

## CONTRIBUCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN Y CLORACIÓN EN LA MUTAGENICIDAD, GENOTOXICIDAD Y PRESENCIA DE MUTÁGENOS EN AGUA POTABLE

### CONTRIBUTION OF CHLORINATION TO THE MUTAGENICITY, GENOTOXICITY AND PRESENCE OF MUTAGENS IN POTABLE WATER

Margarita Zuleta<sup>1</sup>, Yolanda Uribe<sup>1</sup>, Carlos Valencia<sup>1</sup>, Horacio Vargas<sup>1</sup>, Luz Yaneth Orozco<sup>1</sup>, Carlos López<sup>2</sup>

#### Resumen

Este trabajo evaluó el efecto mutagénico y genotóxico producido por tres tipos de aguas: 1) agua sin tratar que surte una planta de potabilización, 2) agua tratada y clorada y 3) agua que llega a los domicilios; también se identificaron mutágenos presentes en el agua domiciliaria. El test de Ames encontró que el agua contaminada a pH 7 que entra a la planta presenta alta mutagenicidad indirecta superó siete veces la mutagenicidad del control, pero después de tratada, sólo produjo dos y medio veces la mutagenicidad indirecta del control. Lo anterior indica que la planta removió el 65% de la mutagenicidad procedente de la contaminación. Pero, la cloración del agua a pH 2 produjo aumento ostensible de la mutagenicidad directa en la cepa TA100 la cual superó ocho veces el control. Este mismo patrón de mutagenicidad se observó en los domicilios pero en menor escala. Los tres tipos de agua presentaron alta genotoxicidad significativa en linfocitos humanos, lo que indica que los mutágenos presentes en el agua de consumo pueden dañar el ADN de estas células, y por lo tanto, podrían implicar un factor de riesgo para la salud humana. Un análisis por cromatografía de gas acoplado a espectrometría de masas (GC/MS) detectó la existencia de cinco hidrocarburos policíclicos aromáticos en el agua domiciliaria: Naftaleno 1,1'-(1,10 decanodil) bis, fenantreno 9 dodeciltetradecahidro, dibenzo(a,h)antraceno 1,2,3,4 tetrahidro, benz(a)antraceno 7,12 dimetil y 9, 9' bifenantreno octacosahidro de los cuales, los primeros cuatro son mutacarcinógenos reconocidos. También se identificó la hormona esteroidea androstane 5 alfa que podría ser promotora del proceso de carcinogénesis.

*Palabras clave:* agua potable, carcinógenos, cloración, contaminación, hidrocarburos policíclicos aromáticos, mutágenos.

#### Abstract

This study evaluated the mutagenic and genotoxic activities produced by three types of water: 1) raw polluted water which supply a treatment plant, 2) water after it has been treated including chlorination, and 3) the domiciliary potable water. The Ames test found that raw water at pH 7 in the plant exhibited high indirect mutagenic effect, over seven times the control, but after this water was treated and chlorinated in the plant produced low indirect mutagenicity, only two and half times the control. This result may indicate that the 65% of the polluted mutagenic materials were removed by the treatment in the plant, but, the chlorinated water at pH 2 increased ostensibly the direct mutagenicity, which was eight times over the mutagenicity from the control in the strain TA100. The same mutagenic pattern was observed but in lower amounts in the domiciliary drinking water. All three types of water samples also, exhibited high genotoxicity in human lymphocytes. This may indicate that mutagens present in this drinking water can damage human DNA in these cells, therefore may implicate a risk for human health. After analyzing neutral extracts from domiciliary drinking water, using GC/MS, five polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were detected: Naphthalene 1,1' (1,10 decanodil) bis, phenanthrene 9 dodecyltetradecahydro, dibenz(a,h)anthracene 1,2,3,4 tetrahydro, 9,9' biphenantrene octacosahydro, and benz(a)anthracene 7,12 dimethyl. The four first of them PAH have been recognized as mutacarcinogens. In this water, it was identified the hormone Androstane 5 alpha.

*Key words:* carcinogens, chlorination, drinking water, mutagens, pollution, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH).

Recibido: marzo de 2004; aceptado para publicación: octubre de 2004.

<sup>1</sup> Grupo de Carcinogénesis, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia. A. A. 1226, Medellín (Antioquia), Colombia. Correo electrónico: <mutagenesis@matematicas.udea.edu.co>.

<sup>2</sup> Laboratorio de Análisis de Residuos, Instituto de Química, Universidad de Antioquia. A. A. 1226, Medellín (Antioquia), Colombia. Correo electrónico: <carloslopez@matematicas.udea.edu.co>.

## INTRODUCCIÓN

Los afluentes que surten de agua a las plantas de potabilización pueden recibir mutágenos por medio de contaminación con pesticidas que en su mayoría han mostrado ser mutagénicos (Blair, 1995; Brown *et al.*, 1990; Rehana *et al.*, 1995; Sierra *et al.*, 1998; Zuleta *et al.*, 1990). Según Morelli (2000), más de la mitad de pesticidas presentan potencialidad carcinogénica. Las aguas negras que contaminan las aguas contienen muchos mutacarcinógenos tales como: hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) formados en cenizas, hollín, tiznes de humos y otros subproductos de la combustión (Yang *et al.*, 2003), nitrosaminas que se encuentran en alimentos ahumados y descompuestos (Grubbs *et al.*, 1983; Mirvish, 1975) y aminas heterocíclicas (AH), que se generan de alimentos quemados como carnes fritas y asadas (Felton *et al.*, 2000). Las AH también se excretan en la orina y heces de personas que comen carnes fritas y asadas (Doolittle *et al.*, 1989; Felton y Knize, 1990; Frandsen, 1997; Gabbani *et al.*, 1998; Ono *et al.*, 1996; Randerath *et al.*, 1999; Sousa *et al.*, 1995; Ushiyama *et al.*, 1991). Y la orina y las heces constituyen el principal contenido de las aguas negras. Se ha demostrado que las AH son mutacarcinogénicas en ratones y ratas (Felton *et al.*, 2002; Sugimura, 1997). Los mutacarcinógenos también llegan a las aguas a través de los residuos industriales de aceites quemados y solventes orgánicos (Alguacil *et al.*, 2002). Por la interacción del cloro con compuestos orgánicos contenidos en el agua se forman muchos subproductos altamente mutagénicos *in vitro* e *in vivo* tales como los trihalometanos (THM), clorofuranos como el MX (3-cloro-4clorodiclorometil)-5-hidroxi-2 (5H)-furanona), bromohidroxifuranona (BrMX) e hidrocarburos clorinados (Badawi *et al.*, 2002; Fielding y Horth, 1986; Kronberg y Franzen, 1993; Le Curieux *et al.*, 1999; Meléndez *et al.*, 2001a, 2001b; Nobukawa y Sanukida, 2001). Diferentes estudios epidemiológicos asocian algunos tipos de cáncer humano al consumo de aguas desinfectadas con cloro (Morris, 1995; Morris y Valentich, 1993). También se encontró que el MX es carcinogénico en roedores (Komulainen *et al.*, 1997).

