

Ausencia de genotoxicidad del agua de mar de Coveñas: estudio *in vitro* en eritrocitos y leucocitos humanos

Wilmer Soler T.¹ • Nelly del Carmen Velásquez E.²
Luis Francisco Miranda R.³ • Diana Cristina Zuluaga G.³

Resumen

En Colombia y América latina se ha iniciado recientemente el uso nutricional y terapéutico del agua de mar natural, por su contenido de minerales y oligoelementos, práctica ya reconocida en Europa desde hace más de un siglo. *Objetivo:* evaluar la posible toxicidad del agua de mar de Coveñas (costa atlántica colombiana). *Materiales y métodos:* se incubaron células humanas en agua de mar recogida en Coveñas para determinar fragilidad osmótica de eritrocitos, viabilidad celular y daño en el ADN de linfocitos (ensayo cometa); además, se determinó su capacidad antioxidante. *Resultados:* los eritrocitos en agua de mar presentaron hemólisis significativamente mayor respecto a la observada en amortiguador PBS hipertónico de concentración similar (4,3 y 2,8% respectivamente, $P = 0,00001$); sin embargo, la diferencia de los promedios fue muy pequeña. La viabilidad celu-

lar de los linfocitos en agua de mar fue de 95%, similar a la observada en PBS isotónico. Dicha agua de mar tampoco produjo daño en el ADN de linfocitos humanos, según los resultados de los promedios del momento de Olive del ensayo cometa. Tampoco presentó actividad antioxidante ni prooxidante. *Conclusiones:* según estos ensayos, el agua de mar obtenida en Coveñas presentó bioseguridad para el consumo humano; sin embargo, se deberá evaluar en el futuro la toxicidad de su componente orgánico concentrado y la genotoxicidad en personas que la consuman.

Palabras clave

Agua de mar, actividad antioxidante, genotoxicidad, ensayo cometa

Absence of genotoxicity of sea water from Coveñas: *in vitro* study on human leukocytes and erythrocytes

Summary

In Latin America, Colombia included, the use of natural sea water has been recently introduced for nutritional and therapeutics purposes due to its high content of minerals and oligoelements. This practice has also been used in Europe during the last century. *Objective:* to evaluate potential toxicity in sea water from Coveñas (Colombian Atlantic coast). *Methods:* erythrocytes and leukocytes were incubated in sea water samples collected in Coveñas to evaluate osmotic fragility, viability, and DNA damage (by comet technique). Atioxidant properties of this water were additionally studied. *Results:* erythrocytes presented a higher index of hemolysis in sea water compared with phosphate buffer (PBS) with a similar hypertonic concentration (4,3% y 2,8% respectively, $P=0,00001$); however, median differences were very low. Lymphocytes viability

in sea water was 95% after one hour of incubation at 4°C and it was similar to the percentage observed in isotonic PBS. Sea water did not cause damage on DNA as tested one hour after treatment of lymphocytes according to the "Olive moment" averages. Sea water did not present any pro-oxidant or antioxidant capacity as tested with the ABTS⁺ technique. *Conclusions:* these results suggest that sea water from this area in the Colombian Atlantic cast is bio-safe for human consumption but it is necessary to test concentrated organic fraction and determine *in vivo* toxic effects.

