la IR de genotoxicidad de las muestras de agua analizadas.

En los gráficos se pueden observar los valores del factor de crecimiento y la relación de inducción, en las diferentes concentraciones de las diluciones, además de tener como guía el valor límite de la IR, lo que permite realizar una evaluación de los datos de una forma más práctica.

Por tanto, en este caso, al analizar la información de los gráficos de prueba, se puede decir que las sustancias 1 y 2, presentan un factor de crecimiento mayor a 0.5 y un IR mayor a 1.5, los cuales disminuyen en forma directamente proporcional a la dilución. En el caso de la sustancia 3, solo la dilución 1.5 de la prueba con S9 microsomal de extracto de hígado de rata presentó un valor IR mayor a 1.5.

Al cumplir con las dos especificaciones mencionadas en la prueba, las sustancias 1 y 2 se podrían considerar posiblemente genotóxicas.

### **ANEXO 3**

#### **Cromatogramas de algunas muestras**

La IMG corresponde a un estandar de 100 ppb para cada uno de los componentes

La IMG\_1 corresponde a una muestra de San Blas

La IMG\_2 corresponde a una muestra de Guadalupe

La IMG\_3 corresponde a una muestra de Naciente Ortega

La IMG\_4 corresponde a una muestra de red Alumbre que estuvo almacenada durante una semana y se observa un aumento considerable en la concentración (ver intensidades en K counts)

# Chromatogram Plot

File: c:\varianws\data\200-ms.41265.sms

Sample: Manual Sample

Operator: HMN

Scan Range: 1 - 1620 Time Range: 0.00 - 19.97 min.