En la Universidad de Antioquia, encontramos que los afluentes que surten una planta de potabilización de

agua del departamento de Antioquia producen alta mutagenicidad (Duque y Zuleta, 2003). Los mutágenos que contaminan el agua pueden provenir de las aguas negras vertidas al afluente principal de esta planta. Esto lo demostraron Orozco *et al.* (2003) al identificar las siguientes aminas heterocíclicas en dichas aguas negras antes y después de pasar por un tratamiento biológico: 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido{4,3-b}indol (Trp-P1), 3-amino-1-metil-5H-pirido{4,3-b}indol (Trp-P2); 2-amino-9H-pirido{2,3-b}indol (A $\alpha$ C); 2-amino-3-metilimidazo{4,5-f}quinolina (IQ); 2-amino-3,8 dimetilimidazo{4,5-f}quinoxalina (MeIQx). Estas AH son mutacarcinogénicas en ratones y ratas (Sugimura, 1997; Felton *et al.*, 2002). Teniendo en cuenta lo anterior, se espera que el agua que abastece la planta en estudio contenga mutágenos provenientes de la contaminación ambiental que si no son extraídos por el tratamiento del agua, podrán llegar hasta los domicilios. Por efecto de la cloración también se espera que se generen mutágenos directos en el agua potable.

Para comprobar lo anterior en este trabajo se comparó el efecto mutagénico y genotóxico producido por mutágenos contenidos en tres tipos de aguas: 1) el agua que entra a la planta, 2) el agua tratada y clorada en la planta y 3) el agua que llega a los domicilios. Además se detectaron mutágenos presentes en el agua que llega a los domicilios.

La gran importancia de detectar mutágenos en el agua de consumo, es la estrecha relación que existe entre la exposición crónica a pequeñas dosis de mutágenos y la incidencia de cáncer (Pohjola *et al.*, 2003). Debe tenerse en cuenta que la exposición continua a pequeñísimas dosis de mutágenos puede resultar en la acumulación de mutaciones en células blanco hasta convertirlas en iniciadoras del proceso carcinogénico. Por lo tanto, es importante conocer el conducto por medio del cual los mutágenos llegan a los organismos y así poderlos evitar con el fin de disminuir el inicio del proceso de carcinogénesis.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Toma de muestras.** Las muestras de agua se tomaron en tres zonas diferentes: 1) inmediatamente entran a la planta de tratamiento, 2) después de ser tratada y

clorada en la planta y 3) en domicilios urbanos surtidos por dicha planta. Cada muestra se tomó en tres ocasiones diferentes, en los mismos sitios, el mismo día de la semana y en la mañana (10 a. m.-12 m.). El volumen total colectado de cada muestra fue de 100 l, transportado en recipientes de plástico, muy bien lavados. Inmediatamente se tomaron las muestras, se evaluó el pH y temperatura. Con el fin de estabilizar los diferentes tipos de mutágenos, cada muestra se trabajó a pH 7 y a 2 acidificándola con HCl.

**Concentración y extracción del material orgánico del agua.** El material orgánico no volátil contenido en 100 l del agua, se adsorbió en resina estireno divinilbenceno amberlita XAD-2 y XAD-7 (Sigma-Supelco). Antes de usar las resinas XAD, se lavaron por extracción Soxhlet consecutivamente con metanol, acetona y metanol cada 24 horas. Se utilizaron 100 g de cada resina en columnas de vidrio de 6 cm de diámetro por 50 largo. El agua se pasó a una velocidad de flujo de 5 ml/min. La elución se hizo con acetona 5 veces mayor que el volumen ocupado por las resinas. El eluyente se retiró por rotaevaporación a baja presión a 60 °C hasta la sequedad y luego se determinó el peso del extracto, éste se conservó a -20 °C para análisis posteriores. En el momento de iniciar los ensayos mutagénicos el extracto se diluyó en dimetil sulfóxido (DMSO) al 50% pero para los análisis genotóxicos la dilución se hizo en DMSO al 1%.

**Detección de la potencialidad mutagénica por el test de Ames.** Con el fin de detectar si los extractos del material orgánico del agua contenía mutágenos, a cada extracto se le evaluó su efecto mutagénico por medio del test de Ames con *Salmonella typhimurium*. La ocurrencia de mutación revertante se conoce porque la *S. typhimurium* se convierte a his<sup>+</sup>, por lo tanto puede crecer en medio sin histidina. De cada extracto se evaluó la mutagenicidad de cuatro dosis diferentes, con el fin de determinar efecto de dosis. La mayor dosis se seleccionó teniendo en cuenta que no fuera tóxica o sólo llegara a LD<sub>10</sub>. Para los análisis mutagénicos se usaron las cepas TA 98 y TA 100. La cepa TA 98 responde a mutágenos que causan pérdida o ganancia de bases y la cepa TA 100 responde a mutágenos que causan sustitución de bases. Todos los ensayos se hicieron en presencia o ausencia de la

mezcla S-9, la cual contiene las enzimas que activan los promutágenos indirectos. Para procesar el test de Ames, se siguió el protocolo descrito por Maron y Ames (1983). En resumen, la dosis del extracto mezclada con el S9 o tampón y 1 x 10<sup>6</sup> bacterias se preincubó a 37 °C por una hora, luego se sembró en agar mínimo y después de 48 horas se contaron como mutantes reversibles las bacterias his<sup>+</sup> que crecieron en este medio. El mutágeno indirecto 2 amino fluoreno se usó como control positivo y los solventes DMSO 50% y el agua destilada se usaron como controles negativos. Los resultados de cada dosis se presentaron como el promedio de tres experimentos independientes, cada uno por duplicado. Para cuantificar la mutagenicidad se usó el *factor de mutagenicidad* (FM), este factor se refiere a las veces que el número de mutaciones producidas por el tratamiento supera el número de mutaciones del control negativo. Los resultados fueron considerados positivos si el tratamiento duplica el control negativo y la incidencia del aumento de mutaciones en los tratamientos es reproducible en todos los experimentos independientes.

