



Genotoxicidad de los contaminantes prioritarios en el aire de Villa del Rosario - Norte de Santander, Colombia

Genotoxicity of priority pollutants in the air of Villa del Rosario in Norte de Santander, Colombia

Alfonso Quijano-Parra¹, Mónica Juliana Quijano-Vargas², Iván Meléndez-Gélvez³

- 1 PhD. en Química. Profesor Asociado. Grupo de Investigación en Química. Facultad de Ciencias Básicas. Laboratorio de Control de Calidad. Universidad de Pamplona. Pamplona, Colombia. e-mail: alfonsoquijanoparra@gmail.com
- 2 Esp. en Bioquímica. Investigadora Universidad de Pamplona. Grupo de Investigación en Química - Facultad de Ciencias Básicas. Laboratorio de Control de Calidad. Universidad de Pamplona. Pamplona, Colombia. e-mail: mojuquiva@hotmail.com
- 3 PhD. en Biología. Profesor Asociado. Grupo de Investigación en Biología Molecular. Facultad de Ciencias Básicas. Universidad de Pamplona. Pamplona, Colombia. e-mail: imgelvez@hotmail.com

Fecha de recepción: Agosto 08 - 2014

Fecha de aceptación: Mayo 25 - 2015

Quijano A, Quijano MJ, Meléndez I. Genotoxicidad de los contaminantes prioritarios en el aire de Villa del Rosario-Norte de Santander, Colombia. Univ. Salud. 2015;17(1):69-79

Resumen

Introducción: Las partículas en suspensión $PM_{2.5}$ son capaces de penetrar profundamente en el pulmón y se componen de mezclas químicas complejas, incluyendo mutágenos y carcinógenos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs); la inhalación de altas concentraciones de partículas en suspensión ($PM_{2.5}$) causa enfermedades respiratorias, cardíacas y pulmonares. **Objetivo:** Identificar los contaminantes prioritarios y estudiar mediante el ensayo cometa, la actividad genotóxica del material particulado fracción respirable $PM_{2.5}$ del aire del municipio de Villa del Rosario-Norte de Santander. **Materiales y métodos:** Las muestras del aire ($PM_{2.5}$) de Villa del Rosario, fueron recolectadas con un muestreador Partisol 2025 plus utilizando filtros pallflex mediante muestreos por 24 horas con una frecuencia de tres días. La materia orgánica de los filtros de $PM_{2.5}$ fue extraída por ultrasonido con diclorometano obteniéndose el extracto global. Este se separó en tres fracciones por cromatografía en columna de gel (CPG) de sílice utilizando n-hexano, n-hexano-diclorometano y diclorometano, como los eluyentes correspondientes. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) de cada fracción se determinaron por cromatografía de gases con detector de ionización en llama (FID). **Resultados:** Por primera vez se reporta actividad genotóxica evaluada con el ensayo cometa, asociada con el $PM_{2.5}$ del aire del municipio de Villa del Rosario y se identifican los contaminantes prioritarios extraídos con diclorometano, presentes en la materia orgánica de una vía vehicular en Villa del Rosario, Norte de Santander. **Conclusión:** Los contaminantes prioritarios encontrados en el aire de Villa del Rosario son: Benzo(a) pireno, Naftaleno, Benzo(a) antraceno, Criseno, Benzo(b)fluoranteno, Benzo(k)fluoranteno y Dibenzo(a,h) antraceno, contaminantes altamente peligrosos por presentar actividad mutagénica y genotóxica.

Palabras clave: Genotoxicidad, $PM_{2.5}$, cromatografía de gases, contaminantes del aire, ensayo cometa, Colombia. (Fuente: DeCS, Bireme).

Abstract

Introduction: The suspended particles $PM_{2.5}$ are able to penetrate deep into the lung and consist of complex chemical mixtures, including mutagens and carcinogens such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). The inhalation of high concentrations of particulate matter ($PM_{2.5}$) causes respiratory, heart and lung diseases. **Objective:** To identify priority pollutants and study the genotoxic activity of breathable particulate matter $PM_{2.5}$ air by the comet assay in the municipality of Villa del Rosario-Norte de Santander. **Materials and methods:** The air samples ($PM_{2.5}$) of Villa del Rosario were collected with 2025 Partisol plus sampler by using filters pallflex through sampling for 24 hours with a frequency of three days. The organic matter of the $PM_{2.5}$ filters was extracted by ultrasound with dichloromethane to obtain the overall extract. This was separated into three fractions by gel column chromatography (GPC) of silica using n-hexane, n-hexane-dichloromethane and dichloromethane as the corresponding eluents. The polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) of each fraction were determined by gas chromatography with flame ionization detector (FID). **Results:** For the first time genotoxic activity assessed by the comet assay is reported, associated with the $PM_{2.5}$ air in the municipality of Villa del Rosario and the priority pollutants extracted with dichloromethane were identified, which were present in the organic matter in a vehicular route in Villa del Rosario, Norte de Santander. **Conclusion:** The priority pollutants found in the air of Villa del Rosario are: Benzo (a) pyrene, Naphthalene, Benzo (a) anthracene, chrysene Benzo (b) fluoranthene, benzo (k) fluoranthene and dibenzo (a, h) anthracene, which are highly hazardous pollutants to present mutagenic and genotoxic activity.

Keywords: Genotoxicity, $PM_{2.5}$, gas chromatography, air pollutants, comet assay, Colombia. (Source: DeCS, Bireme).