Date: 3/20/2013 2:40 PM

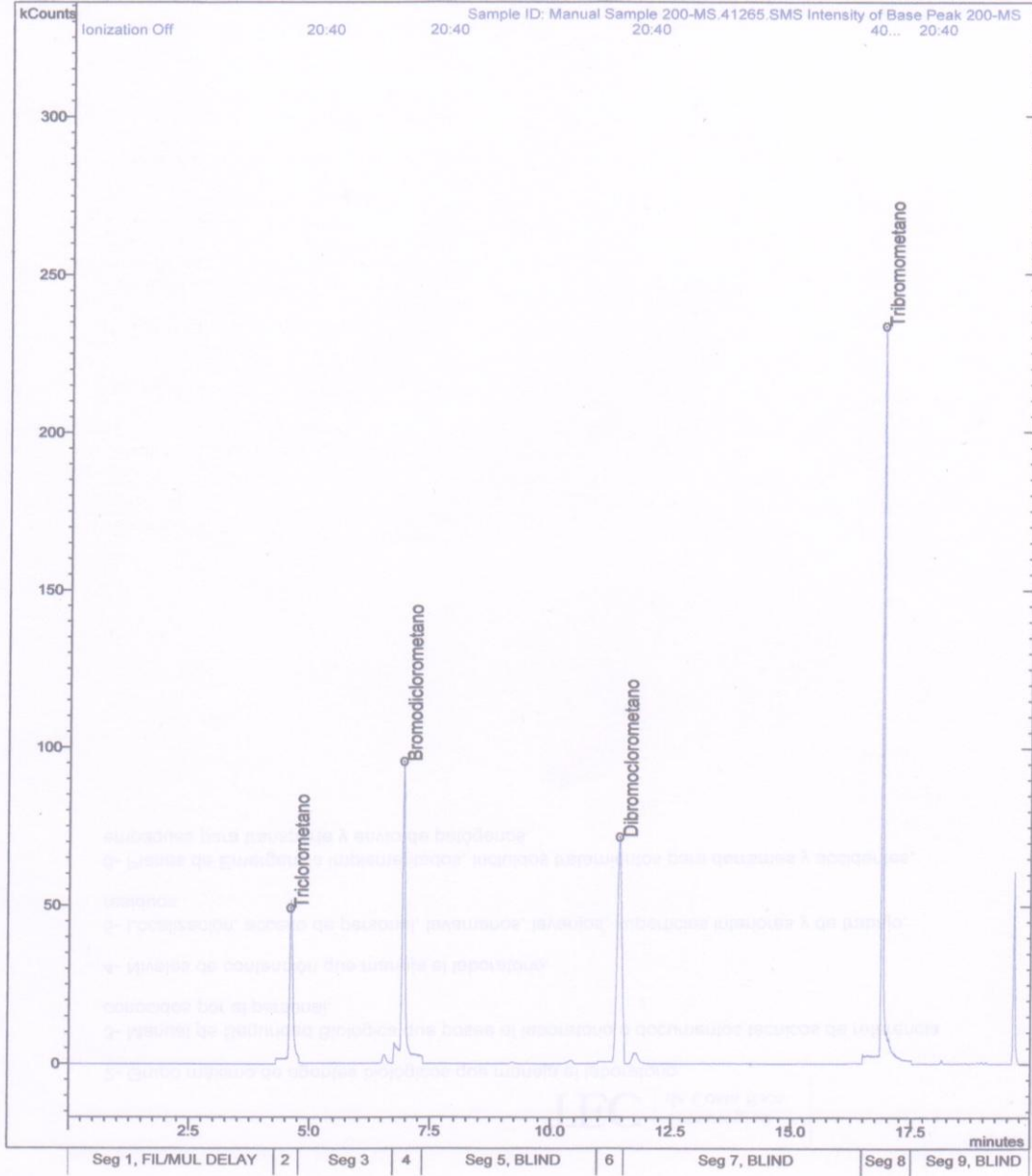


Fig 1 Estándar de 100 µg/L para cada uno de los componentes

# Chromatogram Plot

File: c:\varianws\data\200-ms.41283.sms

Sample: Manual Sample

Scan Range: 1 - 3496 Time Range: 0.00 - 19.99 min.