**Detección de genotoxicidad por ensayo cometa.** El daño en el ADN se detectó en linfocitos humanos. Éstos se aislaron de sangre periférica de un hombre de veinticinco años de edad, sano, no fumador. La separación de los linfocitos se hizo de 5 ml de sangre con gradiente de "ficoll-hipaque", las células se re-suspendieron en medio RPMI libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>. Con el fin de determinar efecto de dosis, los linfocitos se trataron con seis dosis no tóxicas de cada extracto. Luego se incubaron a 37 °C. La viabilidad celular se midió con azul tripano antes y después de una hora del tratamiento. El ensayo cometa se procesó según la metodología propuesta por Singh *et al.* (1988) y modificada por Pandrangi *et al.* (1995). Las células tratadas mezcladas con agarosa de bajo punto de fusión (LMA) al 0,5%, se pipetearon sobre portaobjetos previamente impregnados con agarosa de punto de fusión normal (NMA), inmediatamente se cubrieron con cubreobjetos para sumergirlo en solución de lisis fresca por mínimo una hora. Después, los portaobjetos se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal con tampón alcalino (pH >13) (NaOH 10N y EDTA 200 mM) a 4 °C por 20 min para que el pH alcalino desnaturalice el ADN y optimice las

rupturas de los sitios apurínicos (AP) ocasionados por los genotóxicos. Al cumplirse este tiempo, se corre la electroforesis a 25 V, 300 mA por 30 min. Los portaobjetos se lavaron con tampón neutralizante y se tiñeron con bromuro de etidio. Las células se observaron en un microscopio de fluorescencia marca Nikon con un filtro verde de una longitud de onda de 540 nm y con un aumento de 400X. Se hicieron dos ensayos cada uno por duplicado y se analizaron 120 células por cada tratamiento. El daño en el ADN se midió con base en la longitud en  $\mu\text{m}$  de la migración de los fragmentos del ADN (cola) de los cometas (a mayor longitud de cola se supone que hubo más fraccionamiento del ADN). Para medir el daño también se tuvo en cuenta la frecuencia de células dañadas. Los linfocitos cuyas colas fueron mayores a dos veces la longitud promedio del control se clasificaron como células dañadas. El daño del ADN se cuantificó visualmente en cinco categorías según la longitud de la cola (cometa); de 0-36  $\mu\text{m}$  sin daño (0); 37-50  $\mu\text{m}$  daño bajo (1); 51-65  $\mu\text{m}$  daño medio (2); 66-85  $\mu\text{m}$  daño alto (3); más de 86  $\mu\text{m}$  daño total (4).

**Identificación de mutágenos.** Al extracto del agua domiciliaria (120 mg de material orgánico contenidos en 100 l) se le hizo fraccionamiento básico, ácido y neutro utilizando éter. La fracción neutra de pH 7 mutagénica, se diluyó en 1 ml de metanol anhidro, se pasó por filtro miliporo de diámetro 0,22  $\mu\text{m}$  y se inyectaron 2  $\mu\text{l}$  al cromatógrafo de gases acoplado a masas (GC-MS) marca Varian 3800 con detector selectivo de masas Saturn 2000 e inyector automático 82000. El detector de masas analiza el peso molecular de cada compuesto a medida que pierde átomos. Cada compuesto sigue un patrón específico de fraccionamiento. Los mutágenos se identificaron por la igualdad del espectro de masas de un compuesto contenido en el agua domiciliaria con el espectro de un compuesto puro hallado en la base de datos NIST 1998, que contiene 140.000 compuestos. Las condiciones de operación del GC-MS fueron las siguientes: se usó una columna JWDB-5 ms de 25 m x 0,25 mm de diámetro interno, 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de película, con temperatura máxima de 320 °C. Flujo constante de 1 ml/min del Helio como gas portador, temperatura del inyector: 280 °C. La temperatura de la columna: programada a 5 °C/min desde 80 hasta 200 °C; 3 °C/min desde 200 hasta 60 °C y permanece

en esta temperatura por 15 min; asciende hasta 300 °C con la misma tasa de aumento.

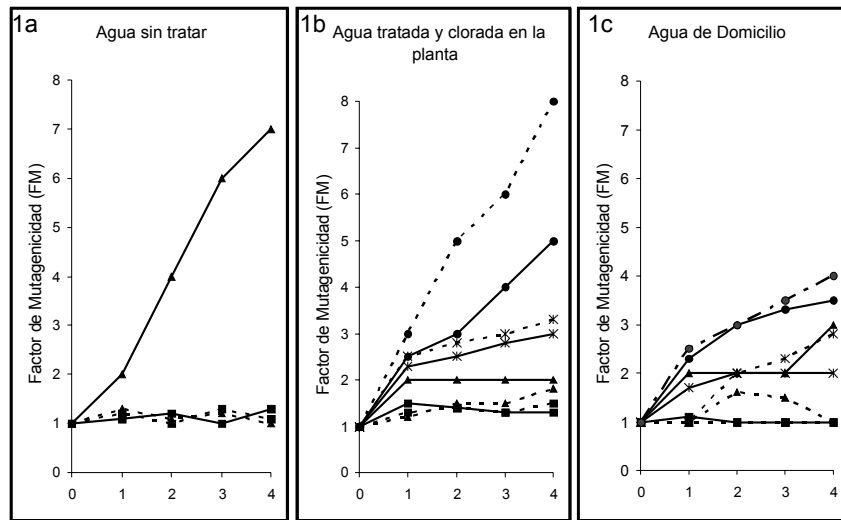
## RESULTADOS

**Mutagenicidad evaluada por el test de Ames.** Se obtuvieron en promedio 120 mg de material orgánico en 100 l de agua tratada en la planta o en la que llega a los domicilios lo que equivale aproximadamente a 300  $\mu\text{g}$  de material orgánico por vaso de agua de 250 ml.

Para determinar efecto de dosis, se buscó mutagenicidad de cuatro dosis no tóxicas: 1, 2, 3 y 4 mg de extracto procedentes de cada muestra de agua. En la figura 1 se observa la mutagenicidad de las aguas analizadas (no se graficó el agua sin tratar a pH 2 por no presentar actividad mutagénica). En el agua que entra a la pH 7, sólo se encontró mutagenicidad indirecta en la cepa TA 98 en presencia de S-9 y se observó claramente efecto de dosis. La máxima mutagenicidad con esta agua produjo un factor de mutagenicidad (FM) de siete, o sea que superó siete veces el control negativo (figura 1A).

La mutagenicidad del agua después del tratamiento y la cloración a pH 7, tomada tanto en la planta como en los domicilios, presentó actividad mutagénica indirecta que, superó dos veces el control negativo. Dicha mutagenicidad sólo se observó en la cepa TA 98 en presencia de la mezcla S9. Estas mismas muestras, pero acidificadas a pH 2 presentaron alta mutagenicidad directa e indirecta en la cepa TA-100, la directa superó ocho veces el control en la planta y cinco veces el control negativo en los domicilios. En cambio, en la cepa TA 98 la mutagenicidad a pH 2 duplicó el control (figuras 1B y 1C).

