

Actividad mutagénica de aguas de consumo humano antes y después de clorar en la planta de Villa Hermosa, Medellín

IVÁN MELÉNDEZ, MARGARITA ZULETA, IVÁN MARÍN, JAIME CALLE, DIEGO SALAZAR

PALABRAS CLAVE

AGUA CLORADA

GENOTÓXICOS

MUTÁGENOS

CARCINÓGENOS

CONTAMINACIÓN

EN ESTE TRABAJO SE ENCONTRÓ que la contaminación y la cloración influyen en la mutagenicidad de las aguas tratadas en la planta de Villa Hermosa. Para evaluar la actividad mutagénica se utilizó el test de Ames con las cepas TA-100 y

.....
IVÁN MELÉNDEZ MSC, MARGARITA ZULETA MSC., BIÓLOGO IVÁN MARÍN; JAIME CALLE PHD; BIÓLOGO DIEGO SALAZAR
Laboratorio de Mutagenesis Ambiental, Departamento de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Este trabajo fue financiado por CORANTIOQUIA y la Universidad de Antioquia.

TA-98 de *Salmonella typhimurium*. Se observó que la contaminación es la responsable de la alta mutagenicidad indirecta observada en el agua que entra a la planta de tratamiento de Villa Hermosa. El tratamiento de las aguas antes de clorar deja pasar aproximadamente un 30% de los mutágenos indirectos formados por contaminación, los cuales pueden agregarse o potenciar los nuevos mutágenos formados por la cloración del agua (zona 6). La alta mutagenicidad directa en la cepa TA-100 obtenida de esta agua clorada concuerda con el patrón de mutagenicidad producido por los trihalometanos formados en aguas cloradas.

INTRODUCCIÓN

EL CLORO QUE SE AGREGA AL AGUA POTABLE para desinfectarla reacciona con el material húmico lo que puede formar compuestos genotóxicos y potencialmente carcinogénicos (1-4). Esto es preocupante porque los mutágenos presentes en el agua de consumo llegan continuamente a la población durante largo tiempo lo que puede ocasionar enfermedades de origen mutacional tal como el cáncer. Varios estudios epidemiológicos han mostrado que el consumo de agua clorada está asociado con un incremento en el riesgo de cáncer gástrico, de vejiga y de recto (5-7). En varios trabajos se ha encontrado que uno de los principales mutágenos formados en el agua clorada es el 3- cloro- 4 (diclorometil) -5- hidroxil- 2- (5H) furanona (MX) (8). Este mutágeno directo puede producir entre 4.000 y 13.000 mutaciones por nmol en *Salmonella typhimurium*, cepa TA-100 (9-11). También se ha encontrado que este mutágeno (MX) produce cáncer de tiroides, hígado y adenomas foliculares, de bronquios, pulmones y páncreas en ratas (12).

El embalse Piedras Blancas surte la planta Villa Hermosa que distribuye el agua potable a varias zonas de Medellín. Las quebradas la Honda, Piedras Blancas, Chorrillos y La Mosca que alimentan dicho embalse pasan cerca de zonas agrícolas, de donde pueden recibir lixiviados con pesticidas, muchos de los cuales son mutágenos y carcinógenos (13-15). También pasan cerca a caseríos que vierten aguas negras a dichas quebradas. Las aguas negras pueden contener gran cantidad de fuertes mutacarcinógenos como **hidrocarburos poli-cíclicos aromáticos** contenidos en cenizas y tiznes de ollas o **amino-arenas** excretadas en la orina y heces de personas que se alimentan de carnes fritas y asadas (16-20). Además, la quebrada La Mosca recibe los residuos de una industria dental, los cuales resultaron ser altamente mutagénicos según datos obtenidos en nuestro laboratorio. Es posible que muchos de estos mutágenos debidos a la contaminación lleguen a la planta Villa Hermosa donde además se deben formar nuevos mutágenos por la cloración. Teniendo en cuenta la importancia de saber si las aguas potables contienen mutágenos, se hizo este trabajo con el objetivo de detectar si las aguas de consumo tratadas en la planta de Villa Hermosa contienen mutágenos y si éstos se originan por contaminación y por cloración.

