



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACIÓN DE LA MUTAGENICIDAD DE LOS
EXTRACTOS ORGÁNICOS DE LAS PARTÍCULAS
EMITIDAS POR LA COMBUSTIÓN DE DIESEL Y
BIODIESEL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

GUADALUPE ZITLALPOPOCA HERNÁNDEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. RAFAEL DE JESÚS VILLALOBOS PIETRINI
2013**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno	1. Datos del alumno
Apellido paterno	Zitlalpopoca
Apellido materno	Hernández
Nombre (s)	Guadalupe
Teléfono	222-2883503
Universidad Nacional Autónoma de México	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias	Facultad de Ciencias
Carrera	Biología
Número de cuenta	408092887
2. Datos del tutor	2. Datos del tutor
Grado	Dr.
Nombre(s)	Rafael de Jesús
Apellido paterno	Villalobos
Apellido materno	Pietrini
3. Datos del sinodal 1	3. Datos del sinodal 1
Grado	Dra.
Nombre(s)	Rosario
Apellido paterno	Rodríguez
Apellido materno	Arnaiz
4. Datos del sinodal 2	4. Datos del sinodal 2
Grado	Dra.
Nombre(s)	Adriana
Apellido paterno	Muñoz
Apellido materno	Hernández
5. Datos del sinodal 3	5. Datos del sinodal 3
Grado	Dra.
Nombre(s)	Josefina
Apellido paterno	Cortés
Apellido materno	Eslava
6. Datos del sinodal 4	6. Datos del sinodal 4
Grado	M. en C.
Nombre(s)	Ana Rosa
Apellido paterno	Flores
Apellido materno	Márquez
7. Datos del trabajo escrito	7. Datos del trabajo escrito
Título	Evaluación de la mutagenicidad de los extractos orgánicos de las partículas emitidas por la combustión de diesel y biodiesel
Número de páginas	55
Año	2013

Agradecimientos

Académicos

Al Dr. Rafael de Jesús Villalobos Pietrini, por la dirección de esta tesis y por el su apoyo académico en los temas involucrados.

Al Dr. Omar Amador Muñoz por su asesoramiento en el tratamiento de muestras ambientales y el análisis estadístico.

A la tesista Geraldine González Rodríguez y a la M. en C. Martha Elena Díaz Murillo por su colaboración en los ensayos biológicos.

A la M. en C. Brenda Liz Valle Hernández por su apoyo técnico durante el desarrollo de la tesis.

A los tesistas Yessica Flores A., Maribel Hernández C., Marisol Romero M. y Jairo Vázquez S. y a los químicos Roberto Gaspariano, Enrique Hernández L, Griselda Maya M. y Graciela L. Santos M. por su colaboración y apoyo para la realización de la tesis.

Institucionales

Al Laboratorio de Especiación Química de Aerosoles Atmosféricos y Desarrollo de Métodos Analíticos de la Sección de Mutagénesis Ambiental del Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM.

Este proyecto se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM, con el financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPITT) No. IN116810-3, UNAM, PICS08-31 del Instituto de Ciencia y Tecnología del D.F. y CONACYT-SEMARNAT 23600.

Dedicatoria

A Dios por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte, compañía y motivación.

Con cariño, respeto y admiración a mis padres, hermanos, maestros, amigos y familiares por su apoyo, enseñanzas, consejos, motivación, ejemplo y valores.

Este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

ÍNDICE

RESUMEN	6
I. INTRODUCCIÓN	8
1.1 ESCENARIO ACTUAL DE LOS COMBUSTIBLES EN MÉXICO.....	8
1.2 PARTÍCULAS SUSPENDIDAS Y CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA EN MÉXICO.....	10
1.3 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL DIESEL Y DEL BIODIESEL.....	12
1.4 VARIABLES QUE MODIFICAN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS EMISIONES	16
1.5 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LAS EMISIONES DEL DIESEL: EFECTOS AL AMBIENTE Y A LA SALUD	17
1.6 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LAS EMISIONES DEL BIODIESEL: EFECTOS AL AMBIENTE Y A LA SALUD	19
1.7 ESTÁNDARES INTERNACIONALES DE CALIDAD DEL BIODIESEL.....	20
1.8 ENSAYOS BIOLÓGICOS	21
II. JUSTIFICACIÓN.....	23
III. OBJETIVOS.....	26
3.1 GENERAL	26
3.2 PARTICULARES.....	26
IV. HIPÓTESIS.....	27
V. MATERIALES Y MÉTODO	28
5.1 MUESTREO.....	28
5.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ORGÁNICO.....	30
5.3 ENSAYO DE MUTAGENICIDAD	30
5.3.2 <i>Ensayo de Ames</i>	31
5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
6.1 MATERIAL PARTICULADO Y MOE OBTENIDOS EN LOS MUESTREOS	35
6.2 VALIDACIÓN DE LA PRUEBA	36
6.3 RESPUESTA MUTAGÉNICA A LA MOE DE EMISIONES DE DIESEL Y DE MEZCLAS CON BIODIESEL	37
VII. CONCLUSIONES	44
VIII. RECOMENDACIONES	45
IX. REFERENCIAS	46

RESUMEN

En la búsqueda de fuentes alternativas de energía, el uso de biodiesel ha despertado gran interés. En el sector transporte ofrece algunas ventajas con respecto al diesel, como son la reducción en la emisión de material particulado, de compuestos potencialmente mutagénicos y carcinogénicos y de gases de efecto invernadero. Sin embargo, la regulación de bioenergéticos está delimitada por la evaluación química de las emisiones, sin considerar los efectos que podrían desencadenar sobre los sistemas biológicos.

Del mismo modo, diversos estudios reportan que la composición química y sus efectos biológicos de las emisiones dependen principalmente tanto del origen y características físico-químicas del biodiesel, así como de las condiciones de operación del motor de combustión.

Por otro lado, no se han reportado trabajos que evalúen los efectos mutagénicos de las emisiones de combustión de biodiesel de origen animal, un combustible obtenido a partir de residuos de tejidos grasos de los animales y que constituye una fuente de energía que no requiere de terrenos de cultivo.

Bajo este escenario, en este trabajo se evaluó el efecto mutagénico de los extractos orgánicos (fracción de material particulado cuyo contenido se ha relacionado con efectos genotóxicos) de las partículas emitidas por combustión de diesel y de sus mezclas con biodiesel de origen animal, a diferentes condiciones de operación del motor, mediante la prueba de Ames con la cepa TA98 de la bacteria *Salmonella typhimurium*, con y sin la fracción enzimática S9.

Los resultados señalan que en ninguna de las tres condiciones de operación del motor se observó relación entre el efecto genotóxico y la proporción de biodiesel en TA98 con y sin S9. Es decir, el efecto mutagénico producido por las emisiones de compuestos orgánicos al quemar diesel es similar que al usar mezclas con biodiesel de origen animal.

La mayor actividad mutagénica se observó en condiciones altas de operación del motor, probablemente por la mayor generación de compuestos orgánicos con efectos mutagénicos indirectos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y de sus nitro derivados con actividad directa. En condiciones medias y bajas no hubo cambios en ambas actividades mutagénicas al modificar la proporción de biodiesel, excepto en condiciones bajas con TA98-S9, donde hubo disminución de la mutagenicidad al aumentar la proporción de biodiesel ($p < 0.05$).

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Escenario actual de los combustibles en México

El petróleo es una fuente energética que ha sido imprescindible para el desarrollo tecnológico. Sus derivados como el gas licuado, las gasolinas, naftas, queroseno, gasóleos (diesel), fuelóleos, lubricantes y asfaltos han sido ampliamente usados en la industria automotriz, petroquímica y energética, representando junto con el gas natural, el 65 % del suministro mundial de energía (Ortuño 2009).

En México, los combustibles de mayor consumo son las gasolinas, el combustóleo y el diesel. Los altos niveles de consumo han provocado el declive de esta fuente energética (Figura 1) (Petróleos Mexicanos 2011), por lo que resulta prioritaria la búsqueda de nuevas fuentes de energía, que no sólo sean económicamente viables, sino que además disminuyan los costos ambientales y los daños a la salud.

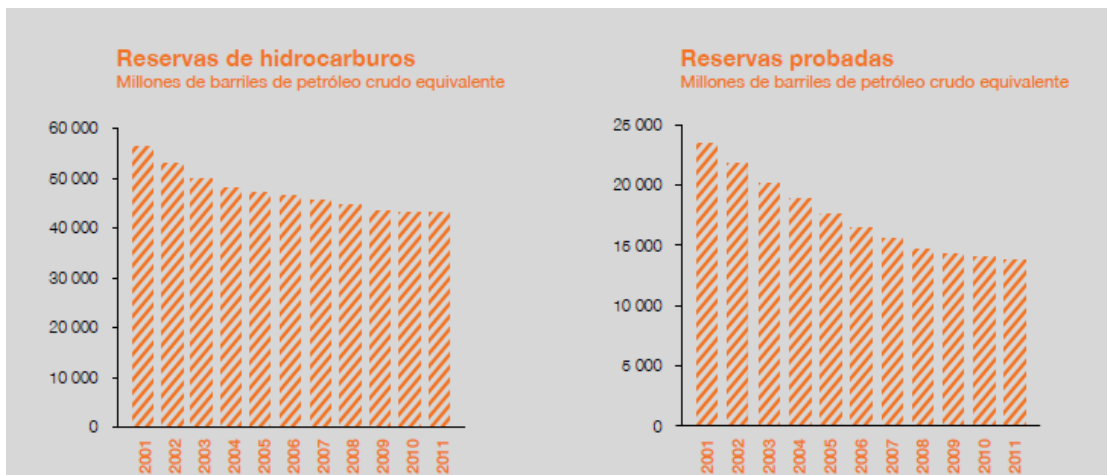


Figura 1. Reservas estimadas y probadas de hidrocarburos totales (Petróleos mexicanos 2011).

Ante este escenario, mundialmente se ha incrementado la producción de biodiesel (Figura 2), un combustible renovable, biodegradable y con bajo perfil de emisiones, obtenido a partir de aceites vegetales, animales y grasas (SENER 2006). Si bien en México su producción es limitada, existen proyectos de investigación, programas gubernamentales y participación del sector privado que han impulsado su producción.

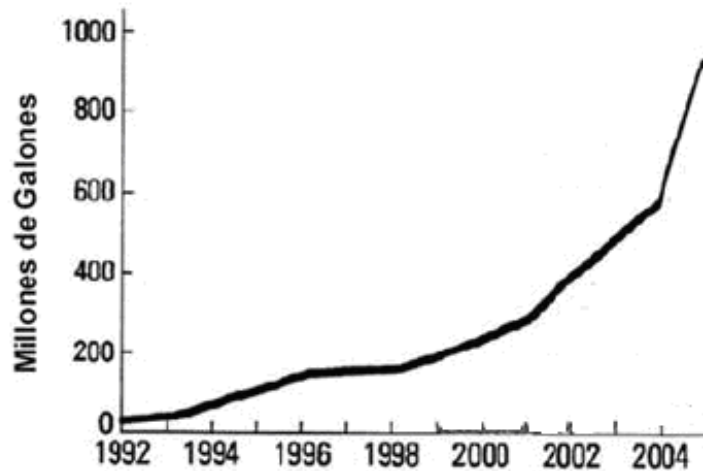


Figura 2. Producción de biodiesel en el mundo (Licht F.O. 2006).

Entre los que se pueden citar están la planta de biodiesel del Grupo Energéticos ENERGEX (Cadereyta, Nuevo León), el proyecto de la Universidad Vasconcelos en Oaxaca (CONAE 2007), la planta de extracción y la estación de servicio en suministro de diesel en Tuxtla Gutiérrez (Biodiesel Chiapas 2012 www.biodieselchiapas.mx) y proyectos de empresas como SOLBEN en varios estados de la República, como Chihuahua, San Luis Potosí y Coahuila. Las materias primas generalmente usadas en estos proyectos son de origen vegetal (principalmente de piñon y palma africana) y de aceites reciclados en mezclas al 20 % con diesel.

Del mismo modo, se han aprobado leyes que incentivan el uso de biodiesel, como la Ley para el Aprovechamiento de las Fuentes Renovables de Energía (Diario Oficial de la Federación 2008) y una ley que regula la calidad de aceites y grasas vegetales o animales (Norma Mexicana NMX-F-590-SCFI-2009).

1.2 Partículas suspendidas y contaminación atmosférica en México

La contaminación atmosférica es un problema presente en su mayor parte en las grandes metrópolis, principalmente por las emisiones resultantes de la actividad industrial y del transporte. En ciudades como Brasil, por citar un ejemplo, la principal fuente de origen de los contaminantes del aire son emitidos por la actividad vehicular (CETESB 2004); en México, de seis zonas urbanas estudiadas (Cd. de México, Cd. Juárez, Monterrey, Tijuana, Toluca y Mexicali) las emisiones vehiculares son responsables del 70 % del volumen total.

Diversos estudios han demostrado el efecto adverso de los contaminantes del aire en la salud (Santos *et al.* 2008, Anderson 2009, Pope 2010) y sobre la vegetación (Cape 2003). Los efectos en la salud, especialmente por las emisiones vehiculares, varían en función de la concentración y del periodo de exposición a los contaminantes y pueden desencadenar molestias como irritación de ojos y nariz, hasta generar enfermedades agudas e inclusive la muerte (Anderson 2009) (Cuadro 1).