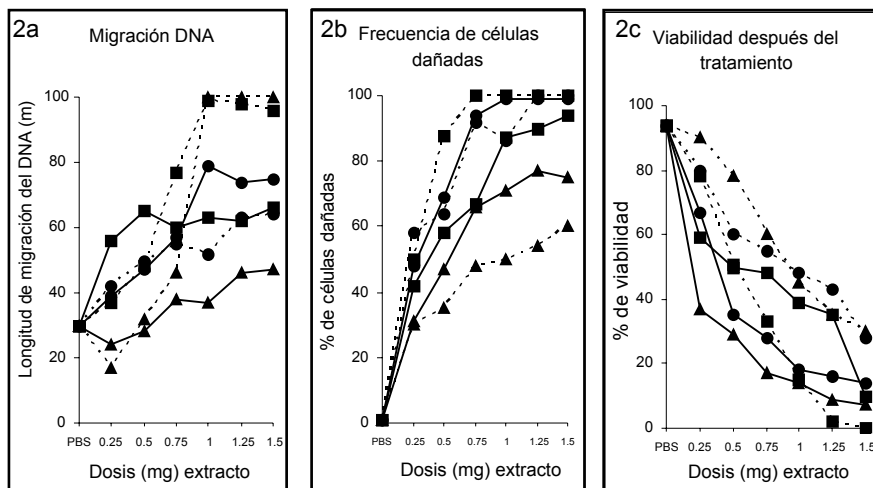
**Daño del ADN evaluado con el ensayo cometa.** La tabla 1 y la figura 2 presentan el efecto genotóxico en linfocitos humanos evaluado con el ensayo cometa. Los linfocitos se expusieron a los extractos de las diferentes aguas, en dosis no tóxicas de 0,25, 0,50, 0,75, 1,00, 1,25 y 1,50 mg. Dichas aguas se procesaron a pH 2 y pH 7. La longitud promedio de la cola del control fue de  $18 \pm 6 \mu\text{m}$ . En general se observó que a partir de la concentración de 0,25 hasta 1,00 mg de extracto de las aguas aumento tanto la migración del



**Figura 1.** Perfil mutagénico de tres aguas diferentes. **1A.** Sin tratar. **2B.** Tratada y clorada en la planta. **1C.** Domicilio. Las estrellas (\*) indican cepa TA 98 con agua a pH 2 y las esferas (●) cepa TA 100 con agua a pH 2. Los triángulos (▲) indican la cepa TA 98 con agua a pH 7 y los cuadros (■) representan la cepa TA 100 con agua a pH 7, las líneas continuas (—) indican con S9 (con activación metabólica), y las discontinuas (- - -) sin S9. El resultado de cada dosis es el promedio de tres experimentos independientes cada uno por duplicado. Las dosis se dan en mg del extracto obtenido de 100 litros de agua

ADN como la frecuencia de células dañadas. Con las dosis mayores se formó una meseta. (figuras 2A y 2B). Las muestras de aguas tratadas en la planta y las que llegan a los domicilios produjeron daño alto de tipo tres y cuatro. Se debe destacar que el agua recién clorada en la planta, procesada a pH 2 presentó daño de tipo cuatro, mayor que el daño producido por el agua que

llega a los domicilios donde no pasó de tipo tres (figura 2A). La viabilidad de los linfocitos evaluada con azul tripano, osciló entre 96 y 99% antes del tratamiento. Después de una hora de los diferentes tratamientos, la viabilidad disminuyó con el aumento de la dosis (figura 2C), en cambio el porcentaje de células dañadas aumento al incrementarse la dosis (figura 2B).



**Figura 2.** Genotoxicidad en el ADN de linfocitos humanos evaluado con el ensayo cometa. Los triángulos (▲) indican el agua sin tratar que entra a la planta. Los cuadros (■) indican agua de la planta después del proceso de cloración. Los círculos (●) indican agua de domicilios. Las líneas discontinuas (-----) indican pH 2. Las líneas continuas (—) indican pH 7. **2A.** Genotoxicidad medida según la longitud en  $\mu\text{m}$  de la migración de fragmentos de ADN (cola). **2B.** Porcentaje (%) de células dañadas. **2C.** Viabilidad

**Tabla 1.** Genotoxicidad en linfocitos humanos, producida por: extracto de agua sin tratar que entra a la planta; extracto de agua después del tratamiento y la cloración; y extracto de agua domiciliaria. La genotoxicidad se evaluó por el ensayo cometa

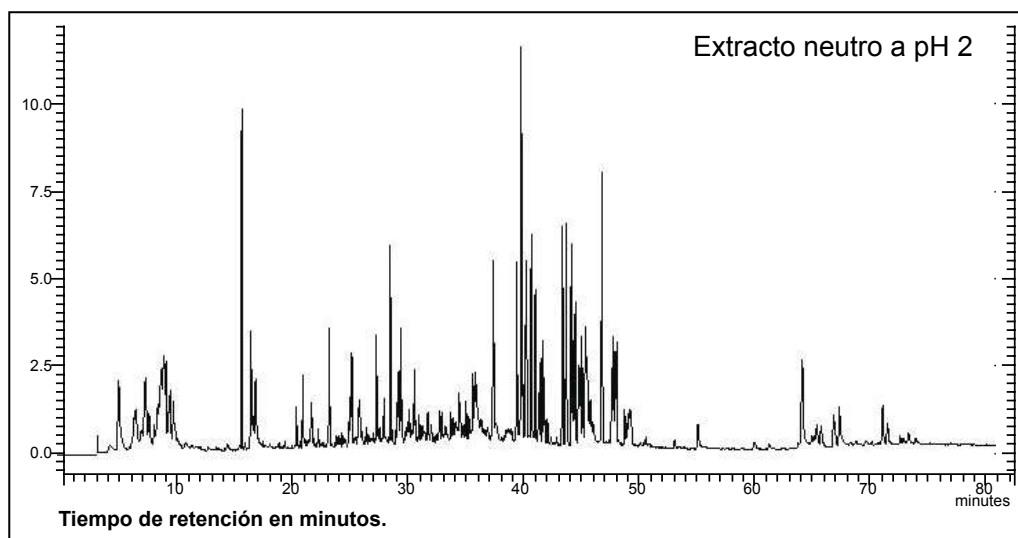
Tratamiento	Dosis en mg	Longitud de cola (µm) X ± DS	% Células dañadas	Tipo daño <sup>a</sup>	% Viabilidad <sup>b</sup>
PBS	50 µl	18 ± 6	1	0	97
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	250 mM	120 ± 5	100	4	0
Extracto de agua sin tratar pH 7	0,25	24 ± 12	31	0	37
	0,50	28 ± 12	47	0	29
	0,75	38 ± 15	66	1	17
	1,00	37 ± 17	71	1	14
	1,25	46 ± 18	77	2	9
	1,50	51 ± 21	75	2	7
Extracto de agua tratada y clorada en planta pH 7	0,25	56 ± 12	42	2	59
	0,50	65 ± 13	58	3	50
	0,75	60 ± 8	67	2	48
	1,00	63 ± 13	87	2	39
	1,25	66 ± 13	90	3	35
	1,50	68 ± 11	94	3	10
Extracto de agua de domicilio pH 7	0,25	39 ± 17	48	1	67
	0,50	47 ± 16	69	2	35
	0,75	57 ± 16	94	2	28
	1,00	79 ± 16	99	3	18
	1,25	74 ± 8	99	3	16
	1,50	75 ± 11	99	3	14
Extracto de agua sin tratar pH 2	0,25	17 ± 4	30	0	90
	0,50	32 ± 5	35	0	78
	0,75	46 ± 6	48	1	60
	1,00	<i>fragmentación total</i>	50	-	45
	1,25	<i>fragmentación total</i>	54	-	35
	1,50	<i>fragmentación total</i>	60	-	30
Extracto de agua tratada y clorada en planta pH 2	0,25	37 ± 18	50	1	78
	0,50	48 ± 14	88	2	51
	0,75	77 ± 19	100	3	33
	1,00	99 ± 19	100	4	15
	1,25	98 ± 19	100	4	2
	1,50	96 ± 14	100	4	0
Extracto de agua de domicilio pH 2	0,25	42 ± 14	58	1	80
	0,50	50 ± 14	64	2	60
	0,75	55 ± 13	92	2	55
	1,00	52 ± 14	86	2	48
	1,25	66 ± 11	100	3	43
	1,50	67 ± 16	100	3	28