Key words

Sea water, antioxidant activity, genotoxicity, comet assay

1 Químico, máster en bioquímica, profesor de la Universidad de Antioquia. Cibercorreo: wsoler@quimbaya.udea.edu.co

2 Bióloga de la Universidad de Antioquia

3 Estudiantes de medicina de la Universidad de Antioquia

Recibido: 7 de abril de 2005 Aceptado: 31 de octubre de 2005

Introducción

El uso nutricional y terapéutico del agua de mar en humanos y animales por vía subcutánea, intramuscular e intravenosa se inició en Francia al final del siglo XIX, a partir de las investigaciones del fisiólogo René Quinton, quien la utilizó en cultivo de linfocitos como sustituto de sangre en perros y luego por vía subcutánea en humanos para tratar la desnutrición y una amplia variedad de problemas clínicos.¹ Su uso se ha fundamentado en el contenido de toda clase de minerales y oligoelementos esenciales para la vida celular, en proporciones comparables a la del plasma sanguíneo, presentes en forma de sales, fijados orgánicamente en microorganismos y elementos prebióticos que aumentan su bio-disponibilidad para el transporte intestinal.²⁻⁴ También se ha descrito la capacidad de las bacterias marinas de sintetizar compuestos orgánicos con actividad antibiótica, antitumoral, antiinflamatoria, antiviral, etc.⁵ Estas propiedades han apoyado la hipótesis más aceptada científicamente sobre el origen de la vida en el mar y la conservación de las condiciones de este origen, en el medio interno de los organismos más evolucionados, según la tesis de Quinton.² Recientemente, el uso oral, nasal y tópico ha sido tema de investigación en algunos países desarrollados,⁶⁻¹¹ lo que ha sido paralelo con el tratamiento y comercialización con costos muy elevados e inalcanzables para la población general en países pobres.¹²

En Colombia y América Latina, donde se conoce muy poco sobre el tema, se ha iniciado desde hace unos cinco años la ingesta de agua de mar sin tratar, con beneficios para la salud que se han registrado en informes médicos. El agua se está obteniendo a unos cinco Km de la playa y 10 m de profundidad y, en lugares más limpios, se obtiene de manera artesanal en recipientes plásticos y a pocos metros de las playas. Dados los problemas de contaminación doméstica por falta de tratamiento de las aguas servidas y los residuos orgánicos de la agroindustria que llegan al mar, en lugares que además son turísticos y que a veces carecen de alcantarillados es importante iniciar investigaciones sobre los posibles efectos tóxicos del agua de mar para la célula, de tal manera que se estimule esta práctica o se le introduzcan correcciones.

El ensayo cometa, una prueba muy sensible para medir daño del ADN, se ha utilizado para evaluar la calidad de aguas para consumo humano, toxicidad de productos naturales y estudios de biomonitorio.¹³ En este estudio se evaluó la viabilidad y el daño en el ADN de linfocitos humanos y se determinó la fragilidad osmótica de eritrocitos expuestos a agua de mar obtenida de Coveñas (departamento de Sucre), a 5 Km de la playa y 15 m de profundidad.

Metodología

Recolección de las muestras de agua de mar

Se utilizaron parte de las muestras de agua de mar tomadas para el trabajo de grado en biología "Evaluación de la actividad antibacteriana del agua de mar".¹⁴ Se recolectaron cinco

muestras de agua de mar, cada una en día diferente, con un cilindro de aluminio, en una estación de muestreo ubicada en el golfo de Morrosquillo, costa atlántica colombiana, a cinco kilómetros de la línea costera y a 15 m de profundidad. Las muestras se transportaron en nevera portátil de material termoaislante (poliestireno) a unos 4 °C. Se midió la salinidad de cada muestra en un conductímetro Schott LF 513 T y luego se filtró en una membrana de 0,22 µm.

Control microbiológico para el agua de mar

Se realizó el control microbiológico del agua de mar fresca (menos de 24 horas de la recolección) filtrada y sin filtrar por coloración de Gram y en medio de cultivo BHI, Agar Mac Conkey II y Agar sangre, según la metodología utilizada en el trabajo de grado.¹⁴ Ninguna de las muestras de agua de mar analizadas indicó la presencia de bacterias terrestres.