Santos *et al.* (2008) Anderson (2009) y Pope (2010), señalan que la exposición al aire urbano en las zonas metropolitanas se asocia al aumento de la morbilidad y de la mortalidad; estas conclusiones se han obtenido de estudios realizados en México (Castillejos *et al.* 2000). El incremento de la morbilidad se debe a que los contaminantes provocan afecciones respiratorias (Sánchez-Carrillo *et al.* 2003; Barraza-Villarreal *et al.* 2008) y cardiovasculares (Simkhovich *et al.* 2008), principalmente en individuos vulnerables como niños, personas de la tercera edad y enfermos pulmonares y cardíacos crónicos (OMS 1973).

Estudios *in vitro*, como el ensayo cometa, el análisis de médula ósea y sangre, así como las pruebas de mutagenicidad, aportan información de que tal efecto es debido al daño al DNA (Gutierrez *et al.* 2006), al desencadenamiento de respuestas inflamatorias (Brito 2010) y a sus efectos genotóxicos (Amador-Muñoz *et al.* 2001, Villalobos-Pietrini *et al.* 2007), asociados al desarrollo de cáncer.

Cuadro 1. Efectos en la salud de las emisiones de motores vehiculares (Liaquat *et al.* 2010).

Emisiones	Efectos
Monóxido de carbono	Deteriora la percepción y el pensamiento, retarda reflejos, causa somnolencia, afecta el desarrollo fetal. Junto con otros contaminantes ejerce un efecto sinérgico promoviendo la morbilidad en personas con problemas respiratorios o circulatorios.
Óxidos de nitrógeno	Aumenta el riesgo de contraer enfermedades causadas por virus; irrita a los pulmones y causa edema, bronquitis y neumonía, además aumenta la sensibilidad al polvo y polen en personas con asma. Los mayores efectos adversos se desencadenan en combinación con otros contaminantes atmosféricos.
Hidrocarburos y otros compuestos orgánicos volátiles	Los compuestos de bajo peso molecular provocan irritación de ojos, tos, estornudos y somnolencia. Los compuestos de alto peso molecular son cancerígenos y mutagénicos; algunos hidrocarburos tienen gran afinidad por las partículas de diesel y contribuyen al desarrollo de enfermedades pulmonares.
Ozono	Causa tos y deterioro de la actividad pulmonar, dolores de cabeza y malestar físico, reduce la resistencia a los resfriados y neumonía, puede agravar enfermedades crónicas del corazón.
Material particulado	Desencadena problemas respiratorios, cáncer de pulmón y muertes cardiopulmonares.
Sustancias tóxicas	Causan cáncer, problemas reproductivos y defectos del nacimiento. Los aldehídos y cetonas irritan los ojos, causan problemas respiratorios e irritación en la piel, además de ser posibles carcinógenos en humanos.
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	Cáncer de pulmón
Formaldehído	Irritación de nariz y ojos, tos, náuseas. La exposición ocupacional se asocia al incremento del riesgo a padecer cáncer.

Dichos contaminantes se encuentran en las fases gaseosa y particulada, cuyo origen puede ser natural o antrópico (Hinds 1982). Las partículas de origen natural son resultado de procesos tales como la erosión de rocas y suelos, erupciones volcánicas, incendios forestales, etc; mientras que las de origen antrópico son resultado de la quema de combustibles fósiles, principalmente por la actividad vehicular e industrial;

secundariamente, pueden formarse por la interacción físico-química de los gases (Friendlander 1973).

El material particulado puede ser clasificado por su tamaño en grueso ($> 2.5 \mu\text{m}$), fino ($0.1-2.5 \mu\text{m}$) y ultrafino ($< 0.1 \mu\text{m}$) (Health Effects Institute 2002). El estudio de las partículas finas y de las ultrafinas reciben especial atención porque son las más tóxicas, por su alto contenido en materia orgánica, por su alta capacidad de generar radicales libres (De Kok 2006) y por ser la fracción, que por su tamaño, ingresa fácilmente a los alvéolos pulmonares (Oberdörster *et al.* 1990).

La composición química de la fracción orgánica consiste en hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), así como sus derivados (nitro y oxi HAP), compuestos a los que se les atribuye sus efectos mutagénicos (Villalobos-Pietrini *et al.* 2007), n-alcanos, ftalatos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos y productos de degradación oxidante (Cautreels y Van Cauwenberghe 1978, Saldarriaga *et al.* 2008).

La fuente de emisión principal del material particulado fino y ultrafino son los vehículos, en especial los que utilizan motores a diesel (Espinosa y Babcock 1987). Es por los efectos de las partículas, que resulta necesaria la regulación de las emisiones del combustible que sustituya a los de origen fósil.

1.3 Caracterización química del diesel y del biodiesel.

El diesel, petrodiesel o gasóleo, es una mezcla de hidrocarburos (parafínicos o alcanos nafténicos o cicloalcanos y bencénicos o aromáticos) que se obtiene por la destilación fraccionada del petróleo entre 250 y $350 \text{ }^\circ\text{C}$ a presión atmosférica, con alto contenido en minerales y azufre, utilizado como combustible en motores a diesel o en la calefacción, con una mayor eficiencia energética en comparación con las gasolinas (Petróleos Mexicanos 2011).

Cuando el combustible con características similares se produce a partir de cultivos oleaginosos, de grasas animales y de aceites y grasas recicladas, se le conoce como

biodiesel (Vicente-Crespo *et al.* 2001, Mittelbach y Remsechmidt 2004). Este combustible resulta de la reacción química de ácidos grasos con alcoholes (como metanol o etanol), mediante un proceso llamado transesterificación, que más específicamente se describe como el proceso de remoción de un grupo glicerol de una molécula de triglicérido o un ácido graso complejo, resultando un alcohol éster (Meher *et al.* 2006, Agarwal 2007) (Figura 3).

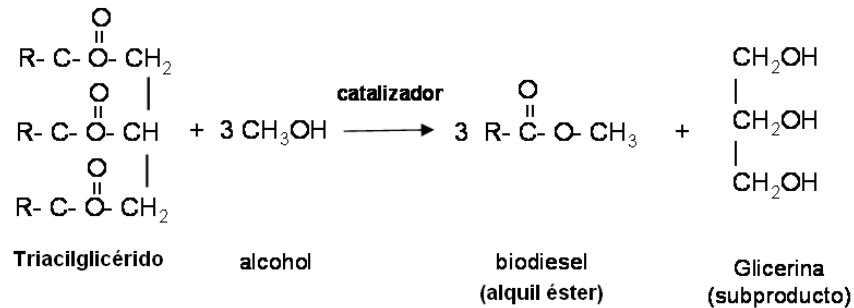


Figura 3. Transesterificación de un ácido graso para la producción de biodiesel (Razon 2009).

El biodiesel puede contener impurezas, como restos de jabón, glicerina, glicéridos, ácidos grasos libres, catalizadores, sustancias insaponificables y agua, mismas que determinan la calidad del combustible (Benjumea *et al.* 2004), por lo que debe someterse a un proceso de purificación. En resumen, el proceso de elaboración de biodiesel se describe en la figura 4.

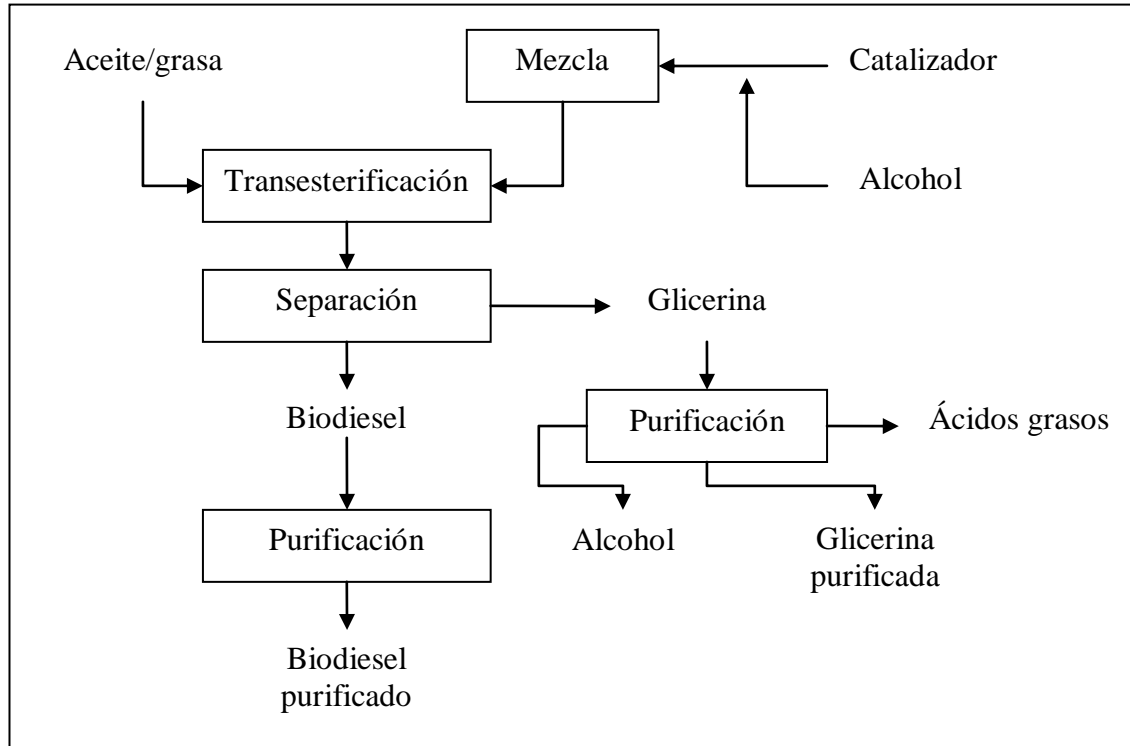


Figura 4. Proceso de producción de biodiesel (Vicente-Crespo *et al.* 2001).

El uso de aceites vegetales como combustible data desde la fabricación de los primeros motores a diesel (Benjumea *et al.* 2010). Sin embargo, por la alta viscosidad y baja volatilidad de estos compuestos, se presentaron problemas técnicos en los motores de combustión de inyección directa, ya que se dificulta el proceso de atomización, originándose combustión incompleta, proceso de mezclado deficiente y por tanto, formación de partículas y depósitos carbonosos.

Otro problema que presentó el uso de aceites vegetales es que con el aumento de temperatura en la cámara de combustión, existe una descomposición térmica previa a la combustión, formándose depósitos en inyectores, cámara, pistones y válvulas. Además, el aceite sin quemar deteriora el aceite lubricante (Barsic y Humke 1981).

Aún cuando los aceites vegetales se mezclaban con petrodiesel, existían deficiencias en el proceso de combustión, por lo que se consideró que estos materiales tuvieran un proceso de transesterificación (Schwab *et al.* 1987), que como se mencionó anteriormente al producto

de este proceso se le conoce como biodiesel, el concepto se limita a los ácidos grasos obtenidos de lípidos renovables, como aceites y grasas de origen animal o vegetal (Vicente-Crespo et al. 2001, Mittelbach y Remsechmidt 2004).

El biodiesel de mayor uso es el de origen vegetal, extraído principalmente de aceites de plantas como la palma africana (*Elaeis guineensis jacq*), el piloncillo (*Jatropha curcas*), frijol de soya (*Glicina max*), colza (*Brassica napus*), cártamo (*Carthamus tinctorius*) y girasol (*Helianthus annuus*) (Mittelbach et al. 1983, Nouredini y Zhu, 1997, Vicente et al. 1999, Benjumea et al. 2004, Meka et al. 2007). También se puede obtener a partir de microalgas, siendo su principal ventaja la alta producción de masa (Wen y Johnson 2009) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Materias primas usadas para la producción de biodiesel (Ma et al. 1998, Lee et al. 2002, Nelson y Schrook 2006).

Origen vegetal	Aceites convencionales	Colza Soya Girasol Palma	<i>Brassica napus</i> <i>Glycine max</i> <i>Helianthus annuus</i> <i>Elaeis guineensis</i>
	Aceites alternativos	Cardo Piñon Mostaza etiope Camelina Caucho Coco Higuerilla Cártamo o alazor Linaza Aceites de frituras usadas Subproductos de la industria papelera Aceite de microalgas	<i>Cynara cardunculos</i> <i>Jatropha curcas</i> <i>Brassica carinata</i> <i>Camelina sativa</i> <i>Hervea brasiliensis</i> <i>Cocos nucifera</i> <i>Ricinus communis</i> <i>Carthamus tinctorius</i> <i>Linum usitatissimum</i>
Origen animal	Cebo de res, manteca de cerdo, aceite de pescado y subproductos de la industria avícola.		

Del mismo modo, la materia prima de mayor uso son aceites de semillas de oleaginosas, como colza y girasol, principalmente en Austria, Alemania, Francia y España; en países tropicales como Malasia, Indonesia, Ecuador y Colombia, el aceite del fruto de la palma está ampliamente comercializado (Agudelo *et al.* 2010).

Pese a ser un combustible cuya comercialización y uso están lejos de alcanzar a las gasolinas y al mismo diesel, actualmente se ha implementado el uso de biodiesel en el transporte; en Alemania, Austria y Suecia es usado en mezcla pura en motores adaptados, mientras que en Francia se utiliza del 5 al 30 %, al igual que en Italia, pero en mayor parte es usado en mezclas con 20 % de biodiesel- 80 % de diesel (López 2005).