El tipo de daño se determinó según la longitud del ADN (cola) en µm así: 0-36 sin daño (0); 36-50 daño bajo (1); 51-65 daño medio (2); 66-85 daño alto (3); más de 85 µm □ después de s□

**Identificación de mutágenos.** En la tabla 2 y figura 3 se observa el perfil cromatográfico de compuestos neutros contenidos en el agua domiciliaria procesada a pH 7, separados según su tiempo de retención en cromatógrafo de gas (CG). Después del análisis de los espectrómetros de diferentes tiempos de retención se encontró presencia de cinco HPA y una hormona en el agua domiciliaria.

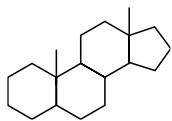
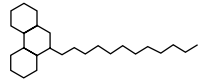
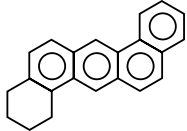
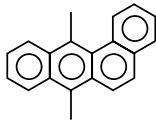
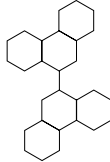
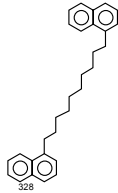
La figura 4A (parte superior), muestra el espectro de masas de la hormona androstane 5 alfa hallada en el pico cromatográfico con tiempo de retención 31,436 min del agua domiciliaria y en la parte inferior está el espectro de masas del compuesto puro registrado en la base de datos. Se observa coincidencia entre los siguientes iones moleculares: uno con m/z igual a 260 correspondiente al peso molecular del compuesto, otro con m/z igual a 245 que se originó por ruptura entre el carbón 5 y 19 con la pérdida de un CH<sub>3</sub>, y finalmente, otro con m/z 135. La probabilidad de coincidencia dada por la base de datos es 96%. En la figura 4B (parte superior), aparece el espectro de masas del fenantreno 9 dodeciltetra dodecahido tomado del pico cromatográfico con tiempo de retención de 36,159 min del agua domiciliaria comparado con el espectro de masas del correspondiente compuesto registrado en la base de datos. Se observa coincidencia entre ocho iones de fragmentación molecular. El primer ión con un m/z igual a 360 correspondiente al peso molecular. Otros son los fragmentos iónicos

con m/z igual a 191, originado por el rompimiento entre el carbono 3 y el 15 que involucra los carbonos del 3 hasta el 13. El ión con m/z igual a 122, el ión con un m/z igual a 110, el ión con un m/z igual a 95 e involucra los carbonos 3-4 y 1-6, otro ión con m/z igual a 81 que se origina por la fragmentación entre el carbono 3-2 y 1-6 e incluyen los carbonos 1-2-11-12-13 y 14. Otro ión con m/z igual a 67 y el octavo ión con m/z de 65. La probabilidad de coincidencia es del 71%. En la figura 4C se compara el espectro de masas del compuesto dibenzo(a,h)antraceno 1,2,3,4 tetrahidro tomado del pico cromatográfico con tiempo de retención de 39 min del agua domiciliaria comparado con el espectro de la referencia encontrada en la librería. Se observa coincidencia en dos iones moleculares principales, el mayor con un m/z de 282 correspondiente al peso molecular y otro de menos abundancia con un m/z de 267 que se podría atribuir al rompimiento del hexaciclo saturado seguido de la pérdida de un grupo CH<sub>3</sub>. La probabilidad de coincidencia es del 65%. En la figura 4D (en la parte superior) aparece el espectro de masas del compuesto benzo(a)antraceno 7, 12 dimetil tomado del pico cromatográfico con tiempo de retención de 45,739 min del agua domiciliaria, comparado con el espectro del compuesto correspondiente hallado en la base de datos. Se observa coincidencia en tres iones. El primer ión con un m/z igual a 256 correspondiente al peso molecular. El segundo ión molecular con un m/z de 241, que se da por la eliminación de un gru-



**Figura 3.** Perfil cromatográfico analizado por CG, de los picos separados según el tiempo de retención en minutos de cada compuesto contenido en la fracción neutra del agua domiciliaria a pH 7