Prueba de genotoxicidad

Para determinar el efecto genotóxico del agua de mar en el ADN de linfocitos humanos, se utilizó la técnica SCGE (*single cell gel electrophoresis*) o ensayo cometa, según el protocolo descrito por Singh N. et al.¹⁵ Se incubaron en agua de mar a 0,9, 1,6 y 2,3% entre 5.000 y 50.000 linfocitos humanos aislados de sangre total por el método de centrifugación en un gradiente de densidad de Ficoll.¹⁶ Se utilizó como control positivo el peróxido de hidrógeno (100 µM) y amortiguador fosfato salino (PBS) como control negativo. El tratamiento se realizó durante una hora a 4 °C, para evitar la reparación del ADN, después del cual, 10 µl de suspensión celular se mezclaron con 75 µl de agarosa de bajo punto de fusión (LMA) a 37 °C; la mezcla se colocó en un portaobjetos que había sido previamente recubierto con una capa de agarosa de punto de fusión normal. La suspensión celular fue cubierta con un cubreobjetos y mantenida a 4 °C durante seis minutos. Luego se retiró el cubreobjetos y las láminas fueron sumergidas en una solución de lisis (NaCl 2,5M, Na₂EDTA 100µM, TRIS 10µM, triton X-100 1% y DMSO 10%) a 4 °C durante una hora; luego se llevaron las láminas a una solución de electroforesis alcalina para permitir desenrollamiento del ADN y expresión de sitios lábiles a álcalis (Na₂EDTA 1 µM, NaOH 300µM, pH 13) a 4 °C y por 30 minutos. Luego se realizó la electroforesis durante 30 minutos a 25 voltios y 300 µA. Al término de la electroforesis, las láminas fueron lavadas con amortiguador neutralizante (TRIS 0,4M, pH 7,5) por 15 minutos y deshidratadas con metanol absoluto.

Las láminas fueron teñidas con 30 µl de bromuro de etidio 2 µg/ml y examinadas en un microscopio de fluorescencia equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro barrera de 590 nm, usando una magnificación de 250X. Para cada concentración fueron analizadas 50 células por triplicado, con un programa computarizado de análisis de imágenes que permite recolectar datos como longitud de la cola, mo-

mento de Olive, relación entre la distancia desde el centro de gravedad de la cabeza (CGH) al centro de gravedad de la cola (CGT) y el porcentaje de ADN en la cola %ADNT.¹⁷

$$MO = \frac{CGT - CGH}{\%ADNT}$$

Para el análisis estadístico se realizó el análisis de varianzas de bloques completos al azar, en el que cada bloque es un experimento con agua de mar de salinidades de 0,9, 1,6 y 2,3% y los controles positivo (PBS con H₂O₂) y negativo (PBS isotónico). Se utilizó el paquete estadístico Statgraphic.

Prueba de viabilidad

Para investigar si los efectos en el ADN están acompañados por efectos citotóxicos, la viabilidad de los linfocitos se determinó por exclusión con azul tripano (0,2%) antes y después del tratamiento.

Fragilidad osmótica de los eritrocitos en agua de mar.

Se siguió el protocolo descrito por Rosemary *et al.*¹⁸ La sangre heparinizada se centrifugó a 700 g durante 10 minutos, se descartó el plasma y los eritrocitos se lavaron tres veces con seis volúmenes de PBS. Se resuspendieron los eritrocitos en diez volúmenes de PBS. Se tomaron 100 µl de la suspensión de eritrocitos en 3 ml de agua de mar (diferentes muestras cuyas salinidades estuvieron entre 2,6 y 3,0%), o con PBS a una concentración de NaCl de 3,0% y se incubaron por 2 horas a 37 °C; luego se centrifugaron a 1.500g por 3 minutos y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 543 nm. Cada muestra de agua de mar y control de PBS de 3,0% se midieron por triplicado. Se realizó análisis de varianzas de bloques al azar, utilizando el paquete estadístico Statgraphic.

Actividad antioxidante total. Se siguió el procedimiento descrito por Re *et al.*¹⁹ La sal ABTS (2,2-azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)) a una concentración de 7 mM se incubó con persulfato de potasio 2,45 mM (concentración final) toda la noche en oscuridad y temperatura ambiente, para producir el catión radical libre ABTS⁺. La solución de ABTS⁺ se diluyó en PBS, pH 7,4 hasta lograr una absorbancia de 0,70 (+/- 0,02) a 734 nm y equilibrada a 30° C. A 1,0 ml de esta dilución se le adicionó 10 µl de agua de mar, trolox (10 µM), suero o PBS para el blanco. Después de mezclar se leyó la absorbancia a los minutos 1, 4 y 6 a 734 nm, en un equipo Beckman DU 6. Fuera del equipo, la muestra se mantuvo en la cubeta de lectura en baño a 30 °C. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado y se calculó la actividad antioxidante como porcentaje de disminución de la absorbancia respecto al blanco, debido a la reducción (decoloración) del radical ABTS⁺.