El biodiesel de origen animal puede ser extraído del sebo (Oner y Altun 2009), grasa blanca o manteca de cerdo (Lu *et al.* 2007) o grasa de pollo (Guru *et al.* 2010). Tiende a ser un aceite saturado (Benjumea *et al.* 2004); se ha documentado que el sebo animal está compuesto de 60 % de ácidos palmítico y esteárico saturados, el resto de ácido oleico insaturado (Graboski y Mc Cormick 1998).

1.4 Variables que modifican la composición química de las emisiones

De manera general, las condiciones de operación del motor y la composición química del diesel y biodiesel determinan la composición química de las emisiones (Hemmingsen *et al.* 2011, Schröder *et al.* 2012), pero también, las características del motor y el tamaño del vehículo, el modo de uso de los vehículos (rapidez, distancias recorridas, etc.), el uso de catalizadores, entre otros, influyen de manera importante (Matti 2007).

Por ejemplo, de las variables reguladas en normas internacionales (ASTM International 2009) está el número de cetano, que indica la autoinflamación; si la autoinflamación es menor, entonces aumenta el tiempo de retraso (tiempo que transcurre entre el inicio de la inyección y el inicio de la combustión), lo que dificulta el arranque en condiciones frías, aumentando el ruido y las emisiones de combustión.

Otro elemento es la viscosidad, si esta aumenta, disminuye la atomización (formación de gotas), la evaporación y el mezclado con el aire, por lo que el combustible no se quema (Benjumea *et al.* 2004). El incremento de densidad aumenta el gasto de combustible y la formación de hollín; pero si disminuye, aumenta el consumo volumétrico del combustible. Si el punto de ebullición aumenta, se forman depósitos carbonosos, se diluye el aceite lubricante, desgastándose el motor y por tanto, aumentan las emisiones (Agudelo *et al.* 2010).

Entre las variables de operación del motor, están la velocidad, que cambia de manera proporcional a como lo hacen las emisiones (Shi *et al.* 2000) y estas aumentan conforme se incrementa la distancia recorrida. La potencia del motor también varía de manera proporcional a las emisiones; de manera que a mayores revoluciones por minuto del motor y de la carga (peso) del vehículo, mayores serán las emisiones (Kweon *et al.* 2002). La temperatura también modifica la emisión de contaminantes; cuando el motor se ha calentado de manera que alcanza una temperatura estable de funcionamiento, se reducen las emisiones (NREL 2007).

1.5 Caracterización química de las emisiones del diesel: efectos al ambiente y a la salud

La mayor parte del producto de combustión del diesel es material particulado, principalmente PM_{2.5} y compuestos orgánicos volátiles (Espinosa y Babcock 1987).

Se ha encontrado que la composición del material particulado emitido por la combustión de diesel es de 2 a 20 veces mayor en óxidos de nitrógeno y de 30 a 100 veces más alto en partículas que lo generado por la combustión de gasolina (McClellan 1987). La fase particulada contiene un núcleo de carbono que adsorbe compuestos orgánicos solubles e insolubles (como HAP, hidrocarburos nitroaromáticos, heterocíclicos, quinonas, aldehídos e hidrocarburos alifáticos) (Draper 1986, Schuetzle y Frazier 1986), metales (Vouk y Piver 1983) y sulfuros.

La parte orgánica está conformada a su vez por aldehídos, hidrocarburos aromáticos policíclicos y sus derivados, los cuales tienen actividad mutagénica y carcinogénica (Pitts *et al.* 1975, Lewtas 1983). Además, las partículas tienen adsorbidos en su amplia área superficial aceites lubricantes y compuestos no sometidos a la combustión (EPA, 2002).

La fracción orgánica extraída de las partículas constituye del 20 al 30 %, aunque la proporción depende del tipo de vehículo y las condiciones de operación, como la velocidad, carga del motor, inyección del combustible, turboalimentación, temperatura y propiedades de combustible. Cuando en los motores de diesel existe combustión incompleta se produce menor cantidad de partículas con alta proporción de materia orgánica. A bajas temperaturas de operación, las partículas tienden a adsorber mayor cantidad de material orgánico.

En cuanto al efecto provocado en la salud, la IARC (2001) considera a las emisiones de diesel como posibles carcinógenos en humanos, por su contenido de aldehídos, de hidrocarburos aromáticos policíclicos y monocíclicos y nitroarenos, así como por su fácil ingreso a los alveolos pulmonares, relacionándolo con el aumento en la incidencia de cáncer pulmonar. La exposición a las emisiones de diesel provoca inflamación de las vías respiratorias, disminuye la función pulmonar y agrava enfermedades como asma y bronquitis (Sydborn *et al.* 2001).

En un estudio realizado en la ciudad de Sao Paulo, Brasil, Carvalho-Oliveira *et al.* (2005) encontraron que el potencial mutagénico del material particulado disminuía cuando dejaban de transitar vehículos con motor a diesel, dichos resultados los obtuvieron a partir del ensayo de micronúcleos en *Tradescatia* y del análisis del ciclo celular de las raíces de *Allium cepa*. Por su parte, Sagai *et al.* (1993) demostraron que las emisiones inducen la producción de superóxidos y radicales hidroxilo sin activación metabólica en tejido pulmonar de ratón. Aunque las emisiones tienen efectos citotóxicos *per se*, también pueden provocar que las células generen compuestos oxidantes (superóxidos), ya sea por la vía enzimática o por reacciones de reducción no enzimáticas (Yushi-Bai *et al.* 2001). Por otra parte, los efectos que generen en los individuos dependerá de la susceptibilidad del individuo por factores como edad, sexo, etc. (Adonis *et al.* 2003, Sunil *et al.* 2009).

1.6 Caracterización química de las emisiones del biodiesel: efectos al ambiente y a la salud

La composición de las emisiones del biodiesel depende de la composición química del combustible (Dorado *et al.* 2003; Lin *et al.* 2011) así como de las condiciones de operación del motor (Bagley 1998, Enweremadu y Rutto 2010; Souza *et al.* 2012). De manera general, se ha documentado que las emisiones de bióxido de carbono, hidrocarburos, monóxido de carbono y material particulado son menores en comparación con las emisiones de diesel. Pese a estas ventajas, las emisiones tienen un alto contenido de óxidos de nitrógeno, tanto para biodiesel puro como para sus mezclas (Monyem y Van Gerpen 2001, Basha *et al.* 2009).

El uso de biodiesel puro presenta algunos inconvenientes, como su alta viscosidad, por lo que se recomienda su mezcla con diesel, lo cual aumenta la lubricación del combustible, evitando el uso de aditivos. Las emisiones de la combustión de estas mezclas disminuyen la proporción de HAP y poliaromáticos monocíclicos, sin embargo, algunos compuestos como fenantreno, etil benceno y trimetil benceno se incrementan, estas moléculas representan un riesgo a la salud porque se distribuyen en la fase gaseosa y permanecen en la atmósfera por un periodo largo de tiempo (Machado-Correa y Arbilla 2006).

De manera específica, las emisiones de cada uno de los biocombustibles han sido estudiadas, mostrando que dependen del tipo de biodiesel usado. Un estudio de Ali *et al.* (1995) muestra que cuando se emplea el biodiesel fabricado a partir de sebo animal en mezclas con etanol y diesel hay una reducción en la emisión de monóxido de carbono, pero ni las emisiones de dióxido de carbono ni las de hidrocarburos cambian; mientras que las emisiones de óxidos de nitrógeno son semejantes a las emitidas por diesel. La mezcla con que se obtuvo menor emisión de contaminantes es 80:13:7 (diesel: biodiesel de sebo: etanol).

En otro estudio hecho con biodiesel de colza, reportan que cuando la temperatura aumenta, disminuye considerablemente la emisión de monóxido de carbono, de óxidos de nitrógeno y de humo (Arrengle *et al.* 1999).

Otros estudios con biodiesel de origen vegetal señalan que hay una reducción de los contaminantes que provocan la lluvia ácida, como consecuencia del nulo contenido de sulfuros y metales de estos combustibles (Caynak *et al.* 2009). Por su alto contenido en oxígeno, sus emisiones de combustión son bajas en PM, CO, sulfuros, HAP, humo y ruido (Zullaikah *et al.* 2005).

1.7 Estándares internacionales de calidad del biodiesel

Los estándares de calidad del biodiesel están basados en experiencias previas realizadas con el diesel. La mayor parte de las normas de calidad están basadas en la norma Europea EN 142147 (2003) y la norteamericana ASTM D 6751 (2009). De manera general, las normas regulan características físico-químicas de los combustibles, como son: número de cetano, estabilidad de oxidación, densidad, viscosidad, índice de yodo, contenido de triglicéridos, entre otros.

Los límites de cada parámetro regulado varían en función de las materias primas utilizadas y de las condiciones propias del país donde se apliquen. Si bien estas características regulan de manera importante la composición química de las emisiones y las condiciones en que opere la combustión en motores de diesel, no existe una regulación que incluya los efectos biológicos que puedan desencadenar las emisiones de combustión de biodiesel, que también tendrían que ser específicos para cada tipo de biodiesel dependiendo de su materia prima de origen y de su proceso de fabricación.

1.8 Ensayos biológicos

La regulación de las emisiones de biodiesel está condicionada por sus características químicas, sin embargo, sus efectos en la salud deben ser considerados para evitar riesgos en la población. Diversos sistemas biológicos de prueba pueden utilizarse con la finalidad de reconocer la genotoxicidad de las emisiones de los combustibles.

Una de las pruebas *in vivo* ampliamente usada incluye las investigaciones con roedores y aunque los resultados son congruentes con estudios epidemiológicos, son costosos y complejos, además de ser métodos inespecíficos en la identificación de los compuestos causantes de la carcinogenicidad (Claxton y Woodall 2007).

Por otra parte, los ensayos de mutagenicidad en plantas presentan ventajas en cuanto a la detección de cambios genéticos a niveles génico y cromosómico, son métodos de bajo costo, sencillos y con rápida obtención de resultados, sin embargo, al ser sistemas biológicos vegetales, es complicada la extrapolación de resultados a otros organismos, además de que la sensibilidad y la exactitud del método es menor (Plewa 1978, International Programme On Chemical Safety 1985).

Otros sistemas eucariontes usados incluyen a *Saccharomyces cerevisiae*, células de mamíferos y líneas celulares de humanos (Claxton y Woodall 2007). A partir de estas últimas se hacen estudios sobre la formación de aductos, alteración y daño al ADN.

Una prueba reconocida que permite obtener resultados a corto plazo, de bajo costo y que puede ser aplicada con compuestos aún no identificados en mezclas complejas, es el ensayo de incorporación en placa, desarrollado por Ames *et al.* (1973), que permite identificar compuestos mutagénicos, los cuales son potencialmente carcinogénicos. El uso de diversas cepas de la bacteria utilizada permite hacer ensayos biodirigidos que identifiquen los compuestos o la familia de compuestos causantes de la mutagenicidad (Claxton *et al.* 2004, Claxton y Woodall 2007).

El ensayo de Ames utiliza como sistema biológico a la bacteria *Salmonella typhimurium* y se basa en la retromutación en el operón de histidina (o reversión a un estado protótrofo de histidina), por lo que el aumento del número de colonias que crecen en un medio con cantidades traza de este aminoácido, es proporcional a la potencia mutagénica del compuesto probado.

La cepa TA98 es generalmente empleada para esta prueba porque permite el reconocimiento de un amplio espectro de mutágenos en mezclas complejas de aire (Claxton *et al.* 2004); por las características genéticas que posee esta cepa, pueden ser detectadas las mutaciones por corrimiento en el marco de lectura.

La sensibilidad de la cepa TA98 se debe a que tiene mutaciones que eliminan el sistema de reparación por escisión y que aumentan la permeabilidad de la barrera de lipopolisacáridos, por lo que se evita la reparación de mutaciones y permite la entrada de compuestos genotóxicos. Aunado a esto, la adición del plásmido pKM101 también incrementa su sensibilidad (Bonneau *et al.* 1991).

II. JUSTIFICACIÓN

Como consecuencia de la limitada accesibilidad a los combustibles fósiles en el futuro, así como por la búsqueda de la mitigación de los efectos adversos de las emisiones de combustión, la incorporación de la biomasa como fuente energética ha sido discutida. Sus ventajas y desventajas deben ser tomadas en cuenta, de tal manera que su incorporación como fuente energética sea lo más benéfica posible (Cuadro 2).

Cuadro 2. Ventajas y desventajas del uso del biodiesel (Gómez *et al.* 2000, Koonin 2006, Demirbas 2009, Murugesan *et al.* 2009, Saravanan *et al.* 2010, Sun *et al.* 2010 y Balat 2011).

Ventajas	Desventajas
Reducción en la emisión de gases de efecto invernadero, monóxido de carbono (hasta 50 %), material particulado y metano.	La reducción en el consumo de combustibles fósiles es baja, ya que se usa en mezclas con diesel para disminuir su alta viscosidad.
Es una energía renovable	Altos costos de producción
Almacenamiento seguro, debido a su mayor punto de inflamación.	Baja estabilidad de almacenamiento (degradación después de 21 días)
Menor toxicidad de sus emisiones, debido a la disminución del contenido de HAP y sus derivados, así como por la ausencia de sulfuros.	Alta emisión de NOx debido al incremento de temperatura y presión de la cámara de combustión
Mayor degradabilidad que el diesel	Menor volatilidad y alta viscosidad.
Mayor eficiencia de combustión	
Puede ser usado en motores de compresión-ignición empleados para el diesel	

En México, ya existen programas que evalúan la incorporación al mercado del biodiesel en el sector transporte (SENER 2006), analizando aspectos económicos, de producción y uso, criterios de sustentabilidad, accesibilidad a materias primas, etc. dándose como un hecho la reducción de efectos nocivos en la salud y el ambiente. Sin embargo, los estudios realizados con pruebas de genotoxicidad y citotoxicidad muestran resultados dispares, ya que como los análisis químicos demuestran, la composición de las emisiones depende del tipo y del proceso de producción del biodiesel, de las condiciones de operación del motor y del tratamiento de la muestra (Swanson *et al.* 2007).