Introducción

La contaminación atmosférica producida por el material particulado por sus siglas en inglés PM es un problema mundial, el PM es generado por las actividades industriales y tubos de escape de vehículos de motor.¹ La exposición a partículas en el aire puede resultar en una amplia gama de efectos tales como aumento de la mortalidad diaria y la morbilidad en adultos, dificultades respiratorias y el desarrollo de cáncer de pulmón.^{2,3} Además en el tracto respiratorio, las funciones vitales de otros órganos pueden estar afectadas.⁴

En los entornos urbanos el PM se compone generalmente de un núcleo inerte carbonoso cubierto por capas de moléculas de los contaminantes adsorbidos tales como metales, sales de ácidos, compuestos de azufre, componentes orgánicos y otros materiales traza.⁵

Aunque el PM es uno de los contaminantes más peligrosos para la salud, está siendo

intensamente estudiado y todavía no está claro si se trata de sus características físicas es decir el tamaño o los parámetros químicos los principales responsables de los efectos sobre la salud.^{6,7} Sin embargo, diversos componentes nocivos del PM, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) pueden contribuir o incluso potenciar los respectivos efectos adversos para la salud y han sido identificados como uno de los mayores tóxicos del aire en la atmósfera de las áreas rurales y urbanas.⁸⁻¹¹

Estos compuestos orgánicos contienen desde dos hasta ocho anillos aromáticos fusionados y provienen de la combustión incompleta de combustibles fósiles, madera y biomasa así como de la volatilización de productos del petróleo.¹² Las emisiones vehiculares han sido reconocidas como la fuente antropogénica más importante de HAPs en el aire urbano.¹³

Los impactos del transporte vehicular en la salud y medioambientales son temas muy estudiados actualmente, el transporte vehicular es una de las más importantes fuentes de

emisiones antropogénicas en zonas urbanas que contribuyen en un 60% de las emisiones totales de HAPs.¹⁴⁻¹⁷ Algunos autores han demostrado que los escapes de los motores de los vehículos son probablemente la fuente más importante de HAPs actualmente detectada, varios estudios han demostrado que los HAPs especialmente dañinos son aquellos con 5-6 anillos aromáticos se encuentran predominantemente en las partículas (PM), en su mayoría debido a su alto peso molecular y baja volatilidad.¹⁸⁻²¹

Teniendo en cuenta que la combustión vehicular es una fuente de emisiones de HAPs, esta investigación tiene como objetivo identificar los contaminantes prioritarios (CP), presentes en el PM_{2.5} del aire de Villa del Rosario-Norte de Santander y evaluar el riesgo para la salud mediante el ensayo genotóxico conocido como ensayo cometa, la identificación de los contaminantes prioritarios se realizó mediante cromatografía de gases con detector de ionización en llama (FID), en muestras orgánicas de partículas finas (PM_{2.5}) recogidas en la sede de la Universidad de Pamplona, ubicada en la autopista internacional de Villa del Rosario-Norte de Santander-Colombia. Es necesario señalar que la ciudad de Villa del Rosario posee un clima cálido y seco durante el año.

En esta ciudad no hay época de lluvias muy marcadas. Cuando se realiza el monitoreo del PM_{2.5}, siempre se tiene en cuenta si durante el monitoreo llueve o no. En caso de presentarse lluvias estas no duran más de treinta minutos, pero se reportan para determinar la concentración diaria, los promedios aritméticos y geométricos de PM_{2.5}. No Hay periodos secos como tales.

Materiales y métodos

Muestreo

Se realizó el monitoreo de la fracción respirable PM_{2.5} con el equipo PARTISOL- 2025 PLUS Air Sampler US EPA Reference Designated

PM_{2.5} Method RFDS-0498-118, ubicado en la universidad de Pamplona en el municipio de Villa del Rosario en las coordenadas 7° 50' 2" N, 72° 28' 27" O, en la autopista internacional que comunica a la ciudad de Cúcuta (Colombia) con la fronteriza ciudad de San Antonio (Venezuela), ya que por este sector hay un gran flujo de vehículos de transporte público, particular y vehículos de carga pesada que funcionan con gasolina y diesel. Los muestreos de PM_{2.5} se realizaron con filtros Pallflex de micro cuarzo de 47 mm, en el mes de Agosto de 2013, en muestreos por 24 horas cada tres días, el volumen de aire muestreado fue de 24 m³, los filtros se guardaron en bolsas plásticas con cierre hermético y se mantuvieron a una temperatura de 4°C.

Tratamiento químico de los filtros

Extracción por ultrasonido

La extracción de la materia orgánica de los filtros de PM_{2.5} se realizó por ultrasonido en un baño ultrasónico (Branson® 1510, modelo 1510R-MT) usando como solvente el diclorometano. Los filtros provenientes del muestreo del PM_{2.5} se colocaron en un vaso de precipitado con 20 mL de diclorometano durante 15 minutos a temperatura ambiente; seguidamente se hicieron nueve repeticiones con el mismo volumen y tiempo.

Concentración de la materia orgánica

Una vez obtenido el extracto, se concentró en un evaporador rotatorio de vacío, marca Heidolph® modelo Laborota 400-1, a una temperatura de 40°C a 150 rpm; hasta alcanzar un volumen aproximado de 10 mL, para obtener el extracto global. Posteriormente el extracto global se transfirió a viales, se sellaron y se mantuvieron en refrigeración y en la oscuridad hasta su análisis. El fraccionamiento de la materia orgánica presente en el extracto global, se hizo por medio de cromatografía de columna empaquetada con sílica gel (CPG), activada a 200 °C por 8 días. Al extracto global se agregaron 10 mL de N-hexano y se adicionó a la columna.

