



## GENOTOXICITY IN AIR-AIR COLOMBIA CÚCUTA SAMPLES OF PM2.5

### GENOTOXICIDAD EN EL AIRE DE AIRE DE CÚCUTA-COLOMBIA EN MUESTRAS DEL PM2.5

*Monica Juliana Quijano Vargas<sup>1</sup>, Alfonso Quijano Parra,<sup>1</sup> Ivan Melendez Gelvez<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Monica Juliana Quijano Vargas, Esp Bioquímica. Investigadora Grupo de Investigación en Química. Universidad de Pamplona. Colombia*

*<sup>1</sup>Alfonso Quijano Parra, Ph.D. Química. Director Grupo de Investigación en Química. Universidad de Pamplona. Colombia*

*<sup>2</sup>Ivan Melendez Gelvez. Ph.D. Biología. Director Grupo de Investigación Biomogen. Universidad de Pamplona. Colombia*

#### Abstract

Air pollutants have been and still are the main factors that contribute to chronic diseases such as asthma and cardiovascular disease. Air pollution by particulate matter (PM) is a global problem and in recent years, the PM has become an important research topic since it has a significant negative impact on human health. This work aims to identify the HAPS present in the air PM2.5 Cucuta and evaluate the health risk by testing genotoxic known as Comet assay. The work included the identification of several Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) considered priorities and recognized for their effects on health of the population, by gas chromatography with FID detector, associated with fine particles PM 2.5 collected at an urban site of Cúcuta -Colombia, influenced by vehicular traffic emissions. For extraction of the PAHs in the air Cúcuta was employed a solvent DCM. PAHs found in the city of Cucuta are: Methyl chrysene, benzo [a] anthracene, benzo [j] fluoranthene, Benzo [b] fluoranthene, Benzo [a] pyrene, dibenzo [a, l] pyrene, dibenzo [a, e ] pyrene, Benzo [c] fluorene, Benzo [k] fluoranthene, indeno [1,2,3-cd] pyrene, dibenzo [a, h] anthracene and benzo [g, hi] perylene.

Genotoxic effects of organic matter PM2.5 particulate matter extracted with a mixture of dichloromethane-ethanol-toluene were evaluated by comet assay

Keywords:





PM<sub>2.5</sub>, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Benzo (a) pyrene, gas chromatography, comet assay.

## Resumen

Los contaminantes del aire han sido y siguen siendo, los principales factores que contribuyen a las enfermedades crónicas como el asma y enfermedades cardiovasculares. La contaminación del aire por material particulado (PM) es un problema mundial y en los últimos años, el PM se ha convertido en un tema importante de investigación ya que tiene un impacto negativo significativo en la salud humana. Este trabajo tiene como objetivo identificar los HAPS presentes en el PM<sub>2.5</sub> del aire de Cúcuta y evaluar el riesgo para la salud mediante el ensayo genotóxico conocido como ensayo Cometa. El trabajo desarrollado incluyó la identificación de varios Hidrocarburos Aromáticos policíclicos (HAPs) considerados como prioritarios y reconocidos por su afectación a la salud de la población, mediante cromatografía de gases con detector FID, asociados con partículas finas PM<sub>2.5</sub> recogidas en un sitio urbano de Cúcuta-Colombia, influenciado por las emisiones del tráfico vehicular. Para realizar la extracción de los HAPs presentes en el aire de Cúcuta se empleó como solvente el Diclorometano. Los HAPs encontrados en la ciudad de Cúcuta son: Metil criseno, Benzo[a]antraceno, Benzo[j]fluoranteno, Benzo[b] fluoranteno, Benzo[a] Pireno, Dibenzo [a,l] pireno, Dibenzo[a,e] pireno, Benzo[c] fluoreno, Benzo[k]fluoranteno, Indeno[1,2,3-cd] pireno, Dibenzo[a,h] antraceno y Benzo[g,h,i]perileno.

Los efectos genotóxicos de la materia orgánica del material particulado PM<sub>2.5</sub> extraído con Diclorometano fueron evaluados mediante el ensayo cometa.

## Palabras Clave:

PM<sub>2.5</sub>, Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, Benzo(a)pireno, Cromatografía de gases, ensayo cometa.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los impactos en la salud y medioambientales del transporte vehicular es hoy en día uno de los temas más discutidos (Beelen et al, 2008). Por consiguiente, diversos contaminantes atmosféricos (EEA, 2008), como los óxidos de nitrógeno, material particulado (PM<sub>10</sub> y PM<sub>2.5</sub>) (fino y ultrafino) y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son emitidos a la atmósfera causando

disminución significativa de la calidad del aire.