Swanson *et al.*, (2007) mencionan que si el metanol y el etanol no son removidos del biodiesel, en los procesos de combustión se podrían formar acetaldehídos y formaldehídos, clasificados como carcinógenos por la IARC (2006). Ballesteros *et al.* (2011) observaron que la emisión de compuestos carbonilos es mayor cuando se usa biodiesel de origen animal en comparación con el uso de petrodiesel.

Otros estudios revelan que con el uso de biodiesel disminuyen las emisiones de masa, carbono, metales, monóxido de carbono, hidrocarburos aromáticos policíclicos y compuestos orgánicos volátiles en comparación con las emisiones de diesel (Krahl *et al.*, 2009), sin embargo, sus emisiones desencadenan respuestas inflamatorias sistémicas y pulmonares, además de alteraciones cardiovasculares (Brito *et al.* 2010).

El biodiesel ocasiona efectos sobre la salud como: malestar, vértigo, náuseas e irrita las membranas mucosas, los ojos y la piel por la inhalación de los vapores cuando es calentado (López 2005).

El uso de biodiesel de origen animal ha sido planteado, porque al ser producido a partir de desechos grasos animales, no requiere de extensas áreas de cultivo. Sin embargo, a pesar de que su costo es bajo, por su alto contenido en ácidos grasos tiene un proceso de producción diferente al convencional usado para el de origen vegetal, por lo que aumentan sus costos de producción (Canakci y Van Gerpen 2001), además de que presenta el inconveniente de que durante su almacenamiento pueden cambiar sus propiedades, como la estabilidad oxidante y el punto de inflamación además de su baja disponibilidad en el mercado, ya que son subproductos de la industria cárnica.

Del mismo modo, su composición química depende del sexo, tipo de alimentación y condiciones ambientales de la especie de la que se extraiga. Lapuerta *et al.* (2008) señalan que la ventaja del uso de biodiesel de origen animal es la disminución de emisiones de óxidos de nitrógeno y el mejoramiento en el número de cetano, no es corrosivo y es renovable (Guru *et al.* 2009).

La mayor parte de los trabajos reportan los efectos mutagénicos y citotóxicos de las emisiones de biodiesel de origen vegetal en comparación con el diesel. Bajo este contexto, es necesaria la evaluación de los efectos de las emisiones de combustión del biodiesel de origen animal, donde además sean consideradas las condiciones de operación del motor, las cuales son de las principales variables que determinan la composición química de las emisiones y por tanto, sus efectos sobre los sistemas biológicos.

III. OBJETIVOS

3.1 General

Determinación de la mutagenicidad de extractos orgánicos de las emisiones de combustión de diesel y biodiesel mediante el ensayo de incorporación en placa (ensayo de Ames) con la bacteria *Salmonella typhimurium*, cepa TA98, con y sin activación metabólica.

3.2 Particulares

- Comparar el potencial mutagénico conforme se varían diferentes condiciones de operación del motor, como son el torque (fuerza que producen los cuerpos en rotación, Nm) y las revoluciones por minuto.
- Comparar si las potencias mutagénicas disminuyen o aumentan a medida que se incrementa la proporción de biodiesel en la mezcla con diesel.
- Determinar si las emisiones de diesel y biodiesel presentan mutagenicidad directa o indirecta y compararlas.

IV. HIPÓTESIS

1. Se observará la reducción de la mutagenicidad a medida que aumenta la proporción de biodiesel de origen animal en las mezclas con diesel.
2. La mutagenicidad desencadenada por los extractos orgánicos del material particulado de las emisiones será mayor cuando se incremente la potencia del motor.
3. La mutagenicidad indirecta (con S9) será menor a la directa (sin S9), debido a la reducción en la emisión de hidrocarburos aromáticos policíclicos (de acción indirecta) y al aumento en la emisión de NOx (relacionados con la formación de nitroaromáticos, de acción directa).

V. MATERIALES Y MÉTODO

5.1 Muestreo

El muestreo consistió en coleccionar las emisiones de combustión de diesel y mezclas con biodiesel de origen animal proporcionado por Grupo Energético ENERGEX al 5, 10 y 16.6 % a partir de un motor a diesel (1992 Mercedes Benz, modelo OM366LACID364 de 5.9 litros) bajo tres condiciones de operación: bajas, medias y altas (Cuadro 4). Las variables fueron las revoluciones por minuto y el torque, que son importantes en la determinación de la velocidad y fuerza del motor; ambos son parámetros que definen la potencia del motor.

Cuadro 4. Condiciones de operación del motor a diesel probados con las diferentes mezclas de combustible: Diesel, Biodiesel al 5 % (B5), Biodiesel al 10 % (B10) y Biodiesel al 16.6 % (B16.6), revoluciones por minuto (rpm).

Combustible	Bajas		Medias		Altas	
	rpm \pm 5	torque \pm 5	rpm \pm 5	torque \pm 5	rpm \pm 5	torque \pm 5
Diesel	884	100	1800	110	2094	89
B5	950	100	1680	110	2140	85
B10	955	90	1675	110	2032	85
B16.6	950	95	1685	106	2050	90

Durante 10 minutos de operación del motor las emisiones eran conducidas por túneles que llegaban a dispositivos de vidrio cubiertos por geles que mantenían un sistema térmicamente estable (<30 °C). Las partículas eran retenidas por filtros de teflón (marca PALLFLEX, Fiberfilm T60A20 20 X 25 cm) previamente pesados y acondicionados en un horno a temperatura de 400 °C durante 24 h en condiciones de oscuridad y estabilizados en un desecador con humedad relativa de 20 % y a una temperatura de 25 °C. Una vez coleccionado el material particulado, los filtros eran envueltos en aluminio y almacenados en un refrigerador a -20 °C (Figura 5).

La determinación de la masa de las partículas colectadas en los filtros se hizo mediante diferencia de pesos, usando una balanza analítica marca Sartorius modelo A200S, con una sensibilidad de 0.1 mg y verificada con pesas de 1 y 20 mg.

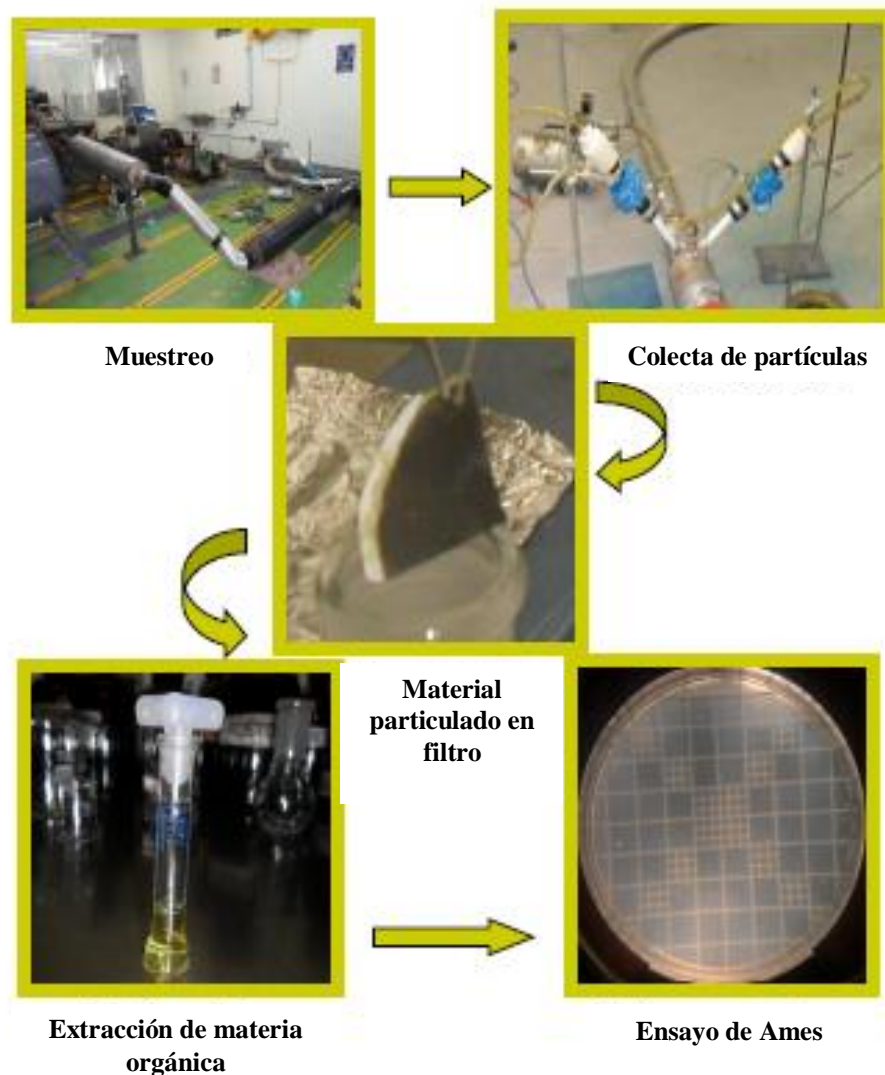


Figura 5. Método para la determinación de la mutagenicidad de los extractos orgánicos de las partículas emitidas por la combustión de diesel y de mezclas de biodiesel.

5.2 Obtención del extracto orgánico

La materia orgánica extraída (MOE) se caracteriza por tener alto contenido de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y sus derivados, entre otros compuestos a los que se les adjudican propiedades mutagénicas y carcinogénicas (Villalobos-Pietrini *et al.* 2006, 2007) por tal motivo, se extrajo la materia orgánica para la prueba de mutagenicidad.

La MOE se obtuvo mediante una celda de extracción a microescala asistida por ultrasonido con reflujo, diseñada en el Laboratorio de Mutagénesis Ambiental-CCA, método que se encuentra en proceso de patente (No. MX/a/2012/000790).

Una vez obtenido el extracto orgánico en un volumen aforado a 1000 μL , se tomó una alícuota de 200 μL que se secó con una corriente suave de nitrógeno gaseoso grado HPLC en un vial transparente de vidrio y por diferencia de pesos se determinó la cantidad de MOE.

Se hicieron los cálculos correspondientes para preparar las concentraciones de MOE para cada una de las muestras, que fueron seleccionados en experimentos previos con el criterio de mutagenicidad, que implica que la reversión inducida en la bacteria debe ser al menos al doble de la reversión espontánea.

5.3 Ensayo de mutagenicidad

5.3.1 Confirmación de genotipos

Antes de realizar los ensayos se corroboró que el sistema biológico empleado tuviera las características genotípicas que le permitieran responder a la aplicación de mutágenos. Para ello se empleó la cepa TA98 de la bacteria *Salmonella typhimurium*, que se distingue por tener cuatro modificaciones en su genotipo (Maron y Ames 1983):

1. Una mutación en el operón histidina (*hisD3052*), por lo que es una cepa auxótrofa de histidina (*his⁻*), de tal manera que necesita la adición de este aminoácido para crecer y reproducirse. La mutación dirigida en este operón altera de manera simultánea la producción bacteriana de la vitamina biotina, así que para mantener el crecimiento de esta cepa es necesaria la adición de estas dos biomoléculas.

2. La mutación *rfa* altera la permeabilidad de la capa de lipopolisacáridos, facilitando así el ingreso de grandes moléculas, que en cepas silvestres no ingresarían a la célula, como por ejemplo el cristal violeta. Con ello se aumenta la sensibilidad a los compuestos aplicados.

3. La mutación *uvrB* suprime al gen que codifica para el sistema de reparación por escisión de bases, así que la probabilidad de reparar el ADN dañado por agentes mutagénicos será considerablemente menor. Para la confirmación de este genotipo se aplica radiación ultravioleta, durante un periodo corto de tiempo, el resultado debe ser la inhibición del crecimiento bacteriano.

4. El último genotipo por confirmar es la presencia del plásmido pKM101, el cual no sólo le confiere resistencia a la ampicilina, sino que además aumenta la sensibilidad a compuestos mutagénicos.

5.3.2 Ensayo de Ames

El ensayo de Ames o de incorporación en placa fue empleado para la determinación mutagénica de la MOE en *Salmonella typhimurium*. Por cada muestra se realizó un ensayo con sus respectivos testigos (Cuadro 5), que determinaron la confiabilidad de la prueba, esto es, se consideró que el número de colonias revertantes estuviera dentro del intervalo reportado por otros estudios.

Cuadro 5. Testigos utilizados en la prueba de Ames

Testigo	Muestra	Concentración	Activación metabólica
Reversión espontánea			
Negativo directo	Dimetil sulfóxido	100 µL/placa	
Positivo indirecto	Benzo(a)pireno	1 µg/placa	S9+
Negativo indirecto	Dimetil sulfóxido	100 µL/placa	S9+
Positivo directo	1-Nitropireno	0.1 µg/placa	

Los recuadros rayados indican ausencia.

Para cada muestra se probaron cuatro concentraciones (10, 15, 20 y 25 µg/mL de MOE) por triplicado y en el caso de que la materia orgánica fuera insuficiente, se analizaron por duplicado, con y sin la fracción microsómica S9 para probar mutágenos indirectos y directos, respectivamente.