Resultados

La fragilidad osmótica de los eritrocitos (FOE) (figura 1) incubados en 5 muestras de agua de mar filtrada, con una

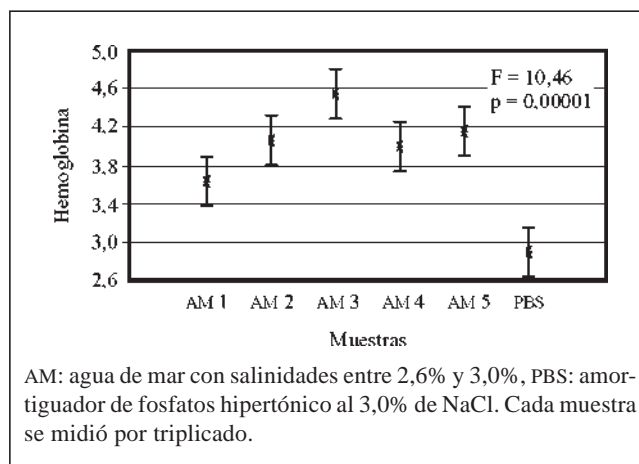


Figura 1. Promedios de la fragilidad osmótica de los eritrocitos incubados en cinco muestras de agua de mar y del control en PBS

promedio de 4,3% y poca variabilidad, fue significativamente mayor a la observada con PBS hipertónico de concentración similar (3,0% de NaCl), con un promedio de 2,8% ($P = 0,00001$). Sin embargo, debe notarse que la diferencia de FOE entre las muestras de agua de mar y PBS hipertónico fue sólo de 1,5%. Los resultados con agua de mar sin filtrar fueron similares a los de la filtrada, e igual ocurrió cuando se evaluaron muestras frescas de menos de 24 horas de recogida y muestras viejas de cinco meses de recogidas y almacenada a temperatura ambiente (resultados no mostrados).

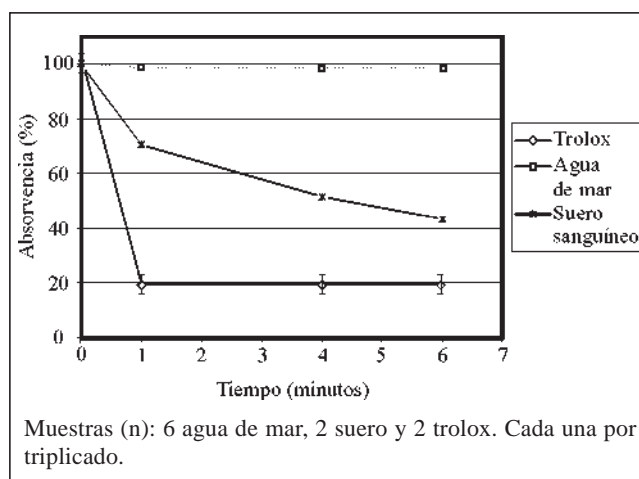


Figura 2. Actividad antioxidante total del agua de mar, medida como disminución de absorbancia por reducción del radical ABTS⁺

Como se observa en la figura 2, el agua de mar no presentó actividad antioxidante, en contraste con la actividad que se obtuvo con el trolox y el suero sanguíneo. No obstante, es de destacar que tampoco hubo actividad prooxidante. Los ensayos para detectar diferencias entre muestras frescas y viejas, filtradas y sin filtrar, no indicaron diferencias (datos no mostrados).

El estudio de citotoxicidad, evaluada por la viabilidad celular de los linfocitos humanos, incubados por una hora en agua de mar filtrada a salinidades de 0,9, 1,5 y 2,2%, fue en promedio de 95% y similar a la observada con PBS isotónico. Los ensayos de genotoxicidad en estas mismas células, incubadas a las mismas salinidades de agua de mar, no indicaron daño en el ADN, como se puede observar en las fotografías de la figura 3 y en los valores promedio de momento de Olive (MO) (figura 4). Para estos dos tipos de ensayos de toxicidad se analizaron 150 células para cada una de las tres diluciones de agua de mar y por cinco muestras tomadas en días diferentes, con un total de 2.250 células evaluadas. No hubo diferencias estadísticamente significativas en el MO, entre los ensayos realizados con las cinco muestras de agua de mar.