La columna fue eluida sucesivamente con 200 mL de N-hexano para obtener la fracción 1 (F1); 200 mL con la mezcla: N-hexano-diclorometano (3:1 v/v) para obtener la fracción 2 (F2); 200 mL con diclorometano para obtener la fracción 3 (F3). Cada fracción se llevó hasta sequedad, se determinó su peso seco y luego se diluyó en 10 mL de diclorometano, 5 mL se destinaron para los análisis cromatográficos y los otros 5 mL para los ensayos genotóxicos.

DetECCIÓN DEL DAÑO EN EL ADN

Para detectar ruptura del ADN se utilizó el ensayo "Cometa" en microgel de una célula. Se siguió la metodología propuesta por Singh.²²

Esta metodología consta de los siguientes pasos: Se tomaron 200 μ L de suspensión de células, se incubaron con 50 mL de la concentración de PM a ensayar. Luego se tomaron 10 mL y se mezclaron con 75 mL de agarosa de bajo punto de fusión (LMA) al 0.5 % (p/v), esta suspensión se pipeteo sobre portaobjetos previamente impregnados con agarosa de punto de fusión normal y se cubre con cubreobjetos.

Los portaobjetos se conservan a 3°C por 6 min para favorecer la polimerización de (LMA), se retiró la laminilla y se agregaron 100 mL más de (LMA), se vuelve a conservar otros 6 min. Luego los portaobjetos se sumergieron en solución de lisis fresca. Se dejó en nevera a 4°C mínimo durante 1 hora.

Después de la lisis, los portaobjetos son lavados y colocados en una cámara de electroforesis horizontal con tampón alcalino de electroforesis (pH 13) durante 30 min, luego se realizó la electroforesis a 25 V, 300 mA durante 30 min.

Los portaobjetos se colorearon con bromuro de etidio y se observaron en el microscopio de fluorescencia olympus U-RFKT50[®] con un aumento de 400X. Se contaron 50 células por placa. La ocurrencia de daño en el ADN se basó en la longitud de la cola del cometa, inducida por la ruptura del ADN.

Se determinó que el daño basal fue de 41 μ m que es la longitud total producida por el control. Las células usadas fueron linfocitos humanos de sangre periférica, que fueron obtenidas de un voluntario joven (25 años), a saber saludable, no fumador, sin ningún tipo de tratamiento clínico.

Para medir reproducibilidad de los resultados se hicieron cuatro experimentos por cada tratamiento y en cada uno se contaron 100 células. Como control positivo se utilizó el peróxido de hidrógeno 25mM y como control negativo dimetil sulfóxido (DMSO 2% (p/v)), que es el disolvente de las muestras.

Las concentraciones de las dosis que se trabajaron en el ensayo cometa fueron: (D_1 ; 12.5, D_2 ; 25, D_3 ; 50 μ g). Se realizaron tres ensayos, cada uno por duplicado, (F_{1D1} , F_{1D2} , F_{1D3} , C^+ y C^-), (F_{2D1} , F_{2D2} , F_{2D3} , C^+ y C^-), (F_{3D1} , F_{3D2} , F_{3D3} , C^+ y C^-).

Para la cuantificación de daño se mide la longitud de la cola del cometa utilizando el software Comet Assay. En el ensayo cometa se considera que existe un daño en el ADN si el valor del daño de las células tratadas, supera dos o más veces el daño mostrado en las células no tratadas.

Análisis estadístico

Se determinó la homogeneidad de varianzas usando la prueba de Levene. Con los datos paramétricos, se aplicó el análisis de varianza (ANOVA). Y con los que no eran paramétricos se utilizaron las pruebas de Mann-Whitney y Wilcoxon.

Se utilizó la prueba de Dunnett para determinar el nivel de significancia entre el tratamiento y control, así como la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Los valores se expresaron como la media ($X \pm DS$) y las pruebas se consideraron significativas ($p \leq 0.05$).

Análisis cromatográfico

Obtenidos los 5 mL del extracto global y las fracciones F_1 , F_2 y F_3 , se le realizó a cada una de las muestras un proceso de secado utilizando

sulfato de sodio anhidro y posteriormente se inyectaron al cromatógrafo de gases HP 6890.

Identificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP): Contaminantes prioritarios

Para identificar los contaminantes prioritarios (CP-HAP) presentes en el PM_{2.5} del aire de Villa del Rosario (extracto global y las fracciones), se utilizó un equipo de Cromatografía de Gases marca Agilent Technologies 6890A Plus Series II Hewlett-Packard Plus con detector FID (Flame Ionization Detector®). La columna utilizada es Restek Rx-17 Sil MS, 30m de longitud, 0.25mm de diámetro, 0.25µm de diámetro interno (silarylene similar a 50% phenyl/50% dimethyl polysiloxane).

Para la identificación de los HAP se utilizó el patrón de 18 hidrocarburos de Restek (catalogo # 31841 EPA Method 8310 PAH Mixture).