La S9 es la fracción microsómica de hígado de ratas que contiene membranas del retículo endoplásmico, ribosomas, enzimas solubles y cofactores exógenos que proporcionan a los mutágenos múltiples vías de bioactivación (Josephy *et al.* 1997, Mortelmans y Zieger 2000), es decir, de transformación a compuestos más electrofílicos con la capacidad de originar alteraciones al ADN o a otras biomoléculas. La fracción enzimática S9 se adquirió en el Laboratorio de Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, la cual fue pretratada con una mezcla de fenobarbital y β-naftoflavona (Maron y Ames 1983).

Antes de iniciar el ensayo de Ames se preparó la mezcla S9 al 10 % en condiciones de esterilidad y manteniendo la mezcla en hielo, el procedimiento fue el siguiente: en un matraz se agregaron 5 mL de amortiguador fosfatos (0.2 M y pH 7.4), 200 µL de solución cloruros (MgCl₂-6H₂O 0.4 M y KCl 1.65 M), 4 mL de agua esterilizada, 30.6 mg de NADP (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato 0.1 M), 14.13 mg de glucosa-6-fosfato y finalmente 1 mL de la fracción enzimática S9 para tener un volumen final de 10.2 mL.

Para realizar el ensayo de incorporación en placa, se inoculó el medio nutritivo (Oxoid No. 2) con una colonia de *S. typhimurum* y se incubó con agitación constante (120 rpm) a 37 °C durante 16 h en la oscuridad (cultivo nocturno). Posteriormente, se agregó a los tubos de ensayo con 2.5 mL de agar de superficie de medio mínimo (histidina/biotina 0.5 mM) la dosis a probar (100 µL) y el cultivo bacteriano (100 µL). Cuando se utilizó la mezcla S9 se le agregaron 500 µL en tubos con 2 mL de agar de superficie. Luego, la mezcla se agitó en un vórtex y se vertió en una placa con agar de medio mínimo. Las placas se incubaron a 37 °C por 48 h y finalmente las colonias revertantes fueron cuantificadas con un contador manual (Figura 6).

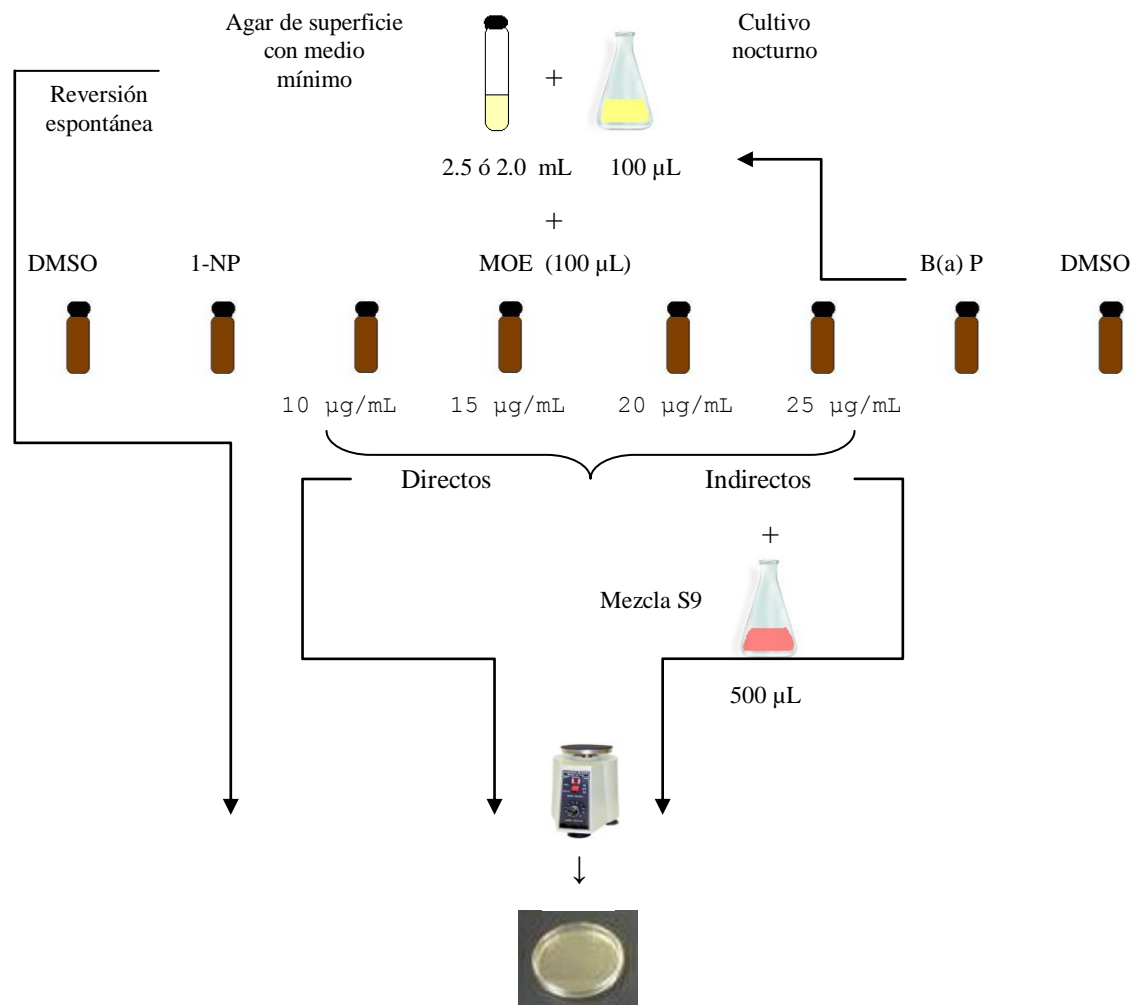


Figura 6. Esquema del ensayo de Ames con (S9+) y sin (S9-) activación metabólica para las muestras a probar y los testigos.

5.4 Análisis estadístico

Las potencias mutagénicas (revertantes/ μg de MOE) de cada ensayo fueron calculadas usando el método de mínimos cuadrados con el programa Statistica versión 8.0. Además, con dicho programa se comprobó la linealidad de la curva mediante el coeficiente de correlación de Pearson y se verificó que la pendiente y la ordenada al origen fueran diferentes de cero. Mediante el análisis de varianza (ANOVA), se comprobó que el modelo descrito por la pendiente fuera adecuado. Una vez determinados estos parámetros, se compararon las pendientes mediante la t de Student, con el método descrito por Steel y Torrie (1995) para muestras independientes con una hoja de cálculo de Microsoft Excel.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Material particulado y MOE obtenidos en los muestreos

La masa de material particulado colectado en cada filtro durante el muestreo, así como la masa de la MOE están reportadas en el cuadro 6.

Cuadro 6. Masa de la MOE y de las PM obtenidas en el muestreo en tres condiciones de operación del motor y con las cuatro mezclas de combustible.

Combustible	Bajas			Medias			Altas		
	Masa PM (mg)	Masa MOE (mg)	% MOE	Masa PM (mg)	Masa MOE (mg)	% MOE	Masa PM (mg)	Masa MOE (mg)	% MOE
Diesel	7,4	7	94,59	3,7	2	54,05	4,2	2,5	59,52
Biodiesel (5 %)	5,7	3,5	61,40	5,7	3	52,63	6,4	5	78,13
Biodiesel (10 %)	9,7	6	61,86	4,9	2,5	51,02	6,1	1,5	24,59
Biodiesel (16.6 %)	6,9	5	72,46	5,7	2,5	43,86	4,8	2,5	52,08

Como se puede observar en este cuadro, no existe una reducción en la emisión de PM con el uso de biodiesel, como se observa en trabajos preliminares (Wang *et al.* 2000, Zullaikah *et al.* 2005, Schröder *et al.* 2012). Mientras que para el cambio de la potencia del motor (torque y rpm), se observa que para las condiciones bajas, la emisión de material particulado y de MOE es mayor que en las condiciones medias y altas.

En cuanto al porcentaje de MOE evaluada, se observa que en la mayoría de muestras, el contenido de MOE es superior al 50 %. Es importante mencionar, que en estos datos no se consideró a las réplicas de cada filtro y sólo se tomaron en cuenta aquellos filtros de los que se extrajo la materia orgánica para los ensayos biológicos; se tendría que hacer el análisis del total de muestras para analizar la tendencia de reducción o aumento de las PM y de la MOE, a medida que se cambia la concentración de biodiesel en la mezcla y en la potencia del motor.

6.2 Validación de la prueba

Para verificar que durante el ensayo biológico la cepa fuera sensible a la aplicación de mutágenos, es necesaria la verificación de que las colonias revertantes obtenidas en los testigos estuvieran dentro de los intervalos reportados por trabajos previos (Frías-Villegas 2004). Los resultados obtenidos se observan en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Comparación del promedio de colonias revertantes obtenido durante los experimentos con el reportado por Frías-Villegas (2004).

Testigo	Promedio de rev/placa obtenido	Promedio de rev/placa reportado
	Media \pm D.E	Media \pm D.E
Reversión espontánea	28 \pm 7	39.5 \pm 15.25
Negativo directo (DMSO)	26 \pm 8	39.42 \pm 12.37
Positivo indirecto (B[a]P + S9)	191 \pm 59	108.74 \pm 37.87
Negativo indirecto (DMSO + S9)	32 \pm 9	39.76 \pm 12.78
Positivo directo (1-NP)	1099 \pm 266	281.14 \pm 91.67

Se puede concluir que el promedio de revertantes obtenidao durante los ensayos de mutagenicidad está en el rango encontrado en trabajos previos (Maron y Ames 1983, Frías-Villegas 2004), con un pequeño incremento en la potencia mutagénica del testigo positivo indirecto. En cuanto al testigo positivo directo es mayor el promedio de revertantes obtenido porque la concentración de 1-NP fue el doble (0.1 μ g/placa) al empleado en el trabajo de Frías-Villegas (50 ng/placa).

Considerando el modelo lineal de la dosis-respuesta, todas las pendientes y las ordenadas son diferentes de cero ($p < 0.05$) y en el análisis de varianza (ANOVA, $p < 0.05$) los datos se ajustaron al modelo lineal. La R de Pearson resultó tener valores cercanos a 0.75 (Cuadro 6). Todos estos elementos permiten avalar la validez de los ensayos realizados.

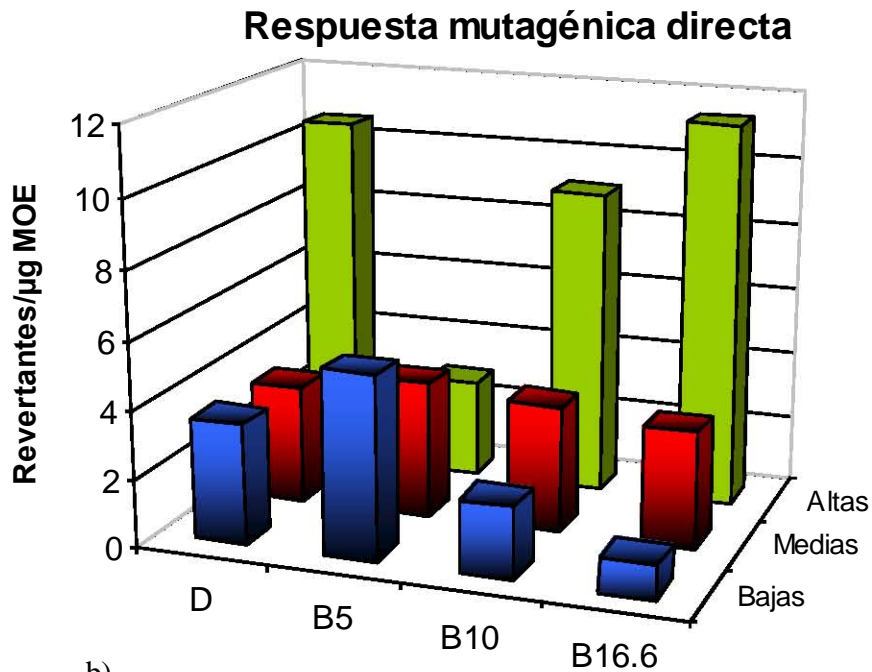
Cuadro 8. R² obtenidas del modelo lineal de dosis-respuesta de los ensayos de mutagenicidad para las condiciones probadas con y sin activación metabólica. * R² con valores bajos.

Combustible	R ²		
	Bajas	Medias	Altas
D-S9	0.85	0.94	0.85
D+S9	0.65	0.58	0.73
B5-S9	0.70	0.63	0.88
B5+S9	0.62	0.82	0.78
B10-S9	0.64	0.88	0.81
B10+S9	0.55	0.41 *	0.88
B20-S9	0.69	0.73	0.88
B20+S9	0.91	0.52	0.84

6.3 Respuesta mutagénica a la MOE de emisiones de diesel y de mezclas con biodiesel

Las potencias mutagénicas (revertantes/ μ g de MOE) obtenidas en los ensayos de Ames se muestran en la figura 7.