**Tabla 2.** Compuestos presentes en el agua que llega a los domicilios

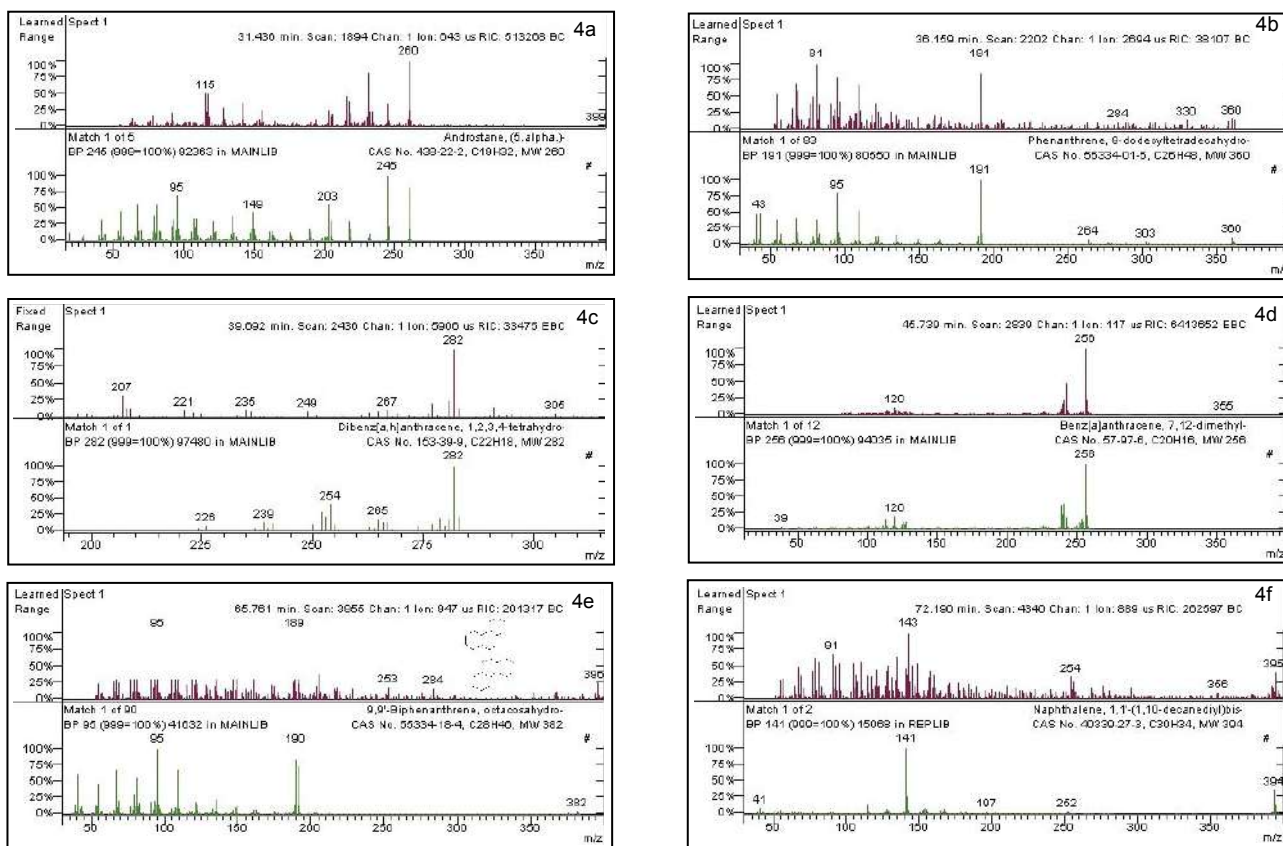
Compuesto identificado	Estructura	% de coincidencia
Androstane 5 alfa		96
Fenantreno 9 dodeciltetra decahidro		71
Dibenzo(a,h)antraceno 1,2,3,4 tetrahidro		65
Benzo(a)antraceno 7, 12 dimetil		60
9, 9' bifenantreno octacosahidro		65
Nafthaleno 1,1'(1,10 decanediil) bis		76

La coincidencia se refiere a la similitud de los 2 espectros, el del compuesto en el agua y el del compuesto puro en la base de datos NIST 1998.

po CH<sub>3</sub> y el tercer ión molecular con un m/z igual a 120. La probabilidad de coincidencia es del 60%. En la figura 4E se compara el espectro de masas del compuesto 9, 9' bifenantreno octacosahidro tomado del pico cromatográfico con tiempo de retención de 65,761 min del agua domiciliaria (parte superior) comparado con el espectro del compuesto correspondiente hallado en la base de datos NIST. Se observan cuatro iones principales coincidentes. El primer ión con un m/z de 382 correspondiente al peso molecular. El segundo ión con un m/z igual a 190 formado por la ruptura entre los carbonos 1 y 15 que incluye los carbonos del 15 al 28. El tercer

ión con m/z igual a 95, se da por el rompimiento entre el carbono 1-6 y 3-4 fragmento formado por los carbonos 4-5-6-11-12-13 y 14. El cuarto ión de fragmentación molecular se da por la ruptura de los carbonos 1-2 y 3-4, agrupa los carbonos 2-3-7-8-9 y 10. La probabilidad de coincidencia es igual al 65%. La figura 4F muestra el espectro de masas del naftaleno 1,1'(1,10 decanodiil) bis tomado del pico cromatográfico con tiempo de retención de 72,190 min del agua domiciliaria comparado con el espectro de masas del compuesto genuino en la base de datos NIST 1998. Se detectan cuatro fragmentaciones coincidentes. Una tiene m/z de 395 correspondiente





**Figura 4.** En cada figura aparece, en la parte superior, el respectivo espectro de masas y en la parte inferior, el espectro de masa registrado en la base de datos NIST 1998. **4A.** Del androstane. **4B.** Del fenantreno. **4C.** Del dibenz(a,h)antraceno. **4D.** Del benzo(a)antraceno. **4E.** Del bifenantreno. **4F.** Del naftaleno. Todos los anteriores presentes en el agua domiciliaria.

al peso molecular. Otro ión tiene  $m/z$  igual a 141 y se origina por la ruptura entre el carbono 19 y 20. La probabilidad de coincidencia es del 76%.

## DISCUSIÓN

El agua a pH 7 que llega a la planta de tratamiento produjo alta mutagenicidad en la cepa TA 98 sólo en presencia de activación metabólica. Esto indica que los mutágenos que entran a la planta son principalmente de carácter indirecto y producen pérdida o ganancia de nucleótidos, que es el proceso molecular necesario para ocasionar mutación reversible en esta cepa. Entre los mutágenos que tienen estas propiedades están las aminas heterocíclicas (AH) y los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) los cuales podrían llegar a la planta por contaminación con aguas negras ricas en ellos o por contaminación con aceites quemados y otros residuos industriales ricas en HPA (Felton y Knize, 1990; Frandsen, 1997;

Gabbani *et al.*, 1998; Ono *et al.*, 1996; Randerath *et al.*, 1999; Sousa *et al.*, 1995; Ushiyama *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 2003).

El agua a pH 7 después de tratada y clorada en la planta y en los domicilios, presentó mutagenicidad débil (dos y media veces la mutagenicidad del control negativo), en la cepa TA 98 con activación metabólica, lo que indica que esta agua contiene mutágenos indirectos similares a los mutágenos contenidos en el agua sin tratar que surten la planta. La única diferencia de la mutagenicidad del agua antes de tratar con relación a la tratada procesada a pH 7, es la disminución en la mutagenicidad, que pasó de siete veces el control antes de tratar a solo duplicar el control después de tratada. Esto indica que el tratamiento (coagulación, floculación, sedimentación y filtración) deja pasar más o menos el 35% de los mutágenos que entran a la planta y éstos alcanzan a llegar a los domicilios. En cambio, el agua tratada y

clorada tomada en la planta y en domicilios, procesada a pH 2, presentó alta mutagenicidad directa en la cepa TA 100. La muestra de la planta superó ocho veces el control y la de domicilio la superó cinco veces. El aumento de la mutagenicidad directa en la cepa TA 100 después de la cloración puede deberse a la formación de nuevos mutágenos de acción directa que se generan por la reacción del cloro con el material orgánico (Nobukawa y Sanukida, 2001). La disminución de actividad mutagénica directa en el agua de los domicilios puede deberse a la volatilidad e inestabilidad de estos compuestos.