Discusión

La ausencia de toxicidad del agua de mar evaluada en la presente investigación, por las pruebas que miden daño de membrana (FOE y viabilidad celular) y del ADN (ensayo cometa), se corresponden con el resultado obtenido en esta misma investigación, de ausencia de actividad prooxidante o generadora de radicales libres, que no cambió al evaluar agua de mar almacenada hasta por cinco meses a temperatura ambiente. El área de Coveñas, ubicada en el departamento de Sucre, es un sector turístico que no tiene alcantarillado y las aguas servidas llegan al mar sin ningún tratamiento; además, desembocan en este lugar caños que recogen contaminantes químicos de la agroindustria, que se suman a las fugas de petróleo que pueden presentarse por la presencia del puerto petrolero.²⁰ Los efectos de esta contaminación orgánica dependen principalmente de la cantidad de contaminantes introducidos, pero que son modificados por factores tales como la configuración del fondo, las mareas y las corrientes, que influyen sobre la difusión de los contaminantes y, en especial, por el catabolismo que realizan los microorganismos marinos sobre este componente orgánico.²¹ La ausencia de bacterias terrestres, como las coliformes, en las muestras de agua de mar de este estudio, indicó el papel controlador realizado por los microorganismos marinos,⁵ además del efecto hipertónico del agua de mar sobre bacterias que no están adaptadas a este medio.

Por otra parte, es importante el hallazgo de que el agua de mar fresca o almacenada a temperatura ambiente no presentó actividad prooxidante; algo posible, dada la presencia de una amplio número de sales, minerales y elementos traza, los cuales, según la concentración y el estado oxidativo, pueden inducir alteraciones de membrana y del ADN, tal como se ha observado en soluciones o medio que contienen Fe^{+2} y Cu^{+} (reacción de Fenton)²² o por la presencia de compuestos como el Cr(VI) y Cr(V), que presentan una potente actividad carcinogénica y que al utilizarse en medios de cultivos de linfocitos decrecen la viabilidad celular.²³ Con respecto a la capacidad oxidativa del agua de mar, se conoce que es una

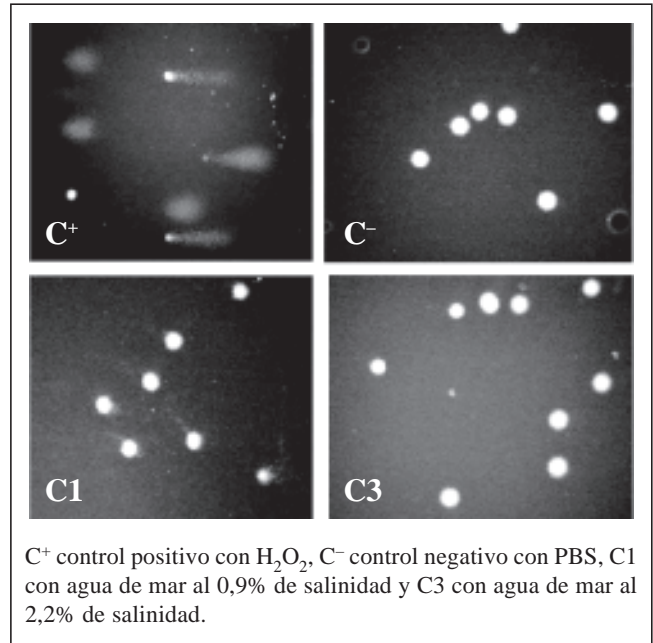


Figura 3. ADN de leucocitos humanos incubados por una hora en agua de mar (ensayo “cometa”)