En la figura 7a, se observa que a condiciones bajas de operación del motor, la mutagenicidad disminuye conforme aumenta la concentración de biodiesel en la mezcla. Mientras que en condiciones intermedias, no hay diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las mutagenicidades que desencadenan las cuatro mezclas de combustibles. Por el contrario en condiciones altas de operación del motor, la mutagenicidad aumenta conforme se incrementa la proporción de biodiesel usado, aunque la mayor mutagenicidad es la de B10; este comportamiento podría deberse a que la adición de biodiesel en la mezcla incrementa la emisión de óxidos de nitrógeno (NO_x), por lo que podrían formarse nitro-derivados de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP); a estos compuestos derivados se les ha determinado su carácter mutagénico directo. Este aumento de óxidos de nitrógeno podría explicarse por el aumento de temperatura en el motor de combustión como lo reportan algunos trabajos (Gómez *et al.* 2000, Saravanan *et al.* 2010).



b)
a)

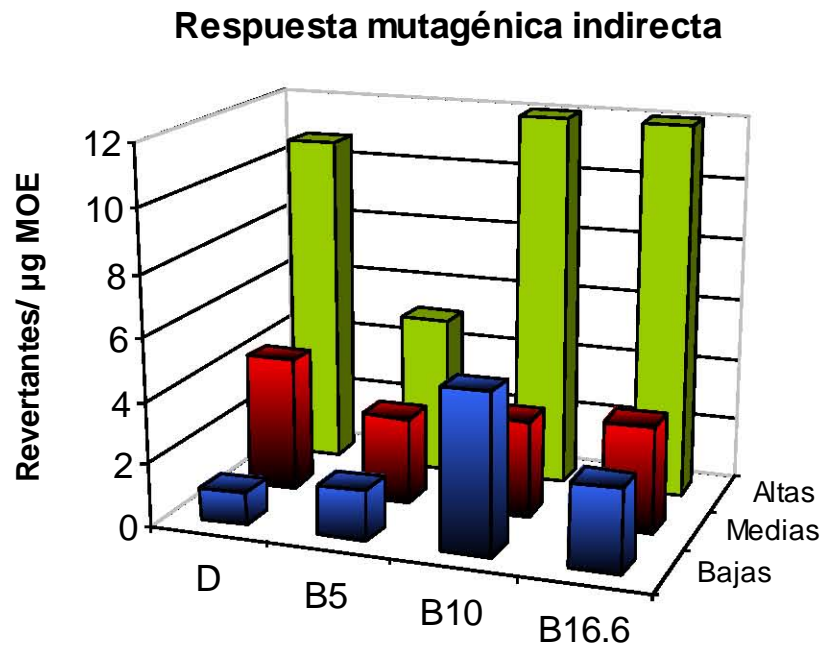


Figura 7. Potencias mutagénicas a) directas (S9-) y b) indirectas (S9+) obtenidas de los ensayos de incorporación en placa para las cuatro mezclas de combustible y las tres condiciones de operación del motor. D= Diesel, B5= Biodiesel al 5 %, B10=Biodiesel al 10 % y B16.6= Biodiesel al 16.6 %.

También puede observarse que cuando aumenta la potencia de motor (condiciones altas) aumenta la mutagenicidad de las emisiones. Algunos autores señalan que el uso de biodiesel de origen animal tiene poca estabilidad química durante su almacenamiento, esta baja estabilidad hace que varíen parámetros como el punto de inflamación, con ello se ha reconocido el aumento de emisiones, sin embargo, aún se desconoce si la generación de compuestos tóxicos no regulados incrementa o decrece, lo que pudiera explicar el comportamiento de incremento de mutagenicidad en condiciones altas de potencia del motor cuando se aumenta la concentración de biodiesel.

En la respuesta mutagénica indirecta (Figura 7b) se obtuvieron valores de R^2 más bajos (Cuadro 6). En las condiciones bajas hay un ligero incremento de la potencia mutagénica cuando aumenta el porcentaje de biodiesel, caso contrario aplicado a condiciones medias, aunque la mutagenidad desencadenada por las emisiones de diesel fue mayor que las mezclas. Mientras que para condiciones altas la mutagenicidad es parecida, con excepción de B5. De manera semejante a lo ocurrido para la respuesta mutagénica directa, la mutagenicidad por extractos orgánicos obtenidos en condiciones altas de operación del motor son mayores.

De manera general, las mutagenicidad directa e indirecta tienen valores cercanos (salvo algunas excepciones, principalmente en condiciones bajas), aunque significativamente diferentes ($p < 0.05$) y no existe una tendencia clara con respecto a la predominancia de determinado tipo de mutagenicidad mayor con respecto a la otra. Tampoco muestran una tendencia clara de cambio conforme se modifican las concentraciones de biodiesel. Dicho resultado puede atribuirse a la variabilidad *per se* de la muestra, ya que el biodiesel se degrada fácilmente durante su almacenamiento y a que, específicamente para el caso del producido a partir de grasas animales, existe baja homogeneidad de la muestra por el distinto origen de producción (Benjumea *et al.* 2010). En este contexto, es necesario mencionar que los resultados de la mutagenicidad desencadenados por los extractos orgánicos de las emisiones de biodiesel son distintos, como se ha mencionado anteriormente, en parte por la materia prima utilizada en la fabricación de biodiesel, así

como también tienen efectos biológicos distintos, Kooter *et al.* (2011), por ejemplo, recalcan que si bien el efecto mutagénico y el potencial oxidante disminuyen con el uso de biodiesel de origen vegetal, la citotoxicidad aumenta para el caso de B100. En los trabajos mencionados a continuación, así como en el Cuadro 9, se pueden observar esta aseveración.

En los ensayos realizados por Bünger y colaboradores (1998, 2000 y 2007) mediante el ensayo de Ames con distintas cepas de *Salmonella typhimurium*, muestran que a partir del uso de biodiesel extraído del aceite de la semillas de colza, la mutagenicidad disminuye, atribuyendo en parte el efecto mutagénico del diesel al aumento de viscosidad y al contenido de azufre. También señalan que el incremento de velocidad del motor se correlaciona con el aumento de la mutagenicidad, dicho resultado podría relacionarse con los resultados de Shi *et al.* (2000) y Kweon *et al.* (2002), quienes señalan que el aumento en la potencia del motor, provoca el aumento en las emisiones de combustión. En el presente trabajo también se obtuvo un incremento de la mutagenicidad conforme incrementan las rpm y el torque del motor, tanto en la respuesta directa como en la indirecta (sin y con S9, respectivamente).

Continuando con la discusión de Bünger y colaboradores, la disminución del potencial mutagénico de las emisiones de biodiesel la relacionan con el descenso en la concentración de HAP, sin embargo, señalan que los niveles de aldehídos y cetonas aumentan. Aldehídos tales como acroleína, formaldehído y acetaldehído podrían ser los causantes de los efectos tóxicos e irritantes en ojos y vías respiratorias superiores que desencadena las emisiones de biodiesel (Krahl *et al.* 1996). En trabajos del mismo grupo de investigación, concluyen que la emisión de MOE es mayor para los biocombustibles y lo atribuyen a que en una pequeña fracción del biodiesel no hay combustión. Por este hecho, recomiendan que sea ajustado el potencial mutagénico de las emisiones de biodiesel con la cantidad de materia orgánica emitida, ya que se podría dar una subestimación de potencial mutagénico del biodiesel.

Turrio-Baldassarri *et al.* (2004), expresan conclusiones un tanto distintas, ya que encontraron que los contaminantes regulados (hidrocarburos totales, CO, NOx, PM y SO) no presentaron diferencias significativas entre el D y el B20, con excepción del consumo de

combustible, donde fue mayor para el B20 (3 %) y a pesar de que hubo reducción de HAP en biodiesel, esta diferencia no fue significativa, sin embargo, el formaldehído tuvo un incremento del 18 % en las mezclas con biodiesel, un compuesto volátil clasificado por la IARC (1985) como probable carcinógeno en humanos. De manera similar, los resultados arrojados por la microscopía electrónica indicaron que la composición, morfología y aspecto granulométrico de las partículas emitidas por B20 y diesel son similares.

En el presente trabajo, no se puede atribuir el incremento de la mutagenicidad a la emisión de aldehídos, ya que son compuestos volátiles, es posible que se formen otros compuestos, que podrían originarse por la presencia de aditivos mezclados con el biodiesel. De hecho, Turrio-Baldasari. *et al.* (2004), encontraron altos coeficientes de variación en B20 y no en D y lo atribuyen a la variabilidad alta en la emisión de microcontaminantes. Esto es de esperarse en el biodiesel, y más aún en el de origen animal, que es el que más variabilidad tiene en su composición en comparación con los demás combustibles de origen vegetal, que son los reportados en la mayoría de estudios. Es importante mencionar, que el análisis de mutagenicidad no se ha hecho en muestras con emisiones de biodiesel animal, todas las reportadas son de biocombustibles de origen vegetal.

Otro aspecto interesante del trabajo mencionado es que la mayor mutagenicidad de las emisiones de B20 las hallaron en la fracción medianamente polar, por lo que en posteriores trabajos, podría hacerse un análisis químico de fracciones para poder identificar a las familias relacionadas con el efecto mutagénico. Este aspecto también tiene sus limitaciones, debido a que no existe una distribución de mutagenicidad que apunte a que se deba aumentar o disminuir el uso de biodiesel para disminuir efectos adversos, ya que el biodiesel animal parece ser de composición variable debido a su proceso de formación y al origen variable de la materia prima.

Cuadro 9. Resultados obtenidos de la evaluación físico-química y biológica de las emisiones de combustión del diesel y biodiesel.

Autores	Materia prima del biodiesel	Caracterización físico-química de las emisiones*	Efectos de las emisiones en los sistemas biológicos*
Geyer <i>et al.</i> , 1984	Vegetal	Aumentan benceno y aldehídos	
Krahl <i>et al.</i> , 1996	Semillas de colza	Disminuyen las emisiones de HAP, pero aumentan los niveles de aldehídos y cetonas. Aumenta la emisión de PM	
Bünger <i>et al.</i> 1998	Semillas de colza	Aumenta la masa de las emisiones Alto contenido de acroleína	Observaron mutagenicidad de los extractos orgánicos de las emisiones de diesel y biodiesel en las cepas TA98 y TA100, siendo mayor para el diesel. La mutagenicidad directa fue mayor. Mayor toxicidad en líneas celulares L929 expuestas a emisiones de biodiesel.
Bünger <i>et al.</i> 2000	Semillas de colza y soya	Alto contenido de HAP en la combustión de diesel y biodiesel de soya Aumenta la emisión de PM	Mayor mutagenicidad de las emisiones de diesel en la cepa TA98 La mutagenicidad directa fue mayor.
Turrio-Baldasarri <i>et al.</i> 2004	Semillas de colza	No encontraron diferencias en la emisión de HAP entre los combustibles muestreados Aumento en la emisión de formaldehído La composición, morfología y aspecto granulométrico de las partículas emitidas por ambos combustibles son similares Los contaminantes regulados (hidrocarburos totales, CO, NOx y PM) no presentaron diferencias significativas entre el D y el B20 En B20 hay un incremento en la emisión de la fracción ultrafina	No hubo respuesta mutagénica en TA98/1,8DNP6 La mutagenicidad indirecta fue mayor. Mayor potencia mutagénica en extractos de material particulado en la fase sólida en comparación con la fase gas. Mayor mutagenicidad en la fracciones medianamente polares para la fase particulada; en la fase gas fue mayor en la fracción más polar.
Yang <i>et al.</i> 2007	Residuos de aceite de cocina	Dependiendo del biodiesel usado puede emitir trans, trans-2,4-decadienal (tt-DDE)	
Krahl <i>et al.</i> 2009	Semillas de colza	Disminuyen hidrocarburos, CO y PM	Aumento de mutagenicidad en TA98+S9 y TA100-S9
Brito <i>et al.</i> 2010	Semillas de soya		El biodiesel desencadena efectos cardiovasculares, pulmonares y de inflamación sistémica mayores en ratos

(Continuación)

Autores	Materia prima del biodiesel	Caracterización físico-química de las emisiones*	Efectos de las emisiones en los sistemas biológicos*
Ballesteros <i>et al.</i> 2011	Animal	Alta emisión de carbonilos (formaldehído y acetaldehído) y de hidrocarburos en las emisiones de la fase gaseosa	
Kooter <i>et al.</i> 2011	Vegetal convencional EN14214	B100 disminuyó la emisión de material particulado y de oxi-HAP, pero no de nitro-HAP; incrementan los Nox, pero en las mezclas (B5, B10, 20) no hay diferencias En B100 disminuye el potencial oxidante, pero aumenta la citotoxicidad	
Schröder <i>et al.</i> 2012	Aceite de palma, lino y coco	Disminución en la emisión de PM, CO y PAH	Menor mutagenicidad Mayor mutagenicidad directa en TA98 para todos los casos Aceite de coco tuvo la menor mutagenicidad, pero el de lino fue la mayor, incluso que el diesel. Para el diesel y el biodiesel de colza y de lino, el formaldehído y el acetaldehído conforman el mayor porcentaje de emisión del total de aldehídos
Souza <i>et al.</i> 2012	Residuos de aceite de cocina	Incremento en la emisión de NOx , CO, HC Aumento de bióxido de carbono A mayor carga del motor, mayor es la emisión de CO y HC, y a menor potencia del motor, mayor es la emisión de NOx.	

*Comparación de los resultados obtenidos de las emisiones de biodiesel con respecto al diesel, con excepción a especificaciones mencionadas en el cuadro.
HAP=Hidrocarburos aromáticos policíclicos, PM=material particulado, HC=hidrocarburos, NOx=óxidos de nitrógeno.