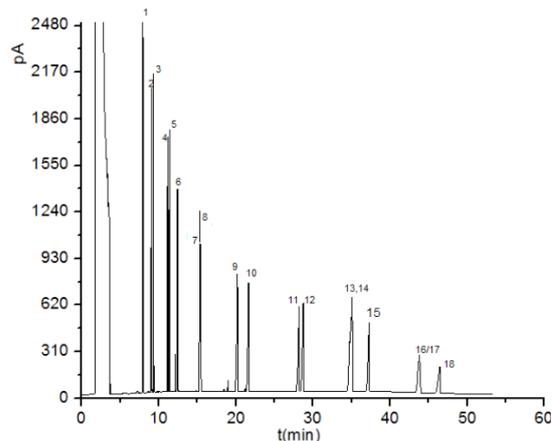
La identificación cualitativa de los HAP presentes en el extracto global se realizó de acuerdo a las siguientes condiciones: Temperatura del inyector 250 °C, detector FID a 320°C. Mezcla (mL/min): Aire 400 - H₂ 30 -N₂ 45. Se inyectó 1 µl, modo splitless .Condiciones del horno: Temperatura inicial 65°C por 0.5 min y se incrementa de la siguiente manera: 15°C/min hasta 200°C, 4°C/min hasta 330°C durante 15°C/min. Tiempo de análisis por muestra 53.33 min. Gas de arrastre Helio, flujo 20 mL/min.

Resultados y discusión

Identificación de contaminantes prioritarios (CP-HAPs) por cromatografía de gases/FID

Para la identificación de los diferentes CP-HAPs presentes en el extracto global del PM_{2.5} de Villa del Rosario, se tomó como referencia el cromatógrama de la muestra patrón de 18 hidrocarburos aromáticos policíclicos (EPA Method® 8310 PAH Mix.), que se muestra en el gráfico 1.

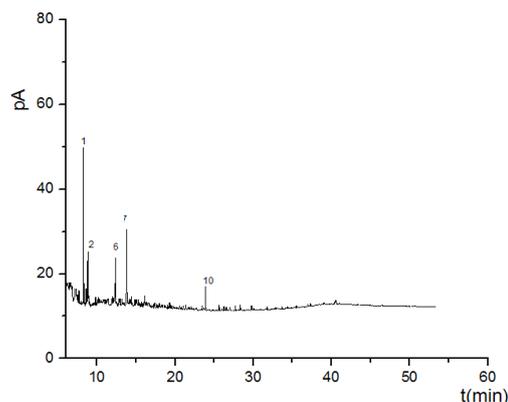
Gráfico 1. Cromatograma del patrón estándar de los 18 HAP (Restek EPA method 8310 PAH Mix



- | | |
|----------------------|-----------------------------|
| 1.- Naftaleno | 10.- Pireno |
| 2.- 1-Metilnaftaleno | 11.- Benzo(a)antraceno |
| 3.- 2-Metilnaftaleno | 12.- Criseno |
| 4.- Acenaftileno | 13.- Benzo(b)fluoranteno |
| 5.- Acenafteno | 14.- Benzo(k)fluoranteno |
| 6.- Fluoreno | 15.- Benzo(a)pireno |
| 7.- Fenantreno | 16.- Indeno(1,2,3-cd)pireno |
| 8.- Antraceno | 17.- Dibenzo(a,h)antraceno |
| 9.- Fluoranteno | 18.- Benzo(ghi)perileno |

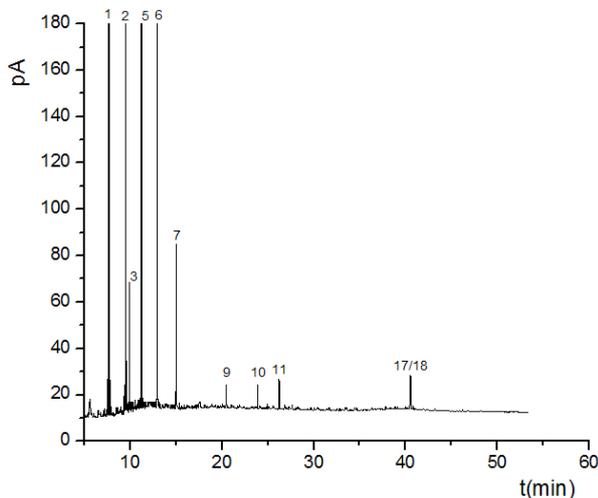
En el gráfico 2 se muestran los CP-HAPs encontrados en el extracto global de la materia orgánica del aire de Villa del Rosario. Como se observa en este cromatograma, los CP-HAPs presentes en el extracto global de la materia orgánica de las muestras de PM_{2.5} del aire de Villa del Rosario son: 1.-Naftaleno; 2.-1-Metilnaftaleno; 6.-Fluoreno; 7.-Fenantreno; 10.-Pireno.

Gráfico 2. Cromatograma de los contaminantes prioritarios identificados en el extracto global del PM_{2.5} del aire de Villa del Rosario



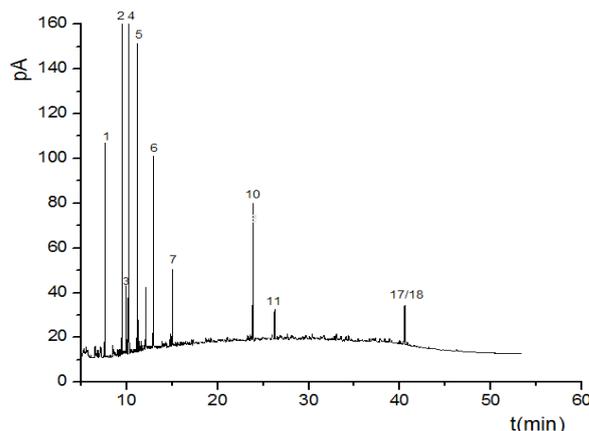
En el gráfico 3 se muestran los contaminantes prioritarios encontrados en la fracción 1 del PM_{2.5} del aire de Villa del Rosario. Como se observa en este cromatograma los CP presentes en la fracción 1 de la muestra global del aire de Villa del Rosario son: 1.-Naftaleno; 2.-1-Metil naftaleno; 3.-2-Metil naftaleno; 5.-Acenafteno; 6.-Fluoreno; 7.-Fenantreno; 9.-Fluoranteno; 10.-Pireno; 11.-Benzo(a) antraceno; 17.-Dibenzo(a,h) antraceno; 18.-Benzo(g,h,i) perileno.