MATERIALES Y MÉTODOS

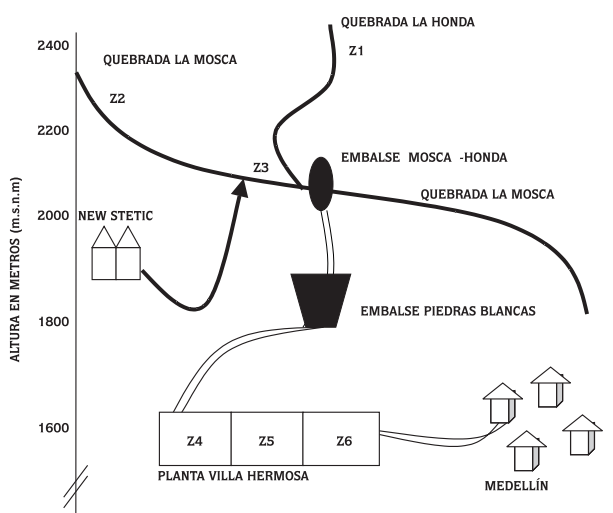
Toma de muestras

LAS MUESTRAS SE TOMARON EN TIEMPO SECO, a 50 centímetros de profundidad; el volumen total de cada muestra fue de 100 litros. Se captaron en 6 sitios diferentes: Zona 1, lugar próximo al nacimiento de la quebrada La Honda. Zona 2, cerca al nacimiento de la quebrada La Mosca. Zona 3, aguas de

la quebrada La Mosca 50 metros después de recibir residuos de una industria dental. Zona 4, aguas inmediatamente antes de entrar a la planta de tratamiento de Villa Hermosa. Zona 5, aguas tomadas después de pasar por la planta de tratamiento de Villa Hermosa. Zona 6, aguas después de recibir la cloración en la planta de Villa Hermosa (Figura N° 1).

Figura N° 1

ESQUEMA DE LAS ZONAS (Z) DE RECOLECCIÓN DE AGUAS



- Zona 1:** Lugar próximo al nacimiento de la quebrada La Honda.
- Zona 2:** Lugar próximo al nacimiento de la quebrada La Mosca.
- Zona 3:** Aguas de la quebrada La Mosca 50 metros después de recibir residuos de material dental.
- Zona 4:** Aguas inmediatamente antes de entrar a la planta de tratamiento de Villa Hermosa.
- Zona 5:** Aguas tomadas después de pasar por la planta de tratamiento de Villa Hermosa.
- Zona 6:** Aguas después de recibir la cloración en la planta de Villa Hermosa.

Concentración y extracción del material orgánico del agua

CON EL FIN DE ESTABILIZAR LOS TRIHALOMETANOS, el agua clorada se acidificó a pH 2 con ácido clorhídrico.

co. Para concentrar el material orgánico, el agua se pasó por una columna que contenía 100 g de resina XAD-7 y 100 g de resina XAD-2 a una velocidad aproximada de 15 ml/min. La extracción se hizo con 3 volúmenes de acetona. Los eluyentes se retiraron por rota-evaporación a baja presión a 60 °C. hasta alcanzar la sequedad. El extracto se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO) al 50%. Antes de usar las resinas XAD, éstas se lavaron consecutivamente cada 24 horas, con metanol, acetona y metanol. En el momento de usar la XAD se lavó 3 veces con agua. En la parte inferior y superior de la columna se colocó fibra de vidrio que también se lavó con metanol.