Operator: HMN

Date: 4/27/2013 1:54 PM

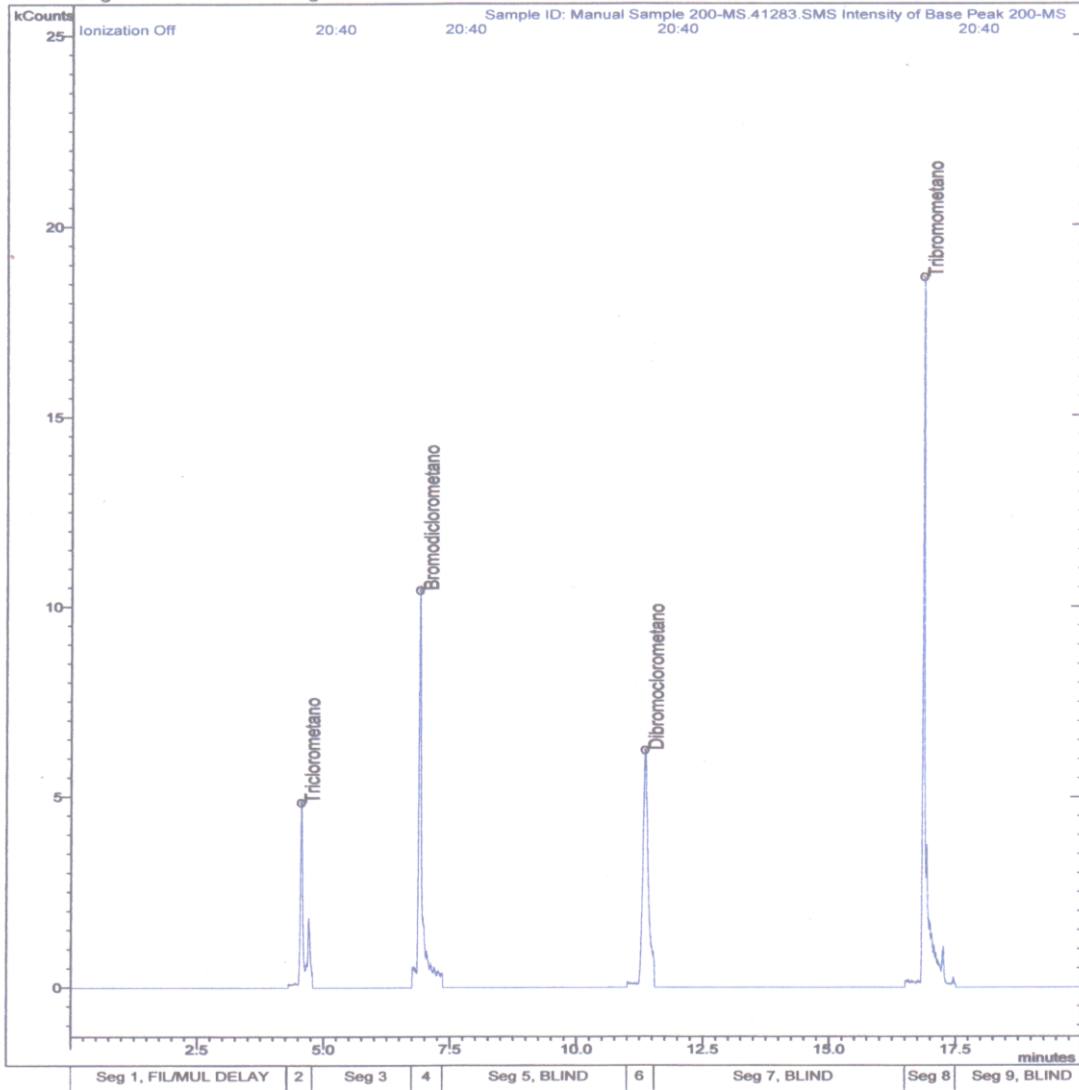


Fig 2 Naciente San Blas clorada, (ver eje y de k count)

### Chromatogram Plot

File: c:\varianws\data\200-ms.41225.sms

Sample: Manual Sample

Scan Range: 1 - 1623 Time Range: 0.00 - 19.98 min.

Operator: HMN

Date: 12/18/2012 3:20 PM

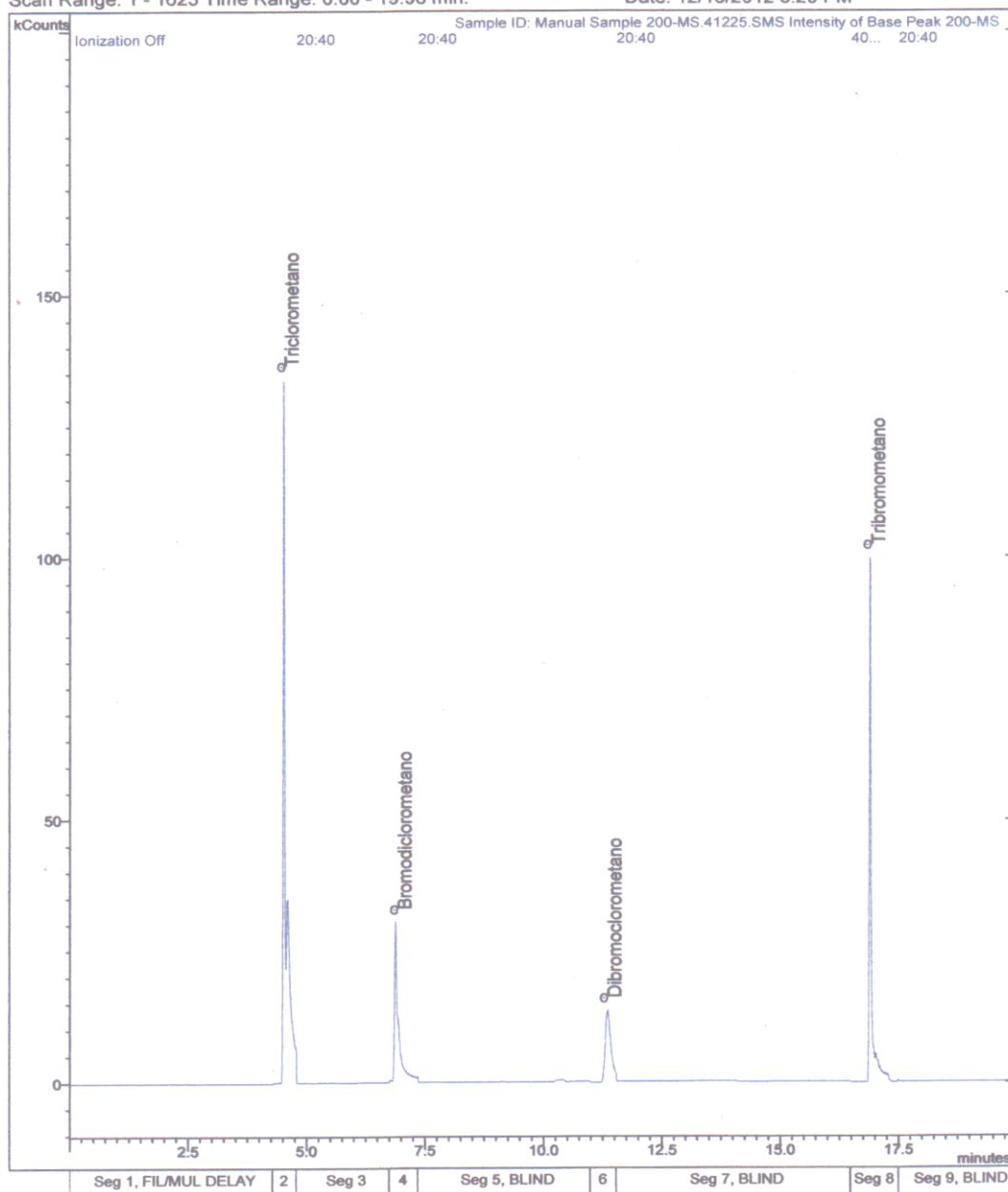


Fig 3: Sistema de Cloración de Guadalupe (AyA) San José (ver eje y de k count)