Gráfico 3. Contaminantes prioritarios encontrados en la fracción 1 del PM_{2.5}



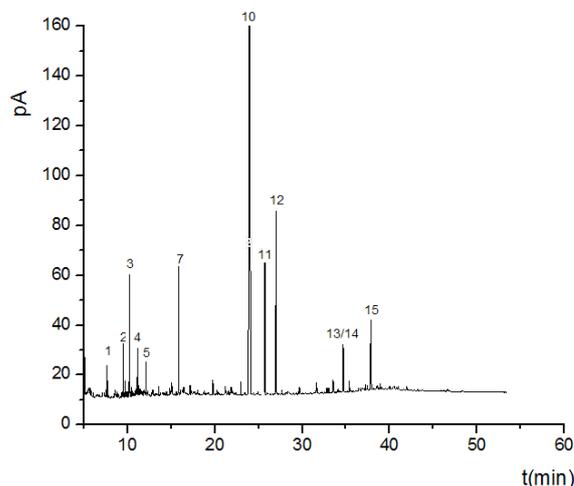
Los CP identificados en la fracción 2 (Gráfico 4) son: 1.-Naftaleno; 2.-1-Metil naftaleno; 3.-2-Metil naftaleno; 4.-Acenaftileno; 5.-Acenafteno; 6.-Fluoreno; 7.-Fenantreno; 10.-Pireno; 11.-Benzo(a) antraceno; 17.-Dibenzo(a,h) antraceno; 18.-Benzo(g,h,i)perileno.

Gráfico 4. Contaminantes prioritarios encontrados en la fracción 2 del PM_{2.5}



Como se observa en el gráfico 5 los CP presentes en la fracción 3 fueron: 1.-Naftaleno; 2.-1-Metil naftaleno; 3.-2-Metil naftaleno; 4.-Acenaftileno; 5.-Acenafteno; 7.-Fenantreno; 10.-Pireno; 11.-Benzo(a)antraceno; 12.-Criseno; 13.-Benzo(b) fluoranteno; 14.-Benzo(k) fluoranteno; 15.-Benzo(a)pireno.

Gráfico 5. Contaminantes prioritarios encontrados en la fracción 3 del PM_{2.5}



El interés en conocer los niveles ambientales de los HAPs, radica fundamentalmente, en las propiedades carcinógenas, mutagénicas

y teratogénicas que poseen algunos de estos compuestos, lo que los llevó a ser considerados como contaminantes prioritarios por la Agencia Norteamericana de Protección del Medioambiente y la IARC.^{5,23}

Los contaminantes prioritarios han sido clasificados según el poder cancerígeno así: el benzo(a)pireno como cancerígeno en humanos; el dibenzo (a,h) antraceno, dibenzo (a,l) pireno, clasificados como probables carcinógenos en humanos; el naftaleno, benzo (b,k,f) fluoranteno, criseno, benzo(a)antraceno, benzo(c)fenantreno, dibenzo[a,i] pireno, indeno[1,2,3-c,d]pireno, 5-metilcriseno fueron clasificados como posibles carcinógenos en humanos.²⁴

Los investigadores no han podido clasificar al fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno o al benzo (ghi) perileno, acenafteno, benzo[b] criseno, benzo[g] criseno, benzo[a] fluoranteno, benzo[g,h,i] fluoranteno, benzo[a] fluoreno, benzo[b] fluoreno, benzo[c] fluoreno, benzo[e] pireno, coroneno, benzo[g,h,i] perileno, dibenzo[a,c] antraceno, dibenzo[a,j] antraceno y se examinan como no clasificables.²⁵

La actividad cancerígena depende de la estructura de los HAPs, siendo más importante para moléculas de 4, 5, 6 o 7 anillos. Además, las estructuras angulares están relacionadas con una mayor actividad cancerígena frente a las que presentan una estructura lineal y más condensada.^{26,27}

Sobre la base de que existen suficientes evidencias de carcinogénesis en animales, el Programa Nacional de Toxicología Americano (NTP) anticipa que contaminantes como el benzo[a] antraceno, benzo[b] fluoranteno, benzo[j] fluoranteno, benzo[k] fluoranteno, benzo[a] pireno, dibenzo[a,h] antraceno, dibenzo[a,e] pireno, dibenzo[a,i] pireno, dibenzo[a,l] pireno, indeno[1,2,3-c,d] pireno y 5-metilcriseno, pueden ser considerados como carcinógenos en humanos.²⁸

La contaminación atmosférica es la vía primaria de la exposición humana a los HAP junto con la ingesta de alimentos contaminados. Es importante señalar que los HAPs en general, son sospechosos de ser carcinogénicos en un grado u otro, aunque el nivel sea muy bajo. La principal característica que presenta sobre la salud, es su capacidad para inducir la formación de cáncer en los organismos expuestos.