Detección de la potencialidad mutagénica por el test de Ames

EL EFECTO MUTAGÉNICO DE LOS EXTRACTOS se determinó por medio del test de Ames de acuerdo con el protocolo descrito por Maron and Ames (21). Se usaron dos cepas de *Salmonella typhimurium*, TA-100 y TA-98. En esta prueba el indicativo de la mutación está dado por la reversión his^- a his^+ . Los revertantes se conocen porque crecen en medio mínimo sin histidina. Con cada dosis se tratan 10^7 bacterias, en presencia o ausencia de enzimas activadoras contenidas en un homogenizado de hígado (mezcla S-9) de rata macho.

Se utilizaron controles positivos y negativos. Para el control positivo se utilizó 2-aminofluoreno (2-AF) el cual es un mutágeno indirecto que necesita activación metabólica (S-9). Como control negativo se usó el solvente DMSO 50% y agua desionizada y bidestilada. Esta agua se sometió al mismo proceso realizado con las muestras.

Se utilizó el criterio de McGeorge et al (22) y Valent et al (23) para interpretar los resultados del test de

Ames. Si el número de revertantes duplica el control negativo y se obtiene una curva de dosis respuesta reproducible, se considera respuesta positiva. Cuando uno de los criterios no se cumple, se considera que la muestra sólo presenta mutagenicidad débil. Las dosis fueron consideradas citotóxicas cuando la viabilidad no pasó del 60%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EN LA TABLA 1 Y LA FIGURA 2 PUEDE APRECIARSE que las aguas de la Z1 tomadas en un sitio cercano al nacimiento de la quebrada La Honda, presentaron actividad mutagénica significativa en la cepa TA-100 que superó 2 veces el control, sólo en presencia de oxigenasas contenidas en la mezcla S-9. Esto indica que la quebrada La Honda contiene mutágenos indirectos que necesitan activación metabólica para poder interactuar con el DNA. Al no observar mutagenicidad en la cepa TA-98 se deduce que los mutágenos de dicha quebrada son eficaces para producir mutación por sustitución de un par de bases en la cepa TA-100, pero no producen mutación por pérdida de bases en la cepa TA-98. Estos resultados positivos pueden deberse a residuos domiciliarios y/o lixiviados químicos de la zona agrícola cercana del nacimiento de la quebrada La Honda. También se observa en la tabla 1 y figuras 2 y 3, que la quebrada La Mosca, cerca a su nacimiento (Zona 2), presenta actividad mutagénica indirecta que supera 3 veces la del control en la cepa TA-98. Esta mutagenicidad podría deberse a contaminación por residuos domiciliarios ya que esta quebrada casi desde su nacimiento pasa cerca de caseríos. En la tabla 1 y las figuras 2 y 3 también se puede observar que la Zona 3 correspondiente a aguas de la quebrada La Mosca, 50 metros después de reci-

bir residuos de una industria dental, presenta actividad mutagénica tanto directa como indirecta en la cepa TA-100 y en la cepa TA-98, o sea, que los mutágenos contenidos en estas aguas producen mutación por sustitución de bases o por pérdida o ganancia de un par de bases. Esta mutagenicidad fue 3 veces mayor que el control, lo que dio una confiabilidad del 99%. La mutagenicidad observada en esta zona se debe a la contaminación con residuos de la industria dental, los que resultaron altamente mutagénicos en un trabajo que realizamos en el Laboratorio de Mutagénesis de la Universidad de Antioquia. Estos hallazgos indican la necesidad de impedir que los residuos de dicha industria sean vertidos en las quebradas aledañas ya que muchas de estas aguas son utilizadas como fuentes abastecedoras de represas que surten a plantas de tratamiento, para luego ser suministradas a la población como agua de consumo. En las figuras 2 y 3 se observa además que las aguas inmediatamente antes de entrar a la planta de tratamiento de Villa Hermosa presentan alta mutagenicidad indirecta (hasta 11 veces mayor que el control) y también alguna mutagenicidad directa (5 veces mayor que el control en la cepa TA-98. También en la cepa TA-100 se encontró alguna mutagenicidad directa (2 veces mayor que el control). La presencia de mutágenos en esta zona claramente muestran que se deben a la contaminación posiblemente por aguas negras, lixiviados con pesticidas provenientes de zonas agrícolas y residuos de la industria dental que reciben algunos afluentes abastecedores de la represa de Piedras Blancas. Para evitar dichos mutágenos es necesario tomar el agua que surte las represas de sitios muy próximos a los nacimientos de las quebradas con el fin de evitar contaminación con aguas negras, desechos industriales y lixiviados con pesticidas provenientes de zonas agrícolas. En las figuras 2 y 3 también se observa que las aguas tra-