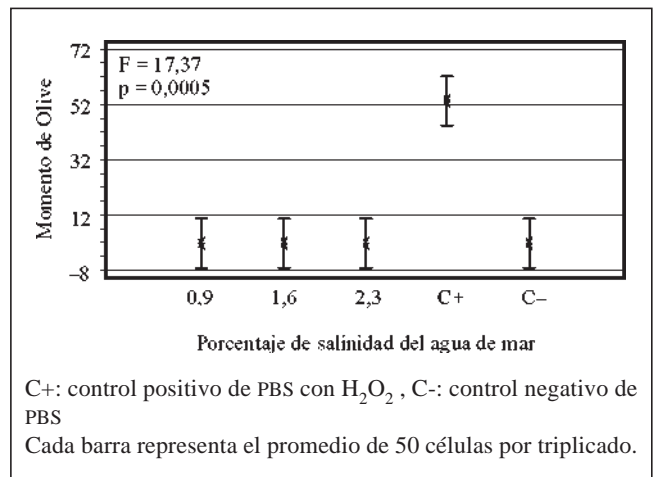


Figura 4. Promedios del momento de Olive del ADN (ensayo “cometa”) de leucocitos incubados en agua de mar a tres salinidades y los controles.

solución altamente oxidante, de manera que en los elementos químicos disueltos predominan los estados de mayor oxidación.²⁴ Sin embargo, en zonas próximas a las costas, los organismos agotan el contenido de oxígeno disuelto y bajan así el potencial de reducción, por lo que se induce la reducción de algunos elementos. El cromo se presenta principalmente como $CrO_4^{=}$ (VI), en agua de mar aireada, pero pasa a Cr(III), en ambiente de poco oxígeno.²⁴ Es interesante observar que el agua de mar almacenada por meses a temperatura ambiente tampoco cambió su color ni su sabor.

El ensayo cometa es una prueba validada mundialmente, por su alta sensibilidad y rapidez en el laboratorio para medir

daño y reparación en el ADN de células individuales, estudios de genotoxicidad y biomonitorio;^{25, 26} también se ha utilizado localmente para investigaciones en personal expuesto a contaminantes de los laboratorios²⁷ y en la evaluación de aguas tratadas con cloro para el consumo humano en el acueducto de Medellín, considerada una de las aguas mejor tratadas en Colombia, y sin embargo, se ha descrito la presencia de efecto genotóxico por este tratamiento en el material orgánico aislado y concentrado de esta agua.²⁸ Para darle continuidad a nuestras investigaciones y lograr mayor bioseguridad en el consumo de agua de mar, se debe también evaluar la genotoxicidad del material orgánico concentrado del agua de mar y realizar otras pruebas genéticas, como intercambio de cromátides hermanas y el ensayo de AMES. También es muy importante realizar estudios de toxicidad en personas que la consumen, incluyendo otras pruebas para medir toxicidad hepática y renal.

Conclusiones

Los resultados preliminares de nuestra investigación sugieren que hay bioseguridad en el agua de mar obtenida en Coveñas a 15 Km de la línea de playa, respecto de la posible presencia de agentes químicos que puedan inducir daño a las membranas celulares o al ADN celular —aún en condiciones extremas de concentración hipertónica— y apoyan así el consumo actual en humanos y animales. Sin embargo, en investigaciones futuras se deberán estudiar muestras de la orilla y concentrar la materia orgánica del agua de mar para detectar la presencia de agentes tóxicos, como también hacer la evaluación de toxicidad en personas que la consuman.

Reconocimientos

Se agradece a la Fundación Aquamaris por el apoyo económico, a la profesora María Elena Márquez F. de la Universidad Nacional, sede de Medellín, y a su estudiante de maestría, Andrés Pareja L., por la asesoría en el laboratorio de biotecnología animal, donde se realizó este trabajo.