# Chromatogram Plot

File: c:\varianw\data\200-ms.41280.sms

Sample: Manual Sample

Operator: HMN

Scan Range: 1 - 3505 Time Range: 0.00 - 19.99 min.

Date: 4/27/2013 11:18 AM

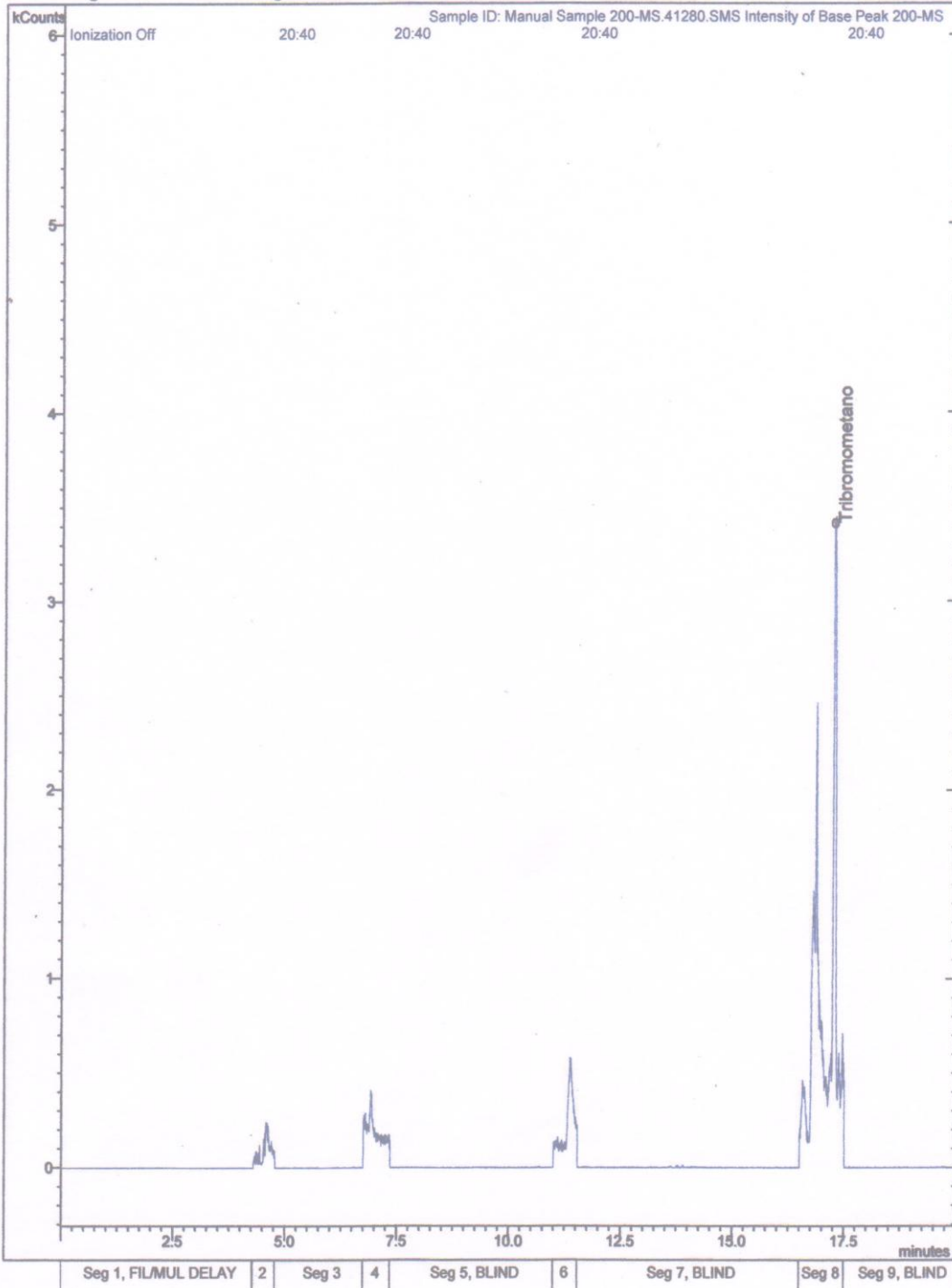


Fig 4 Muestra de la naciente Ortiga clorada

# Chromatogram Plot

File: c:\varianws\data\200-ms.41281.sms

Sample: Manual Sample

Scan Range: 1 - 3512 Time Range: 0.00 - 19.99 min.