Tabla N° 1

ACTIVIDAD MUTAGÉNICA EN SALMONELLA TYPHIMURIUM TA-100 Y TA-98
DE AGUAS TOMADAS EN SEIS ZONAS DIFERENTES.

ZONA	DOSIS mg	PROMEDIO DE MUTACIONES POR TRATAMIENTO				TOC (ppm)	NO ₂ (ppm)	NO ₃ (ppm)	PH
		TA-100		TA-98					
		CON S-9 ± SD	SIN S-9 ± SD	CON S-9 ± SD	SIN S-9 ± SD				
Z1	1.5	191 ± 11*	72 ± 20	25 ± 6	19 ± 1	8.2	0.043	0.0005	6.9
	1.0	183 ± 53*	88 ± 20	29 ± 1	34 ± 4				
	0.5	172 ± 2	78 ± 11	32 ± 6	32 ± 3				
	0.25	94 ± 12	86 ± 10	34 ± 5	20 ± 0				
Z2	1.5	106 ± 19	80 ± 21	90 ± 8*	37 ± 3	7.9	0.043	0.005	6.9
	1.0	102 ± 19	75 ± 23	75 ± 29*	22 ± 5				
	0.5	96 ± 10	82 ± 14	43 ± 12	27 ± 1				
	0.25	99 ± 12	77 ± 15	32 ± 2	14 ± 0				
Z3	1.5	180 ± 21*	220 ± 13*	95 ± 3**	14 ± 0	12	0.219	0.058	7.5
	1.0	160 ± 10*	179 ± 13*	78 ± 12*	13 ± 0				
	0.5	105 ± 12	87 ± 9	33 ± 6	22 ± 4				
	0.25	106 ± 20	82 ± 19	32 ± 1	22 ± 4				
Z4	1.5	143 ± 29	190 ± 23*	280 ± 10**	138 ± 19*	32	0.05	-	7.0
	1.0	130 ± 36	160 ± 57*	240 ± 12**	52 ± 1				
	0.5	125 ± 34	142 ± 21	200 ± 9**	10 ± 0				
	0.25	109 ± 6	140 ± 5	20 ± 1	15 ± 2				
	0.125	88 ± 12	-	-	-				
Z5	1.5	135 ± 12	114 ± 8	80 ± 13*	79 ± 4*	7.41	0.06	-	6.3
	1.0	120 ± 11	118 ± 20	64 ± 11*	64 ± 12*				
	0.5	92 ± 38	126 ± 5	62 ± 1*	62 ± 3*				
Z6	1.5	187 ± 0*	380 ± 4**	66 ± 4*	105 ± 28**	4.68	0.05	-	6.4
	1.0	169 ± 7*	290 ± 5*	62 ± 6*	105 ± 8**				
	0.5	112 ± 18	180 ± 14*	69 ± 3*	81 ± 3**				
	0.25	113 ± 4	103 ± 0	27 ± 4	62 ± 6				
DMSO 50%	50%	87	86	26	23				
Agua BD	100 µl	86	87	25	19	0	0	0	6.8
Agua BD + Cloro	100 µl	85	86	24	26	0	0	0	6.8
2 AF	10 µg	1113	104	1204	44				