VII. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos se puede concluir que:

1. El uso de biodiesel de origen animal produce mutagenicidad similar al diesel para las tres condiciones de operación del motor; la adición de biodiesel no muestra una tendencia de incremento o de disminución de la mutagenicidad en comparación con el diesel.
2. Tampoco se observa que algún tipo de mutagenicidad, directa (-S9) e indirecta (+S9), prevalezca sobre la otra, salvo para algunos casos.
3. El efecto mutagénico es mayor cuando aumenta la potencia de motor, tanto para la actividad mutagénica directa como indirecta.

Estos resultados, además de los reportados por otros autores hacen evidente que se deben homogenizar en composición los combustibles usados, lo que permitirá evitar interferencias de los microcontaminantes y llegar a conclusiones sobre los efectos biológicos del biodiesel, que por demás no está decir, los estudios son específicos de la materia prima del que se obtiene el biodiesel, entre otras variables.

VIII. RECOMENDACIONES

En la realización de un análisis que proporcione más información sobre los efectos sobre los sistemas biológicos de las emisiones de combustión del biodiesel, sería pertinente hacer las siguientes recomendaciones para futuros trabajos de esta índole.

1. Realizar un análisis de la composición química del biodiesel a utilizar, así como también de las emisiones. En este sentido, el análisis de la mutagenicidad de las fracciones de diferente polaridad de los extractos orgánicos podría proporcionar datos sobre las familias de compuestos que ejercen un mayor efecto mutagénico.
2. Utilizar mezclas con mayor proporción de biodiesel, como B50 y B100.
3. Emplear cepas con genotipos específicas a la aplicación de determinados grupos o familias de compuestos, por ejemplo el uso de cepas sensibles a los efectos de nitroaromáticos.
4. Realizar pruebas de citotoxicidad, las cuales en estudios previos con biodiesel de origen vegetal, han mostrado tener efectos contrarios a los que presentan los análisis genotóxicos.

IX. REFERENCIAS

- Adonis M., Martínez V., Riquelme R., Ancic R., González G., Tapia R., Castro M., Lucas D., Berthou F. y Gil L. (2003). Susceptibility and exposure biomarkers in people exposed to PAHs from diesel exhaust. *Toxicol. Lett.* 144, 3-15.
- Agarwal A. (2007). Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Progress in Energy and Combustion Sci.* 33, 233-271.
- Agudelo J., Benjumea P., Villegas A.P. (2010). Evaluation of nitrogen oxide emissions and smoke opacity in a HSDI diesel engine fuelled with palm oil biodiesel. [Evaluación de las emisiones de óxidos de nitrógeno y la opacidad de humos en un motor diesel operando con biodiesel de aceite de palma puro]. *Revista Facultad de Ingeniería.* 51, 62-71.
- Ali Y., Hanna M. A. y Borg J. E. (1995). Optimization of diesel. Methyl tallowate and ethanol blend for reducing emissions from diesel engine. *Bioresource Technol.* 52, 237–243.
- Amador-Muñoz O., Delgado-Rodríguez A., Villalobos-Pietrini R., Munive-Colín Z., Ortiz-Marttelo R., Díaz-González G., Bravo-Cabrera J.L. y Gómez-Arroyo S. (2001). Airborne particles, polycyclic aromatic hydrocarbons and mutagenicity in Mexico City southwest. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental.* 17, 193-204.
- Anderson H.R. (2009). Air pollution and mortality: a history. *Atmos. Environ.* 43, 142-152.
- Arregle J., Ruiz S., Desantes J.M. y Delage A. (1999). Characterization of the injection—combustion process in a D.I. Diesel engine running with rape oil methyl ester. *SAE paper* 1999-01-1497.
- ASTM International (2009). ASTM D6751: Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels. www.astm.org
- Bagley S.T., Gratz L.D., Johnson J.H. y McDonald J.F. (1998) Effects of an oxidation catalytic converter and a biodiesel fuel on the chemical, mutagenic, and particle size characteristics of emissions from a diesel engine. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1183–1191.
- Balat M. (2011). Potential alternatives to edible oils for biodiesel production – A review of current work. *Energy conversion and management.* 52, 1479-1492.
- Ballesteros R., Monedero E. y Guillén-Flores J. (2011). Determination of aldehydes and ketones with high atmospheric reactivity on diesel exhaust using a biofuel from animal fats. *Atmos. Environ.* 45, 2690-2698.
- Barraza-Villarreal A., Sunyer J., Hernandez-Cadena L., Escamilla-Nuñez M.C., Sienna-Monge J.J., Ramírez-Aguilar M., Cortez-Lugo M., Holguin F., Diaz-Sánchez D., Olin A.C.,

Romieu I. (2008). Air pollution, airway inflammation, and lung function in a cohort study of Mexico City School children. *Environ. Health Perspect.* 116, 832-838.

Barsic N. y Humke A. (1981). Performance and emissions characteristics of a naturally aspirated diesel engine with vegetable oils. SAE, paper number 810262.

Basha S.A., Raja-Gopal K. y Jebaraj S. (2009). A review on biodiesel production, combustion, emissions and performance. *Renewable and Sustainable Energy Review.* 13, 1628-1634.

Benjumea H.P.N., Agudelo J. y Cano G. (2004). Estudio experimental de las variables que afectan la reacción de transesterificación del aceite crudo de palma para la producción de biodiesel. *Scientia et Técnica X.* 169-174.

Benjumea H.P.N., Agudelo S. J. R. y Ríos L. A. (2010). Biodiesel: producción, calidad y caracterización. Editorial Universidad Antorquia. p.152.

Biodiesel Chiapas (2012). www.biodieselchiapas.mx

Bonneau D., Thybaud V., Melcion C., Bouhet F. y Cordier A. (1991). Optimum associations of tester strains for maximum detection of mutagenic compounds in the Ames test. *Mutat. Res.* 252, 269-279.

Brito J.M., Belotti L., Toledo A.C., Antonangelo L., Silva F.S., Alvim D.S., Andre P.A., Saldiva P.H.N. y Rivero D.H.R.F. (2010). Acute cardiovascular and inflammatory toxicity induced by inhalation of diesel and biodiesel exhaust particles. *Toxicol. Sci.* 116, 67-78.

Bünger J., Krahl J., Franke H.U., Munack A. y Hallier E. (1998). Mutagenic and cytotoxic effects of exhaust particulate matter of biodiesel compared to fossil diesel fuel. *Mutat. Res.* 415, 13-23.

Bünger J., Müller M.M., Krahl J., Baum K., Weigel A., Hallier E. y Schulz T. G. (2000). Mutagenicity of diesel exhaust particles from two fossil and two plant oil fuels. *Mutagenesis.* 15, 391-397.

Bünger J., Krahl J., Munack A., Ruschel Y., Schröder O., Emmert B., Westphal G., Müller M., Hallier E. y Brüning T. (2007). Strong mutagenic effects of diesel engine emissions using vegetable oil as fuel. *Arch. Toxicol.* 81, 599-603.

Canakci, M. y Van Gerpen, J. (2001). Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids. *Transactions of the ASAE.* 44, 1429 -1436.
palm oil. *Expert Syst Appl.* 36, 68-80.

Cautreels W. y Van Cauwenberghe K. (1978). Determination of organic compounds in airborne particulate matter by gas chromatography-mass spectrometry. *Atmos. Environ.* 10, 447-457.

Cape J.N. (2003). Effects of airborne volatile organic compounds on plants. *Environ. Pollut.* 122, 145-157.

Carvalho-Oliveira R., Pozo R.M.K., Lobo D.J.A., Lichtenfels A.J.F.C., Martins-Junior H.A., Bustilho J.O.W.V., Saiki M., Sato I.M. y Saldiva P.H.N. (2005). Diesel emission significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case of study in Sao Paulo, Brazil. *Environ. Res.* 98, 1-7.

Castillejos M. , Borja-Aburto V.H., Dockery D.W., Gold, D.R. y Loomis, D. (2000). Airborne coarse particles and mortality. *Inhal. Toxicol.* 12, 61-72.

Çaynak S., Gürü M., Biçer A., Keskin A. y Çingür Y. (2009). Biodiesel production from pomace oil and improvement of its properties with synthetic manganese additive. *Fuel.* 88, 534-538.

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) 2004. Air Quality Report of Sao Paulo State, 2003. Sao Paulo, Brasil.

Claxton L.D., Matthews P.P. y Warren S.H. (2004). The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: *Salmonella* mutagenicity. *Mutat. Res.* 567, 347-399.

Claxton L.D. y Woodall G.M. (2007). A review of the mutagenicity and rodent carcinogenicity of ambient air. *Mutat. Res.* 636, 36-94.

CONAE (Comisión Nacional para el Ahorro de Energía). (2007). Biodiesel. 11 p. www.conae.gob.mx/wb/CONAE/CONA_normatividad

De Kok T. M.C.M., Driee H. A.L., Hogervorst J. G.F. y Briede J. J. (2006). Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: A review of recent studies. *Mutat. Res.* 613, 103-122.

Demirbas A. (2009). Political, economic and environmental impacts of biofuels: a review. *Applied Energy.* 86, 108-117.

Diario Oficial de la Federación (2008). Ley para el aprovechamiento de energías renovables y el financiamiento de la transición energética. pp. 12.

Dorado M.P., Ballesteros E., Arnal J.M., Gómez J. y López F.J. (2003). Exhaust emissions from a diesel engine fuelled with transesterified waste olive oil. *Fuel.* 82, 1311-1315.

Draper W. M. (1986). Quantitation of nitro and dinitropolycyclic aromatic hydrocarbons in diesel exhaust particulate matter. *Chemosphere.* 15, 437-447.

EN 142147 (2003) European Standard. www.biodieselpain.com.

Environmental Protection Agency (EPA) (2002). A comprehensive analysis of biodiesel impacts of exhaust emissions: draft technical report. United States. www.epa.gov/oms/models/analysis/biodsl/p02001.pdf

Enweremadu C. C. y Rutto H. L (2010). Combustion, emission and engine performance characteristics of used cooking oil biodiesel – A review. *Renew Sustain Energy Rev.*14, 2863–2873.

Espinosa M. y Babcock L. (1987). Impact of mobile source diesel emissions on air quality in Mexico City: A beginning, presentado en el 80° Congreso de la Air Pollution Control Association, Nueva York, 1987.

Frías-Villegas A. (2004). Mutagenicidad producida por diferentes fracciones del material orgánico extraído de las partículas $\leq 10 \mu\text{m}$. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, p. 101.

Friendlander K.S. (1973). Small particles air pose a big control problem. *Environ. Sci. Technol.* 7, 1115-1118

Geyer S.M., Jacobus M.J. y Lestz S.S. (1984). Comparison of diesel engine performance and emissions from neat and transesterified vegetable oils. *Trans. Am. Soc. Agric. Eng.* 27, 375-381.

Gómez M.E.G., Howard-Hildige R., Leahy J.J., O'reilly T., Supple, B. y Malone, M. (2000). Emission and performance characteristics of a 2 liter Toyota diesel van operating on esterified waste cooking oil and mineral diesel fuel. *Environ. Monitor. Assess.* 65, 13-20.

Graboski M.S. y McCormick R.L. (1998). Combustion of fat and vegetable oil derived fuels in diesel engines. *Progress in Energy and Combustion Science.* 24, 125-164.

Guru M., Artukoglu B.D., Keskin A. y Koca A (2009). Biodiesel production from waste animal fat and improvement of its characteristics by synthesized nickel and magnesium additive. *Energy Convers Manage.* 50, 498–502.

Guru M., Koca A., Can O, Cinar C. y Sahin F. (2010). Biodiesel production from waste chicken fat based sources and evaluation with Mg based additive in a diesel engine. *Renew Energy.*35, 637–43.

Gutierrez-Castillo M.E., Roubicek D.A., Cebrián-García M.E., De Vizcaya-Ruíz A., Sordo-Cedeña M. y Ostrosky-Wegman P. (2006). Effect of chemical composition on the induction of DNA damage by urban airborne particulate matter. *Environ. Molecular Mutagenesis.* 47, 199-211.

Health Effects Institute Perspectives (2002). Understanding the health effects of components of the particulate matter mix: progress and next steps.

Hemmingsen J.G., Moller P., Nojgaard J.K., Rousgaard M. y Loft S. (2011). Oxidative stress, genotoxicity, and vascular cell adhesion molecule expression in cells exposed to particulate matter from combustion of conventional diesel and methyl ester biodiesel blends. *Environ. Sci. Technol.* 45, 8545-8551.

Hinds W. (1982). *Aerosol technology properties, behavior and measurement of airborne particles*. Wiley-Interscience, Nueva York.

IARC (1995). International Agency for Research on Cancer, <http://www.iac.frS>.

IARC (2001). International Agency for Research on Cancer, <http://www.iac.frS>.

IARC (2006). International Agency for Research on Cancer, <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol88/mono88.pdf>

International Programme on Chemical Safety, Guide to short term tests for detecting mutagenic and carcinogenic chemicals, *Environmental Health Criteria* 51 (1985). Published under the joint sponsorship of the United Nations Environment Programme, the International Labour Organisation, and the World Health Organization, Geneva, p. 162.

Josephy D., Gruz P. y Nohmi T. (1997). Recent advances in the construction of bacterial genotoxicity assays. *Mutat. Res.* 121, 25-32.

Koonin S.E. (2006). Getting serious about biofuels. *Science.* 311, 435.