Operator: HMN

Date: 4/27/2013 12:07 PM

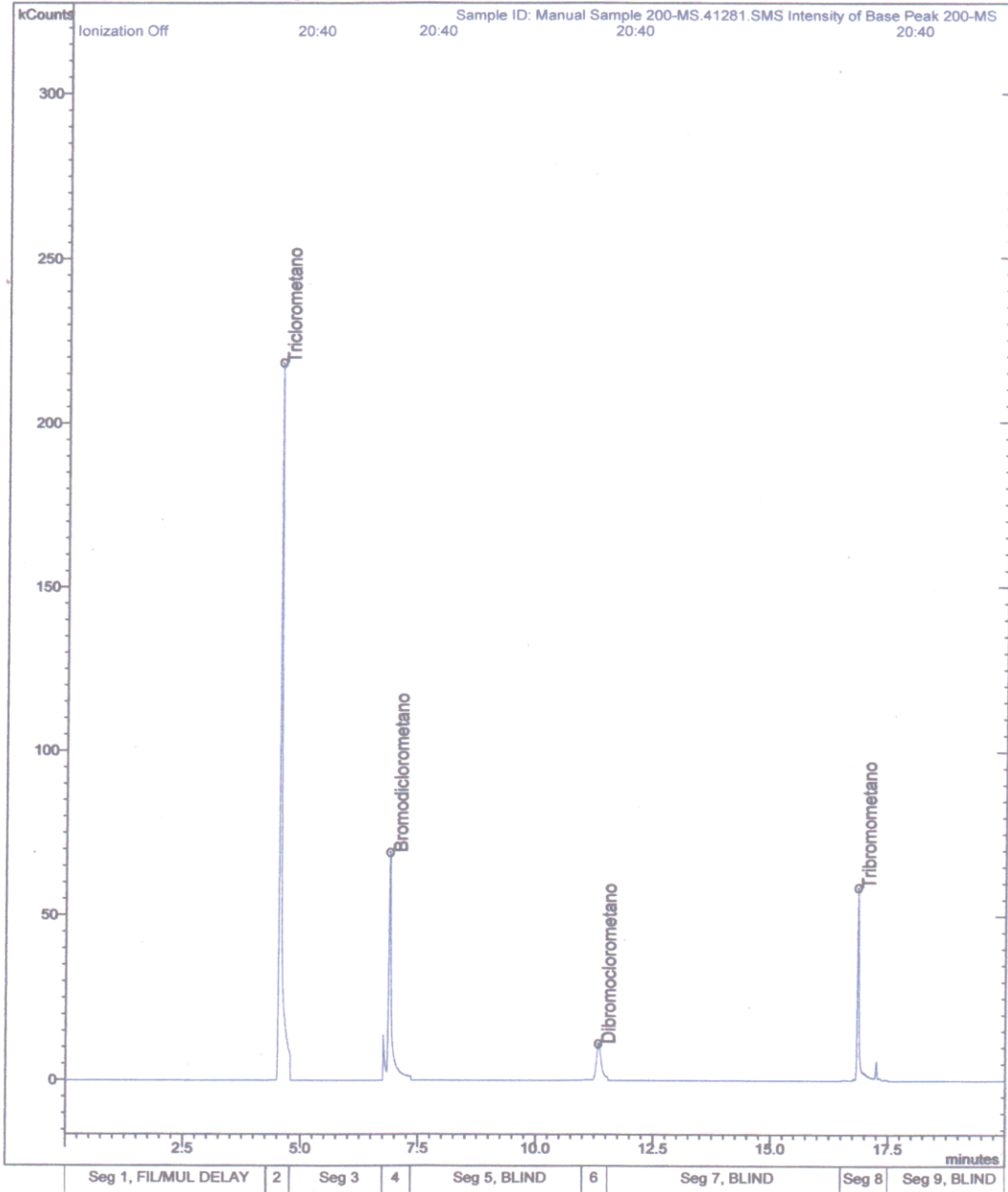


Fig 5 Muestra de la red Alumbre almacenada durante una semana, (ver K count)