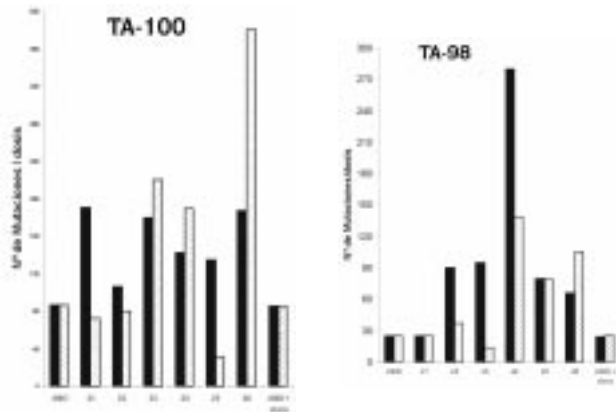
Z1, lugar próximo al nacimiento de la quebrada La Honda. Z2, cerca al nacimiento de la quebrada La Mosca. Z3, aguas de la quebrada La Mosca 50 metros después de recibir residuos de material dental. Z4, aguas inmediatamente antes de entrar a la planta de tratamiento de Villa Hermosa. Z5, aguas tratadas antes de clorar en la planta Villa Hermosa. Z6, aguas tratadas con cloro en la planta de Villa Hermosa. ABD, agua bidestilada y desionizada. (CON S-9) Indica que a la muestra de agua se le agregaron enzimas que pueden activar los mutágenos. Todas las muestras fueron tomadas en tiempo seco. Los promedios se calcularon con base en los resultados de 3 experimentos independientes cada uno por duplicado. Las dosis corresponden a los pesos en mg del extracto orgánico contenido en cada muestra. Para el control negativo se usó el DMSO al 50% como solvente de los extractos. El 2-aminofluoreno (2AF), se utilizó como control positivo

* Indica mutagenicidad cuando el tratamiento supera de 2 a 3 veces el control

** Indica alta mutagenicidad cuando el tratamiento supera más de 3 veces el control.

Figura N° 2

COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD MUTAGÉNICA

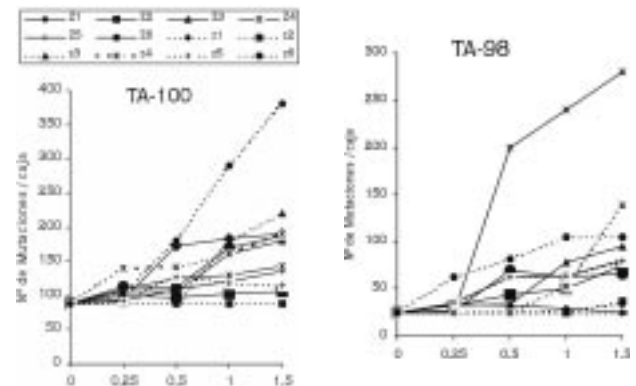


Comparación de la actividad mutagénica de 1,5 mg de extracto de las siguientes aguas. Z1: lugar próximo al nacimiento de la quebrada La Honda. Z2: Lugar próximo al nacimiento de la quebrada La Mosca. Z3: Aguas de la quebrada La Mosca 50 metros después de recibir residuos de material dental. Z4: Aguas inmediatamente antes de entrar a la planta de tratamiento de Villa Hermosa. Z5: Aguas tratadas antes de clorar en la planta Villa Hermosa. Z6: Aguas tratadas con cloro en la planta de Villa Hermosa. ABD: Agua bidestilada y desionizada. Como esta agua BD no presentó extracto de material orgánico, se tomaron 100 ul para cada dosis. ABD + cloro: agua bidestilada desionizada más cloro. La actividad mutagénica se evaluó en *Salmonella typhimurium* TA-100 y TA-98. Cuando a los extractos orgánicos de las aguas se les adicionaron oxigenasas contenidas en la mezcla S-9, los resultados se representan con barras negras y los resultados obtenidos sin S-9 se representan con barras punteadas.