Los extractos de aguas a pH 2 y pH 7 tomados en la planta y en los domicilios produjeron daño alto en el ADN de linfocitos humanos, por lo tanto, los mutágenos contenidos en estas aguas pueden implicar un factor de riesgo para la salud de la población expuesta a ella.

De acuerdo con el análisis cromatográfico por GC/MS del extracto neutro de agua domiciliaria, éstas deben contener cinco hidrocarburos policíclicos aromáticos: naftaleno 1,1' (1,10 decanodil) bis, fenantreno 9,10,12,12a-tetrahidro, benzo(a)antraceno 7,12 dimetil, dibenzo(a,h)antraceno 1,2,3,4 tetrahidro, 9,9' bifenantreno octacosahidro y la hormona androstane 5 alfa. Estos HPA se producen por la combustión incompleta de materiales orgánicos y pudieron llegar a las aguas domiciliarias debido a la contaminación de la planta de tratamiento con residuos industriales de aceites quemados y solventes orgánicos y por aguas negras (IARC, 2003; Wesp et al., 2000). Se ha encontrado que el benzo(a)antraceno es mutagénico e induce papilomas en piel, hepatomas y sarcomas en pulmón de ratones. El dibenzo(a,h)antraceno induce carcinomas en la pared estomacal y pulmón de ratones y ratas, además carcinoma de mama en hembras (IACR, 2003; Spitzer y Takeuchi, 1995). En cuanto al naftaleno, se sabe que provoca incremento de neuroblastomas y adenomas en pulmones y epitelios de ratón,

sin embargo, ni este compuesto, ni el fenantreno se han catalogado como carcinógenos en humanos (EPA, 2003). La hormona esteroide androstane 5 alfa hallada en aguas domiciliarias se podría considerar promotora del proceso carcinogénico, ya que estimula la división celular (Voet y Voet, 1995).

Para poder analizar el verdadero riesgo que implica la contaminación del agua de consumo con mutacarcinógenos, es necesario realizar otras investigaciones relacionadas con la cuantificación, interacciones sinérgicas o antagónicas de estos mutágenos y la acumulación de mutaciones en organismos que reciban diariamente pequeñas dosis de tales mutágenos.

En resumen, nuestros resultados demuestran que mutágenos ambientales contaminan las aguas que surten plantas de tratamiento, que el proceso tradicional de potabilización del agua para consumo humano no es totalmente eficiente para removerlos. Además, que por adición del cloro, aumenta la actividad mutagénica directa en la cepa TA 100, lo que corresponde a la formación de subproductos clorados mutagénicos. Los mutágenos contenidos en el agua de consumo tratada en la planta estudiada, logran penetrar a células humanas y causar daño en su ADN, por lo tanto podrían constituir un riesgo para la salud humana. Para impedir que las aguas para el consumo humano contengan mutágenos, se recomienda evitar la contaminación de los afluentes que surten las plantas de purificación y eliminar, ojalá totalmente, el material orgánico del agua potable.

## AGRADECIMIENTOS

Al CODI de la Universidad de Antioquia por financiar el proyecto y al director de la planta estudiada, por permitirnos tomar las muestras de agua y ayudar a la financiación del proyecto. Se agradece a la Escuela de Bacteriología por facilitarnos el microscopio de fluorescencia.

## REFERENCIAS

Alguacil J, Porta M, Malats N, Kauppinen T, Kogevinas M, Benavides F, Partanen T, Carrato A. 2002. Occupational exposure to organic solvents and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 23:10-106.

Ames BN. 1989. Mutagenesis and carcinogenesis: endogenous and exogenous factors. *Env Mol Mutagen* 14:66-77.

Badawi AE, Cavalieria EL, Rogan E. 2002. Effect of chlorinated hydrocarbons on expression of cytochrome P450 1A1, 1A2 and 1B1 and hydroxylation of 17 $\beta$ -estradiol in female Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis* 21:8-15.