En algunos casos, esta actividad carcinogénica es particularmente elevada como la mostrada por el benzo[a]antraceno en animales y benzo[a]pireno en humanos.²⁹ La actividad carcinogénica se expresa a través de la biotransformación de estos compuestos a reactivos intermedios capaces de enlazarse covalentemente con el ADN e inducirlo a romper sus cadenas.³⁰ Estos intermedios son transformados rápidamente en carbo-cationes que actúan como buenos agentes alquilantes produciendo la mutagénesis de macromoléculas del tipo del ADN. De esta forma, el potencial mutágeno y carcinogénico de los HAPs depende de los metabolitos que produzcan.³¹

Los HAPs sufren degradaciones y diversas reacciones, como por ejemplo fotoquímicas, con otros contaminantes gaseosos dando lugar a HAPs sustituidos.³² Los hidrocarburos policíclicos aromáticos nitrados (NHAP's) son derivados de los HAPs, con dos o más anillos aromáticos fundidos formados por átomos de carbono, hidrógeno y nitrógeno. Los NPAH's se forman fundamentalmente como productos directos o indirectos de la combustión incompleta. El caso más representativo corresponde a los nitroisómeros más abundantes del pireno y del fluoranteno. Los gases de escape de motores diésel presentan altos niveles de 1-nitropireno y 3-nitrofluoranteno, siendo el 1-nitropireno el más abundante.³³

Los nitro-NHAP son particularmente interesantes debido a su genotoxicidad. Se ha demostrado que la principal causa de mutagenicidad del diésel y de las partículas del aire está asociada con estos

compuestos. Según la Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer, algunos son posiblemente carcinógenos para los humanos.²⁹

Los resultados obtenidos en este estudio, nos permiten deducir que el fraccionamiento de la materia orgánica del PM_{2.5}, es importante en la determinación de los contaminantes prioritarios, ya que permite identificar compuestos que no se detectan en el extracto global; en nuestro caso se identificó el benzo (a) pireno, criseno, benzo(b,k) fluorantenos, benzo (a) antraceno, y la mezcla dibenzo(a,h) antraceno / benzo (g,h,i) perileno no encontrados en el extracto global. En la tabla 1 se muestran los CP-HAPs encontrados en el aire de Villa del Rosario, extraídos con el diclorometano, tanto en el extracto global como en cada una de las tres fracciones. Los HAPs producidos por la combustión de combustibles orgánicos son considerados como mutágenos.³⁴ El naftaleno es considerado como cancerígeno.²⁴

Tabla 1. Contaminantes prioritarios encontrados en muestras del PM_{2.5}

Compuesto	Extr. global	F1	F2	F3
Naftaleno	X	X	X	X
1-Metilnaftaleno	X	X	X	X
2-Metilnaftaleno	ND	X	X	X
Acenaftileno	ND	ND	X	X
Acenafteno	ND	X	X	X
Fluoreno	X	X	X	ND
Fenantreno	X	X	X	X
Fluoranteno	ND	X	ND	ND
Pireno	X	X	X	X
Benzo(a)antraceno	ND	X	X	X
Criseno	ND	ND	ND	X
Benzo(b)fluoranteno	ND	ND	ND	X
Benzo(k)fluoranteno	ND	ND	ND	X
Benzo(a)pireno	ND	ND	ND	X
Dibenzo(a,h)antraceno	ND	X	X	ND
Benzo(ghi)perileno	ND	X	X	ND

X: presencia
ND: no detectados

El fenantreno hallado en el aire de Villa del Rosario es característico de las emisiones del tráfico vehicular.³⁵ La mezcla de benzo(b,k) fluoranteno, hallada en el aire del área estudiada está estrechamente relacionada con el diesel y los vehículos de motor de gasolina.¹ El benzo [g,h,i] perileno es un indicador de HAPs emitidos por los escapes de los motores diesel y de gasolina.³⁶ El tráfico automotor es probable que sea la principal fuente de CP-HAPs en la ciudad de Villa del Rosario, apreciación corroborada por estudios.^{37,38} Es necesario mencionar que los contaminantes prioritarios hallados en las muestras del aire (PM_{2.5}), provienen exclusivamente de la combustión de las fuentes móviles que circulan con diesel y gasolina.³⁹

Determinación del daño del ADN por el ensayo cometa

En el gráfico 6 se observa el daño en el material genético producido por el extracto global con cada una de las dosis. Los datos mostrados corresponden al promedio de tres ensayos realizados por duplicado. El daño fue evaluado como la longitud de la cola del cometa. La longitud es dada en micrómetros. Como control positivo se utilizó H₂O₂ 25mM y como control negativo DMSO 2%.*: Diferencia significativa respecto al control negativo, P<0.05.

Gráfico 6. Daño en el material genético observado en el extracto global

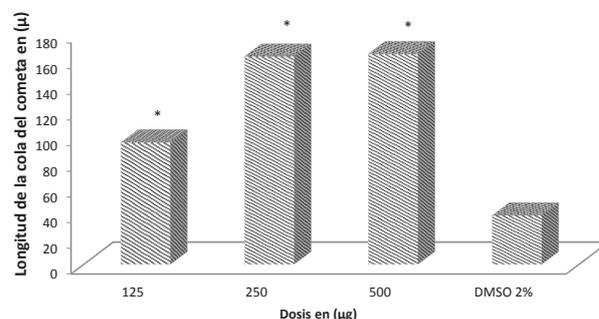
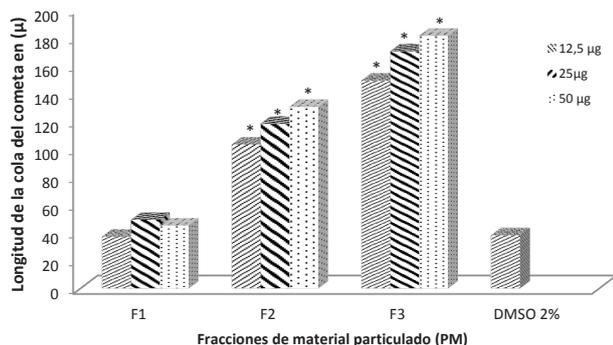


Gráfico 7. Daño en el material genético inducido por fracciones de PM. F₁: PM eluido con n-hexano, F₂ PM eluido con n-hexano/DCM (3:1) (v/v) y F₃: PM eluido con DCM)



* Diferencia significativa respecto al control negativo, $P < 0.05$.