tadas en la planta de Villa Hermosa antes de la cloración (Zona 5), inducen mutagenicidad directa e indirecta en la cepa TA-98, la cual supera más de 2 veces el control. Esta mutagenicidad fue apenas un 28% de la observada en la zona 4 antes de pasar por el tratamiento. Esto indica que el tratamiento (coagulación floculación, sedimentación y filtración) que sufren las aguas antes de clorar, disminuye la mutagenicidad en unas dos terceras partes. Este hecho concuerda con la disminución del carbono orgánico total (TOC) en dicha zona (de 20 ppm en la zona 4 pasó a 7,4 ppm en la zona 5). También puede observarse en las figuras 2 y 3 que en las

Figura N° 3

INFLUENCIA DE LA CONTAMINACIÓN Y LA CLORACIÓN EN LA ACTIVIDAD MUTAGÉNICA DE LAS AGUAS QUE ENTRAN A LA PLANTA DE VILLA HERMOSA



Z1: lugar próximo al nacimiento de la quebrada La Honda. Z2: Lugar próximo al nacimiento de la quebrada La Mosca. Z3: Aguas de la quebrada La Mosca 50 metros después de recibir residuos de material dental. Z4: Aguas inmediatamente antes de entrar a la planta de tratamiento de Villa Hermosa. Z5: Aguas no cloradas después de pasar por la planta de tratamiento de Villa Hermosa. Z6: Aguas cloradas después del tratamiento en la planta de Villa Hermosa. La mutagenicidad se midió en *Salmonella typhimurium* TA-100 y TA-98. Las curvas continuas (—) indican que a los extratos orgánicos de las diferentes aguas se les agregaron oxigenasas (S-9) para activar los mutágenos. Los resultados obtenidos sin S-9 se representan en curvas discontinuas (- - - - -). La dosis se da en peso de material orgánico del cual se obtuvo el extracto mutagénico del agua.

aguas tratadas con cloro en la planta de Villa Hermosa (Zona 6), la actividad mutagénica directa en la cepa TA-100 aumentó considerablemente hasta 4,5 veces el control. Este aumento de la mutagenicidad en aguas cloradas es explicable, ya que por la reacción del cloro con el material orgánico contenido en las aguas se forman nuevos mutágenos, posiblemente trihalometanos como el (3-Cloro-4-diclorometil)-5-hidroxy-2-(5H)-furanone) MX, el cual según varios autores, es un mutágeno directo que produce principalmente mutación por sustitución de bases (24-26). También se observa en la zona 6 que la adición de S-9, disminuye ostensi-

blemente su potencialidad mutagénica. Quizás esta disminución se deba a que los mutágenos directos, con propiedades electrofílicas formados por cloración, se pueden conjugar con ciertas proteínas de la mezcla S-9, perdiendo así su actividad mutagénica. Algunos investigadores han tratado de demostrar lo anterior sustituyendo el S-9 por otras proteínas con propiedad nucleofílica como el glutatión (27). La mutagenicidad indirecta (2,5 veces el control) producida en la cepa TA-98 por aguas de la zona 6 podría deberse a que los mutágenos indirectos de las aguas antes de clorar permanecieron activos después de adicionar el cloro.

En la figura 3 se observa efecto de dosis, especialmente en relación con los mutágenos indirectos de la zona 4 en TA-98 y los directos de la zona 6 en la cepa TA-100.

CONCLUSIONES

CON LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN ESTE TRABAJO se puede concluir que la contaminación es la responsable de la mutagenicidad observada en el agua que entra a la planta de tratamiento de Villa Hermosa y que el tratamiento de las aguas antes de clorar deja pasar aproximadamente un 30% de los mutágenos formados por contaminación, los que posiblemente se agregan o podrían potenciar los mutágenos formados por la cloración del agua tratada para el consumo humano. Además, la alta mutagenicidad directa producida por el agua clorada de la planta de Villa Hermosa está de acuerdo con el patrón mutacional producido por los trihalometanos formados en aguas cloradas.