Kooter I. M , Van Vugt M. A.T.M., Jedynska A.D., Tromp P. C.,Houtzager M. M.G., Verbeek R. P., Kadijk G., Mulderij M. y Krul C. A.M. (2011). Toxicological characterization of diesel engine emissions using biodiesel and a closed soot filter. *Atmos. Environ.* 45, 1574-1580.

Krahl J., Bünger J., Jeberien H.E., Prieger K., Schütt C., Munack A. y Bahadir M. (1996). Analyses of biodiesel exhaust emissions and determination of environmental and health effects, in: *Proceedings of the third liquid fuel conference, liquid fuels and industrial products from renewable resources*, ASAE, St. Joseph, MI, USA. 149–165.

Krahl J., Knothe G., Munack A., Ruschel Y., Schröder O., Hallier E., Westphal G. y Bünger J. (2009). Comparison of exhaust emissions and their mutagenicity from the combustion of biodiesel, vegetable oil, gas-to-liquid and petrodiesel fuels. *Fuel.* 88, 1064-1069.

Kweon C.B., Foster D. E., Schauer J. J. y Okada S. (2002). Detailed chemical composition and particle size assessment of diesel engine exhaust. *SAE Technical Paper* 2002-01-2670.

Lapuerta M., Herreros J.M., Lyons L.L., Garcia-Contreras R. y Briceno Y. (2008). Effect of the alcohol type used in the production of waste cooking oil biodiesel on diesel performance and emissions. *Fuel*. 87, 3161-3169.

Lee K., Foglia T. y Chang K. (2002). Production of alkyl ester as biodiesel from fractionated lard and restaurant grease. *JAOCs*. 79, 191-195.

Lewtas, J. (1983). Evaluation of the mutagenicity and carcinogenicity of the motor vehicle emissions in short-term bioassay. *Environ. Health Perspect.* 47, 141-152

Liaquat A.M., Kalam M.A., Masjuki H.H. y Jayed M.H. (2010). Potential emissions reduction in road transport sector using biofuel in developing countries. *Atmos. Environ.* 44, 3869-3877.

Licht F.O. (2006) World ethanol and biofuels Report. National Biodiesel Board (NBB). Worldwatch Institute.

Lin Y-C, Hsu K-H y Chen C-B (2011). Experimental investigation of the performance and emissions of a heavy-duty diesel engine fueled with waste cooking oil biodiesel/ultra-low sulfur diesel blends. *Energy*. 36, 241–248.

López D.M.A. (2005). El biodiesel: una alternativa al transporte. Ediciones MADU. España. p. 131.

Lu J, Nie K, Xie F, Wang F y Tan T.(2007). Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida* sp. 99–125. *Process Biochem.* 42, 1367–1370.

Machado-Correa S. y Arbilla G. (2006). Aromatic hydrocarbons emissions in diesel and biodiesel exhaust. *Atmos. Environ.* 40, 6821-6826.

Ma F., Clements L. y Hanna M. (1998). Biodiesel fuel from animal fat. Ancillary studies on transesterification of beef tallow. *Ing. Eng. Chem. Res.* 37, 3768-3771.

Maron D.M. y Ames B.N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113, 173-215.

Matti M.M. (2007). Chemical characterization of particulate emissions from diesel engines: A review. *Aerosol Science.* 38, 1079-1118.

McClellan R. O. (1987). Health effects of exposure to diesel exhaust particles. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 27, 279–300.

Meher L., Sagar D. y Naik S.(2006). Technical aspects of biodiesel production by transesterification: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.*10, 248-268.

Meka P., Tripath V. y Singh R. (2007). Synthesis of biodiesel fuel from safflower oil using various reaction parameters. *Journal of Oleo Science*. 56, 9-12.

Mittelbach M., Worgetter M., Peinkopf J. y Junek H. (1983). Preparation and use of rape oil methyl ester. *Energy Agric.* 2, 369-384.

Mittelbach M. y Remsechmidt C. (2004). Biodiesel. *The comprehensive Handbook*. Viena, Boersedruck Ges. m. b. H.

Monyem A. y Van Gerpen J.H. (2001). The effect of biodiesel oxidation on engine performance and emissions. *Biom. and bioener.* 20, 317-325.

Mortelmans K. y Zeiger E. 2000. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* 455, 29-60.

Murugesan A., Umarani C., Subramanian R. y Nedunchezian N. (2009). Bio-diesel as an alternative fuel for diesel engines: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 13, 653-662.

Nelson R. y Schrock M. (2006). Energetic and economic feasibility associated with the production, processing and conversion of beef tallow to a substitute diesel fuel. *Biomass and bioenergy.* 30, 584-591.

Norma Mexicana NMX-F-590-SCFI-2009. Aceites y grasas vegetales o animales- aceite de Jatropha- especificaciones. p 8

Noureddini H. y Zhu D. (1997). Kinetics of transesterificación of soybena oil. *JAOCS.* 74, 1457-1463.

NREL (2007). Gasoline/diesel PM split study. National Renewable Energy Laboratory. http://www.nrel.gov/vehiclesandfuels/nfti/feat_split_study.html.

Oberdörster G., Ferin J., Finkelstein G., Wade P. y Corson N. (1990). Increased pulmonary toxicity of ultrafine particles? II. Lung lavage studies. *J. Aerosol Sci.* 21, 384-387.

OMS (Organización Mundial de la Salud). (1973). Long term programme in environmental pollution control in Europe. Study on Chronic respiratory disease in children in relation to air pollution. EURO 3114.

Oner C y Altun S. (2009). Biodiesel production from inedible animal tallow and an experimental investigation of its use as alternative fuel in a direct injection diesel engine. *Appl Energy.* 86, 2114-2120.

Ortuño S.A. (2009). El mundo del petróleo: origen, usos y escenarios. FCE. p. 210

Petróleos Mexicanos (2011). Anuario estadístico. www.pemex.com

Pitts Jr., J.N., Doyle G.J., Lloyd A.C. y Winer A.M. (1975) Chemical transformations in photochemical smog and their applications to air pollution control strategies, second annual report, NSF-RANN Grant No. AEN73-02904-A02, p. V-8.

Plewa M.J. (1978). Activation of chemicals into mutagens by green plants: a preliminary discussion, *Environ. Health Perspect.* 27, 45–50.

Pope C.A., Burnett R.T., Thun M.J., Calle E.E., Krewski D., Ito K. y Thurston G.D. (2010). Lung cancer, cardiopulmonary, mortality and long term-exposure to fine particulate air pollution. *JAMA.* 287, 1132-1141.

Razon L.F. (2009). Alternative crops for biodiesel feedstock. *Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources.* 4, 15 p.

Sagai M., Saito H., Ichinose T., Kodama M. y Mori Y. (1993). Biological effects of diesel exhaust particles. I. In vitro production of superoxide and in vivo toxicity in mouse. *Free Radical Biology and Medicine.* 14, 37-47.

Saldarriaga H., Villalobos-Pietrini R., Solano G., Amador O., Gaspariano R., Palma R. y Munive Z. (2008). Aliphatic, polycyclic aromatic hydrocarbons and nitrated- polycyclic aromatic hydrocarbons in PM10 in Southwestern Mexico City. *Polycyclic aromatic compounds.* 28, 578-597.

Sánchez-Carrillo C.I., Cerón-Mireles P. , Rojas-Martínez M.R., Mendoza-Alvarado L., Olaiz-Fernández G. y Borja-Aburto V.H. (2003). Surveillance of acute health effects of air pollution in Mexico City. *Epidemiology.* 14, 536-544.

Santos U.P., Terra-Filho M, Lin C.A., Pereira L.A., Vieira T.C., Saldiva P.H., Braga A.L. (2008). Cardiac arrhythmia emergency room visits and environmental air pollution in Sao Paulo, Brazil. *J Epidemiol Community Health.* 62, 267-272.

Saravanan S., Nagarajan G., Lakshmi Narayana Rao G. y Sampath, S. (2010). Combustion characteristics of a stationary diesel engine fuelled with a blend of crude rice bran oil methyl ester and diesel. *Energy.* 35, 94-100.

Schröder O., Munack A., Schaak J., Pabst C., Schmidt L., Bünger J. y Krahl J. (2012). Emissions from diesel engines using fatty acid methyl esters from different vegetable oils as blends and pure fuel. *Physics. Conference Series* 364.

Schuetzle D. y Frazier J. A. (1986). Factors influencing the emission of vapor and particulate phase components from diesel engines. En: Ishinishi N., Koizumi A., McClellan R. O., Stoeber W., eds. *Carcinogenicity and mutagenicity of diesel engine exhaust.* Amsterdam. Elsevier Sci. Pub. 41-64.

Schwab A., Bagby M. y Freedman B. (1987). Preparation and properties of diesel fuels from vegetable oils. *Fuel.* 66, 1372-1378.

SENER (Secretaría de Energía) (2006). Potenciales y viabilidad del uso de bioetanol y biodiesel para el transporte en México.

[www.sener.gob.mx/res/169/Biocombustibles en Mexico Estudio Completo. pdf](http://www.sener.gob.mx/res/169/Biocombustibles_en_Mexico_Estudio_Completo.pdf).

Shi J. P., Mark D., y Harrison R. M. (2000). Characterization of particles from a current technology heavy-duty diesel engine. *Environ. Sci. Technol.* 34, 748–755.

Simkhovich B.Z., Kleinman M.T. y Kloner R.A. (2008). Air pollution and cardiovascular injury. *Epidemiology, toxicology, and mechanisms (Review)*. *J. American College of Cardiol.* 52, 719-726.

Souza V. O., Márcia D. V., Rodrigues P. B. C., Sodré J.R. (2012). Exhaust emissions from a diesel power generator fuelled by waste cooking oil biodiesel. *Sci. Total Environ.* 431, 57-61.

Steel R.G.D. y Torrie J.H. (1995). *Bioestadística. Principios y procedimientos*. 2a edición. Mc Graw Hill, México. 622p.

Sun J., Caton J.A. y Jacobs T.J. (2010). Oxides of nitrogen emissions from biodiesel-fuelled diesel engines. *Progr. Energy Comb. Sci.* 36, 677-695.

Sunil V.R., Patel K.J., Mainelis G., Turpin B.J., Ridgely S., Laumbach R.J., Kipen H.M., Nazarenko Y., Veleparambil M., Gow A.J., Laskin J.D. y Laskin D.L. (2009). Pulmonary effects of inhaled diesel exhaust in aged mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 241, 283-293.

Swanson K. J., Madden M. C., y Ghio A. J. (2007). Biodiesel exhaust: The need for health effects research. *Environ. Health Perspect.* 115, 496-499.

Sydbom A., Blomberg A., Parnia S., Stenfors N., Sandstrom T. y Dahlen S.E. (2001). Health effects of diesel exhaust emissions. *Eur. Respir. J.* 17, 733–746.

Turrio-Baldassarria L., Battistelli C. L., Contia L., Crebellia R., De Berardisa B., Iamicelia A.L., Gambinob M. y Iannaccone S. (2004). Emission comparison of urban bus engine fuelled with diesel oil and biodiesel blend. *Sci. Total Environ.* 327: 147-162.

Vicente-Crespo G., Martínez-Rodríguez M. y Aracil-Mira J. (2001). Biodiesel: Una alternativa real al gasóleo mineral. *Ingeniería Química.* 33, 135.

Villalobos-Pietrini R., Amador-Muñoz O., Waliszewski S., Hernández-Mena L., Munive-Colín Z., Gómez-Arroyo S., Bravo-Cabrera J.L., Frías-Villegas A. (2006). Mutagenicity and polycyclic aromatic hydrocarbons associated with extractable organic matter from airborne particles $\leq 10 \mu\text{m}$ in southwest Mexico City. *Atmos. Environ.* 40, 5845-5857.

Villalobos-Pietrini R., Hernández-Mena L., Amador-Muñoz O., Munive-Colín Z., Bravo-Cabrera J.L., Gómez-Arroyo S., Frías-Villegas A., Waliszewski S., Ramírez-Pulido J. y

Ortiz-Muñiz R. (2007). Biodirected mutagenic chemical assay of PM₁₀ extractable organic matter in Southwest Mexico City. *Mutat. Res.* 634, 192-204.

Vouk V. B. y Piver W. T. (1983). Metallic elements in fossil fuel combustion products: amounts and form of emissions and evaluation of carcinogenicity and mutagenicity. *Environ. Health Perspect.* 47, 201–225.

Wang W.G., Lyons D.W., Clark N.N., Gautan M. y Norton P.M.(2000). Emissions from heavy trucks fueled by diesel and biodiesel blend without engine modifications. *Environ. Sci. Technol.* 34, 933–939.

Wen Z. y Johnson M.B. (2009). Microalgae as a feedstock for biofuel production. *Communications and Marketing, College of Agriculture and Life Sciences, Virginia Polytechnic Institute and State University, Publication 442-886.*

Yang H.H., Lo M.Y., Chi-Wei L.J., Wang J.S. y Hsieh D.P.H. (2007). Characteristics of trans, trans-2,4-decadienal and polycyclic aromatic hydrocarbons in exhaust of diesel engine fueled with biodiesel. *Atmos. Environ.* 41, 3373-3380.

Yushi-Bai, Suzuki A.K. y Sagai M. (2001). The cytotoxic effect of diesel exhaust particles on human pulmonary artery endothelial cells in vitro: role of active oxygen species. *Free Radical Biol. Medic.* 30, 555-562.

Zullaikah S., Lai C.C., Vali S.R. y Ju Y.H. (2005). A two-step acid-catalyzed process for the production of biodiesel from rice bran oil. *Biores. Technol.* 96, 1889-1896.