Los datos mostrados corresponden al promedio de tres ensayos realizados por duplicado. El daño fue evaluado como la longitud de la cola del cometa. La longitud está dada en micrómetros. Como control positivo se utilizó H_2O_2 25mM y como control negativo DMSO 2%.

En el gráfico 7 se observa el daño en el material genético encontrado en las tres fracciones de CP en función de las dosis; en las dosis 2 y 3 es en donde se observa un daño mayor en el ADN, esto podría estar relacionado con la presencia de los CP (HAP) encontrados en cada fracción.

Al analizar la dosis 1 para cada una de las fracciones se observa que existe un daño mayor en la fracción 3 en donde se halló el benzo(a) pireno contaminante prioritario considerado carcinógeno en humanos. Como se puede observar, existe daño en el ADN inducido por cada una de las fracciones de HAPs estudiadas en función de cada una de las dosis, lo cual nos indica que muy posiblemente ese daño sea debido a la presencia de HAPs, dado que se corrobora su presencia a través de análisis cromatográficos.

Este resultado indica que existe un riesgo en la población expuesta, teniendo en cuenta que existe una correlación entre el incremento del daño en el ADN y cáncer en humanos.

Conclusiones

Los CP-HAPs encontrados en el aire de Villa del Rosario y clasificados por la IARC como carcinógenos son: benzo(a) pireno, naftaleno, benzo(a) antraceno, criseno, benzo(b) fluoranteno, benzo(k)fluoranteno y dibenzo(a,h) antraceno, contaminantes altamente peligrosos por presentar actividad mutagénica y genotóxica.

Se encontró evidencia de la asociación entre la calidad del aire del municipio de Villa del Rosario y la exposición a sustancias contaminantes producidas por la combustión de las fuentes móviles que circulan por el municipio, que se reflejan en los índices de genotoxicidad encontrados en el $PM_{2.5}$ de Villa del Rosario.

Los ensayos realizados para determinar la genotoxicidad de las fracciones mostraron que estas, ocasionan un daño en el material genético. Es probable que este daño sea ocasionado por los HAPs encontrados en cada una de las fracciones de la materia orgánica extraída.

Con estos estudios estamos motivando a las autoridades colombianas en especial a los Ministerios del Medio Ambiente y del Transporte a que presten más atención a los gases emitidos durante la combustión vehicular en especial del diésel que es el que emite el $PM_{2.5}$.

Referencias

1. Carreras Hebe A, Calderón-Segura ME, Gómez-Arroyo S, Murillo-Tovar MA, Amador-Muñoz O. Composition and mutagenicity of PAHs associated with urban airborne particles in Córdoba, Argentina. *Environmental Pollution*. 2013; 178:403-410.
2. Ostro BD, Broadwin R, Lipsett MJ. Coarse and fine particles and daily mortality in the Coachella Valley, California: a follow-up study. *Journal of Exposure*

- Analysis and Environmental Epidemiology. 2000; 10:412-419
3. Boffetta P, Nyberg F. Contribution of environmental factors to cancer risk. *British Medical Bulletin*. 2003; 68:71-94
 4. Cohen A J, Ross Anderson H, Ostra B, Pandey KD, Krzyzanowski M, Künzli N et al. The global burden of disease due to outdoor air pollution. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 2005; Part A 68:1-7.
 5. U.S. EPA. Air quality criteria for particulate matter. Washington:2004
 6. Massoud R, Shihadeh AL, Roumié M, Youness M, Gerard J, Saliba N, et al. Intraurban variability of PM10 and PM2.5 in an Eastern Mediterranean city. *Atmos. Res*. 2011; 101: 893-901
 7. Xu L, Chen X, Chen J, Zhang F, He C, Zhao J et al. Seasonal variations and chemical compositions of PM_{2.5} aerosol in the urban area of Fuzhou, China. *Atmos. Res*. 2012; 104-105: 264-272.
 8. Chen YC, Lee WJ, Uang SN, Lee SH, Tsai PJ. Characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) emissions from a UH-1H helicopter engine and its impact on the ambient environment. *Atmos. Environ*. 2006; 40:7589-7597.
 9. Xinhui Bi, Bernd RTS, Sheng Guoying, Ma Shexia, Jiamo Fu. Composition and major sources of organic compounds in urban aerosols. *Atmos. Res*. 2008; 88:256-265.
 10. Tsai PJ, Shih TS, Chen HL, Lee WJ, Lai CH, Liou SH. Assessing and predicting the exposures of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their carcinogenic potencies from vehicle engine exhausts to highway toll station workers. *Atmos. Environ*. 2004; 38:333-343.
 11. Dimashki M, Fadel A, Baba S, AlNouri M, Assad N. Measurements of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), heavy metals, and gaseous pollutants in polluted airsheds over some Syrian cities. *Proceedings of the Arab school of science & technology workshop on ambient air quality, Kuwait*. 2007
 12. Orecchio S, Papuzza V. Levels, fingerprint and daily intake of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in bread baked using wood as fuel. *J. Hazard. Mater*. 2009; 164:876-883.
 13. Lim MCH, Ayoko GA, Morawska L, Ristovski ZD, Jayaratne ER. Influence of fuel composition on polycyclic aromatic hydrocarbon emissions from a fleet of in-service passenger cars. *Atmos. Environ*. 2007; 41:50-160.
 14. Belpomme D, Irigaray P, Hardell L, Clapp R, Montagniere L, Epstein S, et al. The multitude and diversity of environmental carcinogens. *Environ Res*. 2007;105:414-29.
 15. Douglas MJ, Watkins SJ, Gorman DR, Higgins M. Are cars the new tobacco? *J. Public Health (Oxf)*. 2011; 33:160-169.
 16. Manoli E, Kouras A, Samara C. Profile analysis of ambient and source emitted particle-bound polycyclic aromatic hydrocarbons from three sites in northern Greece. *Chemosphere*. 2004; 56:867-878
 17. Hanedar A, Alp K, Kaynak B, Baek J, Avsar E, Odman MT. Concentrations and sources of PAHs at three stations in Istanbul, Turkey. *Atmos. Res*. 2011; 99:391-399.
 18. Fang GC, Chang CN, Wu YS, Fu PPC, Yang IL, Chen MH. Characterization identification of ambient air and road dust polycyclic aromatic hydrocarbons in central Taiwan, Taichung. *Sci. Total Environ*. 2004; 327:135-146.
 19. Culotta L, Gianguzza A, Orecchio S. Leaves of nerium oleander L. as bioaccumulators of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the air of Palermo (Italy). *Extraction. GC-MS analysis, distribution, sources, Polycyclic Aromat. Compd*. 2005; 25:327-344.
 20. Lu H, Chen S. Pollution level, phase distribution and health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in indoor air at public places of Hangzhou, China. *Environ. Pollut*. 2008; 152: 569-575.
 21. Slezakova K, Castro D, Delerue-Matos C, Alvim-Ferraz MC, Morais S, Pereira MC. Air pollution from traffic emissions in Oporto, Portugal: Health and environmental implications. *Microchem. J*. 2011; 99:51-59
 22. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988;175(1):184-91.
 23. IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to human: Air pollution, Part 1, vol 92, Some Non-Heterocyclic PAHs and related industrial exposures. 2008.
 24. IARC. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene, IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk. Hum. 2002; 82:367.
 25. Poster DL, Schantz MM, Sander LC, Wise SA. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental samples: a critical review of gas