A la luz de lo anterior se recomienda tomar el agua que surte las represas de sitios muy próximos a los

nacimientos de las quebradas con el fin de evitar contaminación con aguas negras, desechos industriales y lixiviados con pesticidas provenientes de zonas agrícolas. Además, reducir al mínimo la presencia de material orgánico en el agua, ya que a mayor cantidad de material orgánico aumenta la formación de mutágenos por el proceso de cloración.

AGRADECIMIENTOS

LOS AUTORES AGRADECEN A **CORANTIOQUIA** y a la Universidad de Antioquia por la financiación de este proyecto.

SUMMARY

MUTAGENIC ACTIVITY OF HUMAN DRINKING WATER BEFORE AND AFTER CHLORINATION IN VILLA HERMOSA TREATMENT PLANT

We found that pollution and chlorination have effects on mutagenicity of water from Villa Hermosa purification plant. In order to evaluate the mutagenic activity we used Ames' test with Salmonella strains TA-100 and TA-98. We observed that anthropogenic pollution and dental industry residues are the origin of the high indirect mutagenicity observed in water which gets into Villa Hermosa treatment plant and that before chlorination water treated in this plant (zone 5) retains about 70% of mutagens derived from pollution, Mutagens that were not retained by treatment may be added or potentiate the new mutagens formed by chlorination of drinking water (zone 6). The very high direct mutagenicity with TA-100 obtained from this chlorinated water is consistent with the type of mutagenicity of trihalomethanes formed in chlorinated water.

BIBLIOGRAFÍA

1. KRONBERG L, VARTLAINEN T. Ames mutagenicity and concentration of the strong mutagen 3-Chloro (dichloromethyl) -5-hydroxy-2 (SH)-furanone and of its geometric isomer E-2-3-Chloro-3-(dichloromethyl)-4-oxo-butanoic acid in chlorine treated tap waters. *Mut Res* 1988; 206: 177-182.
2. MEIER JR. Genotoxic activity of organic chemicals in drinking water. *Mut Res* 1988; 96: 211-245.
3. HORH H. Identification of mutagens in water. *J Fr Hydr* 1990; 21: 135-145.
4. FREEMAN BA, WILSON RE, BINDER RG, HADDON WF. Halogenated 2,5- pyrrolidinediones: synthesis, bacterial mutagenicity in Ames tester strain TA-100 and semi-empirical molecular orbital calculations. *Mut Res* 2001; 490: 89-98.
5. CANTOR KP, HOVER R, HARTGE P, et al. Bladder cancer drinking water source, and tap water consumption: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 1987; 79: 1.269-1.279.
6. KOIVUSALO M, JAAKKOLA JK, VARTIANEN T, et al. Drinking water mutagenicity and cancers of the gastrointestinal and urinary tract. An ecological study. *Am J Public Health* 1984; 84: 1.223-1.228.
7. FLATEN TP. Chlorination of drinking water and cancer incidence in Norway. *Int J Epidemiol* 1992; 21: 6-15.
8. HEMMING J, HOLMBOM B, REUNANEN M, et al. Determination of the strong mutagen 3-Chloro-4 (dichloromethyl) -5-hydroxy-2 (SH)-furanone in chlorinated drinking and humic waters. *Chemosphere* 1986; 15: 549-556.
9. HOLMBOM B, VOSS RH, MORTIMER RD, et al. Fractionation, isolation and characterization of Ames' mutagenic compounds in kraft chlorination effluents. *Environ Sci Technol* 1984; 18: 333-337.
10. PADMAPRIYA AA, JUST G. AND LEWIS N. Synthesis of 3-Chloro-4-diclorometil)-5-hidroxy-2-(5H)-furanone a potent mutagen. *Can J Chem* 1985; 63: 828-832.
11. MEIER JR, KNOHL RB, COLEMAN WE, RINGHAND HP, MUNCH JW, KAYLOR WH, et al. Studies on the potent bacterial mutagen, 3-Chloro-4-(dichloromethyl) -5-hydroxy-2 (5H)-furanone: Aqueous stability, XAD recovery and analytical determination in drinking water and in chlorinated humic acid solution. *Mut Res* 1987; 189: 363-373.
12. KOMULAINEN H, KESMA VM, VAITTINEN SL, KALISTE-KORHONEN E, LOTJONEN S, TOUMINEN RK, et al. Carcinogenicity of the drinking water mutagen (3-Chloro-4-diclorometil)-5-hidroxy-2-(5H)-furanone), in rat. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 848-856.
13. OLAYA CP, RODRIGUEZ VJ, POSSO HJ, CORTEZ JE. Organochlorine exposure and breast cancer risk in colombian women. *Cad Saude Publica* 1999; 14: suppl 3: 125-132.
14. CANTOR KP, BLAIR A, EVERETT G. Pesticides and other agricultural risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men in Iowa and Minnesota. *Cancer Res* 1992; 52: 2.447-2.455.
15. ZULETA M, SALAZAR J, ADELAIDA G. Mutagenicidad de cinco herbicidas en Salmonella typhimurium. *Rev Latinoam Genet* 1990; 46: 321-328.
16. FELTON JS, KNIZE MG. Ocurrance, identification and bacterial mutagenicity of heterocyclic amines in cooked food. *Mut Res* 1991; 259: 205-219.
17. FRANSEN H. Excretion of DNA adducts of 2-amino-1-methyl-6-phenylamidazo[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* 1997; 18: 1.555-1.560.
18. GABBANI G, NARDINI B, BONDIN A, PAVANELLO S, JANNI L, et al. Urinary mutagenicity on TA-98 and YG1024 Salmonella typhimurium strains after a hamburger meal: influence of GSTM1 and NAT2 genotypes. *Mutagenesis* 1998; 13: 2-8.
19. KATAOKA H, HAYATSU T, HIETSCH G, STEINKELLNER H, NISHIOKA S, NARIMATSU S, et al. Identification of mutagenic heterocyclic amines (IQ, Trip - P- 1, and A α C) in the water of the Danube river. *Mut Res* 2000; 466: 27-35.