- Bishop JM, Weinberg RA.** 1996. *Molecular Oncology*. Ed. Scientific American, New York.
- Blair A, Zahm Y.** 1995. Agricultural exposures and cancer. *Env Health Perspect* 103(suppl 8):205-208.
- Brown LM, Blair A, Gibson R, Everet KP, Cantor LM, Schuman LF, Buemeister SF, Van Lier FD.** 1990. Pesticide exposures and other agricultural risk factors for leukaemia among men in Iowa and Minnesota. *Cancer Res* 50:6585-6591.
- Doolittle D, Rahn C, Burger G, Lee C, Reed B, Riccio E, Howard G, Passanati G, Vesell E, Hayes A.** 1989. Effect of cooking methods on the mutagenicity of food and on urinary mutagenicity of human consumers. *Food Chem Toxic* 27(10):657-666.
- Duque A, Zuleta M.** 2003. Comparison of mutagenicity of different zones of a dam which is the main source for water purification plant. *Env Mol Mutagen* 41:17.
- EPA (Environmental Protection Agency, USA).** 2003. <www.epa.state.on.us>.
- Felton J S, Knize MG.** 1990. Heterocyclic amines mutagens/carcinogens in foods. En: Cooper GS, Grover PL (eds.). *Chemical carcinogenesis and mutagenesis I. Handbook of experimental pharmacology*. Berlin, Springer-Verlag, vol. 94/L, pp. 471-502.
- Felton JS, Jagerstad M, Knize M, Skog K, Wakabayashi K.** 2000. Contents in foods, beverages and tobacco. En: Nagao M, Sugimura T (eds.). *Food Borne Carcinogens*. pp. 31-71.
- Felton JS, Knize MG, Salmon CP, Malfatti M, Kulp KS.** 2002. Human exposure to heterocyclic amines food mutagens/carcinogen. Relevance to breast cancer. *Env Mol Mutagen* 39:112-118.
- Fielding M, Horth H.** 1986. Formation of mutagens and chemicals during water treatment chlorination. *Water Supply* 4:103-126.
- Frandsen H.** 1997. Excretion of DNA adducts of 2-amino-1-methyl-6-phenylamido[4,5-b] pyridine and 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo [4,5-f]quinoxaline PhIP-dG, PhIP-DNA and DiMeIQx-DNA from rat. *Carcinogenesis* 18(8):1555-1560.
- Gabbani G, Nardini B, Bordin A, Pavanello S, Janni L, Celotti L, Clonfero E.** 1998. Urinary mutagenicity on TA 98 and YG1024 *Salmonella typhimurium* strains a hamburger meal: Influence of GSTM1 and NAT2 genotypes. *Mutagenesis* 13(2):187-191.
- Grubbs C, Hill LD, McDonough KC, Peckham H.** 1983. N-Nitroso-N-Methylurea-induced mammary carcinogenesis: Effect of pregnancy on preneoplastic cells. *J Natl Cancer Inst* 71(3):625-627.
- IARC (International Agency for Research on Cancer).** 2003. Some anti-thyroid and related substance nitrofurans and industrial chemicals. *Monographs on the evaluation of carcinogenic Risk of Chemicals to Man*. Lyon, France, vol. 71, pp. 487-501.
- Komulainen H, Kosma VM, Vaittinen SL, Vartiainen T, Kaliste-Korhonen E, Lotjonen S, Tuominen RK, Tuomisto J.** 1997. Carcinogenicity of the drinking water mutagen (3-Chloro-4-diclorometil)-5-hidroxy-2-(5H)-furanone) in rat. *J Natl Cancer Inst* 89(12):848-856.
- Kronberg L, Franzen R.** 1993. Determination of chlorinated furanones, hydroxyfuranones and butenedibleaching liquor. *Env Sci Technol* 27:1811-1818.
- Le Curieux F, Nesslany F, Munter T, Kronberg L, Marzin D.** 1999. Genotoxic activity of chlorohydroxyfuranones in the microscale micronucleus test on mouse lymphoma cells and the unscheduled DNA synthesis assay in rat hepatocytes. *Mutagenesis* 14 (5):457-462.
- Maron DM, Ames BN.** 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mut Res* 113:173-215.
- Meléndez I, Zuleta M, López C, Ramírez A.** 2001a. Identificación del potente mutacarcinógeno 3-cloro-4 (diclorometil) 5-hidroxy 2 (5H) furarona formado en aguas tratadas y cloradas en la planta Villa Hermosa y daño en el ADN de linfocitos humanos producido por esta agua. *Bol Epidemiol Antioquia*. 26(1).
- Meléndez I, Zuleta M, Marín I, Calle J, Salazar D.** 2001b. Actividad mutagénica de aguas de consumo humano antes y después de clorar en la planta Villa Hermosa, *Iatrea* 141(3):167-175.
- Mirvish S.** 1975. Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics and in vivo occurrence. *Toxicol Appl Pharmacol* 31:325-51.
- Morelli MA.** 2000. Industry viewpoint on thresholds genotoxic carcinogenic. *Toxicol Pathol* 28(3):396-404.
- Morris BI, Valentich MA.** 1993. Promoting of mancozeb on pancreas of nitrosomethyl urea treated rats. *Carcinogenesis* 14(5):929-933.
- Morris R.D.** 1995. Drinking water and cancer. *Env Health Perspect* 103 (suppl 8):225-231.
- Nobukawa T, Sanukida S.** 2001. Effect of bromide ions on genotoxicity of halogenated by-products from chlorination of humic acid in water. *Wat Res* 35(18):4293-4298.
- Ono Y, Somiya Y, Kawaguchi T.** 1996. Genotoxicity of substances in or ozonated drinking water extracts: comparison to MX. *Wat Res* 30(3):569-577.
- Orozco LY, López C, Naranjo LC, Zuleta M.** 2003. DNA damage and identification of mutagenic heterocyclic amines in municipal wastewater which contaminate water purification plants. *Env Mol Mutagen* 41:196.
- Pohjola S, Lappi M, Honkanen M, Rantanen L, Savela K.** 2003. DNA binding of polycyclic aromatic hydrocarbons in a human bronchial epithelial cell line treated with diesel and gasoline particulate extracts and benzo[a]pyrene. *Mutagenesis* 18(5):429.
- Pandurangi R, Petras M, Ralph S, Vrzoc M.** 1995. Alkaline single cell gel (comet assay) and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Env Mol Mutagen* 26:345-356.
- Randerath H, Randerath E, Zhou GD, Supunpong N, He LY, McDonald TJ, Donnelly KC.** 1999. Genotoxicity of complex PAH mixtures recovered from contaminated lakes sediments as assessed by three different methods. *Env Mol Mutagen* 33:303-312.
- Rehana Z, Malik A, Ahmad M.** 1995. Mutagenic activity of the Ganges water with special reference to the pesticide pollution in the river between Kachla to Kannauj (U.P), India. *Mut Res* 343:137-144.
- Sierra-Torres CH, Salazar NC, Hoyos LS, Zuleta M, Whorton EB, Au WW.** 1998. In vitro and vivo genotoxic activity of miral, an organophosphorus insecticide used in Colombia. *Mut Res* 415:59-67.
- Singh NP, McCoy M, Tice R, Edward E.** 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191.
- Sousa J, Snyderwine E, Turesky R, Turteltaub W, Davis C, Sadieh N, Schut H, Nagao M, Nath J, Tucker JD, Ong TM.** 1995. Dietary factors affecting the urinary mutagenicity assay system. I. Detection of mutagenic activity in human urine following a fried beef. *Mut Res* 149:356-374.
- Spitzer T, Takeuchi T.** 1995. Determination of benzathrone in environmental samples. *J Chromatography A*. 710:109-116.
- Sugimura T.** 1997. Overview of carcinogenic heterocyclic amines. *Mut Res* 37:21-219.
- Testard LS.** 2000. Assesment of DNA induced by high-LET ions in human lymphocytes using the comet assay. *Mut Res* 448:105-115.

- Ushiyama H, Wakabayashi K, Hirose M, Nukaya H, Itoh H, Sugimura T, Nagao M.** 1991. Presence of carcinogenic heterocyclic amines in urine of healthy volunteers eating normal diet, but no impatients receiving parental alimentation. *Carcinogenesis* 12:1417-1422.
- Voet D, Voet J.** 1995. *Biochemistry*. Ed. John Wiley & Sons, Inc. U.S.A.
- Wesp HF, Tang X, Ederharder H.** 2000. The influence of automobile exhausts on mutagenicity of soils: contamination with fractionation, separation, and preliminary identification of mutagens in the *Salmonella*/reversion assay and effect fractions on the sister-chromatid exchanges in human lymphocytes cultures and in the vivo mouse bone marrow micronucleus assay. *Mut Res* 472:1-21.
- Yang M, Kim S, Lee E, Cheong H, Chang S, Kang D, Choi Y, Lee S, Jang J.** 2003. Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon exposure in Non-occupationally exposed Koreans. *Env Mol Mutagen* 42:250-257.
- Zuleta M, Salazar J, Adelaida G.** 1990. Mutagenicidad de cinco herbicidas en *Salmonella typhimurium*. *Rev Latinoam Genet* pp. 321-328.