- chromatographic (GC) methods. *Anal. Bioanal. Chem.* 2006; 386:859–881.
26. Umbuzeiro GA, Franco A, Martins MH, Kummrow F, Carvalho L, Schmeiser HH et al. Mutagenicity and DNA adduct formation of PAH, nitro-PAH, and oxy-PAH fractions of atmospheric particulate matter from Sao Paulo, Brazil. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 2008; 652:72-80.
 27. Dong TTT, Lee BK. Characteristics, toxicity, and source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in road dust of Ulsan, Korea. *Chemosphere.* 2009; 74:1245-1253.
 28. RoC. National toxicology program (NTP): Report on carcinogens. U. S. Department of health and human services, public health service. National toxicology program (NTP). 2009.
 29. Hayakawa K. Atmospheric pollution and its countermeasure in east Asia from the viewpoint of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Health Science.* 2009; 55: 870- 878.
 30. Ravindra K, Bencs L, Wauters E, de Hoog J, Deutsch F, Roekens E, Bleux N et al. Seasonal and site-specific variation in vapour and aerosol phase PAHs over Flanders (Belgium) and their relation with anthropogenic activities. *Atmospheric Environment.* 2006; 40 (4):771-785.
 31. Koss G, Tesseraux I. *Toxicology.* San Diego: Academic Press; 1999: 603-44.
 32. Zhang Y, Yang B, Gan J, Liu C, Shu X, Shu J. Nitration of particle-associated PAHs and their derivatives (nitro-, oxy-, and hydroxy-PAHs) with NO₃ radicals. *Atmospheric Environment.* 2011; 45:2515-2521.
 33. Tan JH, Bi XH, Duan JC, Rahn KA, Sheng GY, Fu JM. Seasonal variation of particulate polycyclic aromatic hydrocarbons associated with PM10 in Guangzhou, China. *Atmos. Res.* 2006; 80(4):250–262.
 34. International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Occupational exposures in petroleum refining; crude oil and major petroleum fuels. Lyon: Iarc Press. 1989;45
 35. Smith DJT, Harrison RM. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Atmospheric Particles, in: R.M. Harrison, R. Van Grieken (Eds.), *Atmospheric Particles,* John Wiley & Sons, New York, 1998.
 36. Kuo CY, Cheng TW, Chen CY, Lee H. Correlation between the amounts of polycyclic aromatic hydrocarbons and mutagenicity of airborne particulate samples from Taichung City, Taiwan. *Environ. Res.* 1998; 78:43-49.
 37. Amador-Muñoz O, Villalobos-Pietrini R, Agapito-Nadales MC, Munive-Colín Z, Hernández-Mena L, Sánchez-Sandoval M. Solvent extracted organic matter and polycyclic aromatic hydrocarbons distributed in size-segregated airborne particles in a zone of México City: seasonal behavior and human exposure. *Atmospheric Environment.* 2010; 44:122-130.
 38. Olcese LE, Toselli BM. Some aspects of air pollution in Córdoba, Argentina. *Atmos. Env.* 2002; 36:299-306.
 39. Mi HH, Lee WJ, Tsai PJ, Chen CB. A comparison on the emission of polycyclic aromatic hydrocarbons and their corresponding carcinogenic potencies from a vehicle engine using leaded and lead-free gasoline. *Environ. Heal. Perspect.* 2001; 109 (12):1285–1290.