Referencias

1. Quinton R. L'eau de mer milieu organique. Constance du milieu marin originel comme milieu vital des cellules, à travers la série animale. 39.^a ed. París: Editions Encre; 1995. p. 503.
2. Mahé A. El plasma de Quinton: el agua de mar nuestro medio interno. Barcelona: Icaria; 1999. p. 190.
3. Giese AC. Fisiología general: estructura y dinámica celular. 3.^a ed. México: Interamericana; 1968. p. 603.
4. Arslan Z, Ertas N, Tyson JF, Uden PC, Denoyer ER. Determination of trace elements in marine plankton by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Fresenius J Anal Chem. 2000;366(3):273-282.
5. Fenical W. Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. Chem Rev 1993;93(5):1673-1638.
6. Kimata H, Tai H, Nakagawa K, Yokoyama Y, Nakajima H, Ikegami Y. Improvement of skin symptoms and mineral imbalance by drinking deep sea water in patients with atopic eczema/dermatitis syndrome (AEDES). Acta Medica (Hradec Kralove) 2002;45(2):83-84.
7. Kimata H, Tai H, Nakajima H. Reduction of allergic skin responses and serum allergen-specific IgE and IgE-inducing cytokines by drinking deep-sea water in patients with allergic rhinitis. Otorhinolaryngol Nova 2001;11: 302-303.
8. Tai H, Nakagawa K, Watanabe Y, Yokoyama Y, Nakajima H, Ikegami Y, Nozaki Y, Kikuchi Y. Effect of high mineral water prepared from deep-sea water on human blood pressure and hemorheological parameter. Deep Ocean Water Res 2000;1:53-55.
9. Harari M, Shani J, Seidl V, Hristakieva E. Climatotherapy of atopic dermatitis at the dead sea: demographic evaluation and cost-effectiveness. Int J Dermatol 2000;39(1): 59-69.
10. Holmstrom M, Rosen G, Wahlander L. Effect of nasal lavage on nasal symptoms and physiology in wood industry workers. Rhinology 1997;35(3):108-112.
11. Seppely M, Schweri T, Hausler R. Comparative randomised clinical study of tolerability and efficacy of rhinomer force 3 versus a reference product in post-operative care of the nasal fossae after endonasal surgery. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec 1996;58(2):87-92.
12. Laboratoires Quinton International S.L. Almoradí (CE). Laboratorios Quinton. [Sitio en internet]. Disponible en: www.quinton.es. Consultado: 18 de octubre de 2005.
13. Rojas E, Lopez MC, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay, methodology and applications. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1999;722(1-2):225-254.
14. Roldán GE. Actividad antibacteriana del agua de mar *in vitro*, frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Medellín, 2003. Trabajo de grado (bióloga). Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
15. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of ADN damage in individual cells. Exp Cell Res 1988;175(1):184-191.
16. Duthie SJ, Ross M, Collins A R. The influence of smoking and diet on the hypoxanthine phosphoribosyl transferase (hprt) mutant frequency in circulating T lymphocytes from a normal human population. Mutat Res 1995;331(1):55-64.
17. Konca K, Lankoff A, Banasik A, Lisowska H, Kuszewski T, Gózdź S, Koza Z, Wojcik A. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. Mutat Res 2003;534(1-2):15-20.
18. Beresford RA, Fastier FN. Effects of some s-alkylthio-uroniums and related compounds on the osmotic fragili-

- ty and the membrane expansion of human erythrocytes. *Br J Pharmacol* 1980;71(1):253-258.
19. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999;26(9-10):1231-1237.
 20. Colombia. Ministerio de Salud. Perfiles epidemiológicos: región costa Atlántica. Bogotá, D.C: El Ministerio; 1996.
 21. Hood DW. Los ciclos químicos del mar. p. 30-40. En: Vetter RC. *Oceanografía: la última frontera*. Buenos Aires: El Ateneo; 1976.
 22. Groff JL, Gropper SS, Hunt SM. *Advanced nutrition and human metabolism*. 2nd ed. St. Paul, MN: West Publishing; 1995. p 575.
 23. Vasant C, Balamurugan K, Rajaram R, Ramasami T. Apoptosis of lymphocytes in the presence of Cr(V) complexes: role in Cr (VI)-induced toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285(5):1354-1360.
 24. Turekian KK. *Los océanos*. Barcelona: Omega; 1974.
 25. Piperakis SM, Visvardis EE, Tassiou AM. Comet assay for nuclear DNA damage. *Methods Enzymol* 1999; 300:184-194.
 26. Hartmann A, Speit G. Genotoxic effects of chemical in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchange (SCE). *Mutat Res* 1995;346(1):49-56.
 27. Márquez ME, López JB, Correa G, Pareja A, Giraldo NA. Detección del daño genotóxico agudo y crónico en una población de laboratoristas ocupacionales expuestos. *Iatreia* 2003;16(4):275-282.
 28. Velásquez N. Mutagenicidad y genotoxicidad de extractos de agua tratada para el consumo humano y de subproductos de la cloración. Medellín, 2000. Trabajo de grado (bióloga). Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.