20. ZULETA M, VALENCIA O, POSADA L, MUÑETON CM, ARANGO O, MELENDEZ I. Mutagen formation in three popular colombian cooked foods: Effect of supplemental creatine and corn brand. *Environ Mol Mut* 1994; 23: 73-77.
21. MARON DM, AMES BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mut Res* 1983; 113: 173-215.
22. CGEORGE LJ, LOUIS JB, ATHEORHOLT TB. Mutagenicity analyses of industrial effluents: background, results to date. Report of the New Jersey Department of environmental protection, Trenton NJ 1983.
23. VARGAS VMF. Avaliação do test para triagem e diagnostico do agents genotoxicos ambientais. Doctoral thesis, Instituto de Biociencias, Universidad federal do Rio grande do Sul. 1992; 237 pp
24. SCHUT HAJ, CUMMINGS DA, LIN ELC, ³²P-postlabelling analysis of DNA adduct formation of the drinking water mutagen 3-Chloro-4-(dichloromethyl) - 5-hydroxy-2 (5H)-furanona (MX). *Environ Mol Mutagen* 1991; 17: 65-70.
25. DEMARINI DM, ABUSHAKRA A. Mutation spectra in Salmonella of chlorinated, chloraminated or ozonated drinking water extracts: comparison to MX. *Environ Mol Mutagen* 1995; 26: 270-285.
26. MUNTER T, KRONBERG L, SJOHOLM R. Identification of adducts formed in reaction of adenosine with 3-chloro -4- methyl -5- hydroxy- 2 (5) furanona, a bacterial mutagen present in chlorine disinfected drinking water. *Chem Res Toxicol* 1996; 9: 703-708.
27. WATERS LC, SCHENLEY RL, OWEN BA, WALSH PJ, HSIE AW, JOLLEY RL, et al. Biotesting of waste water: A comparative study using the Salmonella and CHO assay system. *Environ Molecular Mutagenesis* 1989; 14: 254-263.