La contaminación del aire por material particulado (PM), se considera un serio problema ambiental debido a la presencia en la Atmósfera de materiales peligrosos tales como metales traza tóxicos (Shah et al, 2006) que aumentan las lesiones cardiopulmonares en los seres humanos

El material particulado fracción respirable conocido como PM<sub>10</sub> y PM<sub>2.5</sub>, tiene la capacidad de penetrar





y depositarse en las regiones traqueo-bronquial y alveolar del tracto respiratorio (Vinitketkumnun et al, 2002).

Los Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son moléculas orgánicas compuestas por dos o más anillos aromáticos fusionados, su producción se ve favorecida por una combustión con deficiencia de oxígeno, temperaturas entre los 650-900 °C y combustibles que no están altamente oxidados provenientes de incendios forestales, emisiones volcánicas, quema de combustibles fósiles, desechos industriales (Boonyatumanond et al, 2007; Orecchio, & Papuzza, 2009) 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. Algunos autores han demostrado que los escapes de los motores de los vehículos son probablemente la fuente más importante de HAPs actualmente detectada (Fang et al, 2004). Los procesos de combustión se han señalado como una de las fuentes más importantes de HAPs a la atmósfera (Manoli et al, 2005). Una vez producidos, los HAPs se pueden dispersar ampliamente a través de el medio ambiente en el aire, en el agua y pueden acumularse en los suelos (Maliszewska-Kordybach & Terelak, 2000). En el aire los HAPs se distribuyen entre las fases vapor y partículas. Sin embargo, varios estudios han demostrado (Liu et al, 2001); que los HAPs especialmente dañinos con 5-6 anillos aromáticos se encuentran predominantemente en las partículas (PM), en su mayoría debido a su alto peso molecular y

baja volatilidad. Los HAPs pueden crear toxicidad en organismos, al interferir con la función de la membrana celular y los sistemas de acoplamiento de enzimas, los metabolitos de HAPs se pueden unir al ADN que causa interrupciones bioquímicas y daño celular a los organismos (Kap-Soon et al, 2004). Muchos de los HAPs individuales son citotóxicos, mutagénicos, y potencialmente carcinógenos para los seres humanos (WHO, 1998).

Uno de los HAPs considerado como contaminante prioritario el benzo [a] pireno es clasificado por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) como carcinógeno para los humanos (IARC, 2010, mientras que otros HAPs se consideran probables y posibles carcinógenos humanos (IARC, 2010, 2002). El Benzo [a] pireno es probablemente el HAP carcinógeno más conocido y en muchos estudios de estimación de riesgos de cáncer humano, se utiliza a menudo como un sustituto de otros HAP cancerígenos. Incluso la normativa europea actual para el aire ambiente (Directiva 2004/10/CE [15] utiliza al benzo [a] pireno como indicador de partículas HAP cancerígenos.

Teniendo en cuenta el transporte vehicular entre las más relevantes fuentes de emisiones, este trabajo tiene como objetivo identificar los HAPs presentes en el PM<sub>2.5</sub> del aire de Cúcuta y evaluar el riesgo para la salud mediante el ensayo genotóxico conocido como ensayo Cometa.

El trabajo incluyó la identificación de varios HAPs considerados como prioritarios, mediante cromatografía de gases con detector FID, asociados





con partículas finas  $PM_{2.5}$  recogidas en un sitio urbano de Cúcuta-Colombia, influenciado por las emisiones del tráfico vehicular.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1.-Muestreo

EL monitoreo del  $PM_{2.5}$  se realizó con un equipo Partisol- Plus Model 2025-Air sampler. U.S.EPA. Reference designated  $PM_{2.5}$  Method RFPS 0498-118 in accordance with 40CFR Part 53 de la Ruprecht-Patashnick. Se utilizaron filtros de Teflón de 47 mm de diámetro, con un tamaño de poro de 2 micras.

### 2.-2.-Sitio de muestreo

Se realizó el monitoreo de la fracción respirable  $PM_{2.5}$  en Cúcuta-Norte de Santander ubicada en la cordillera Oriental de los Andes, con coordenadas geográficas  $7^{\circ}54'$  de latitud norte y  $72^{\circ}30'$  al oeste de Greenwich, a una altitud de 320 msnm; en el Cread de la Universidad de Pamplona en la diagonal Santander.

Las muestras ambientales obtenidas con el muestreador Partisol 2025 Plus en muestreos de 24 horas, cada tres días se realizaron durante el período comprendido entre Julio-Diciembre del 2011. Se seleccionó este sitio de muestreo de la fracción respirable  $PM_{2.5}$  por sus características particulares, ya que está ubicado en un sector residencial y en una vía que presenta un alto flujo vehicular., generando un mayor riesgo en la salud humana por la exposición a contaminantes, en especial en la

población más vulnerable. En este sector no existen industrias contaminantes y la única fuente de contaminación atmosférica son los vehículos que circulan por este sitio. Por consiguiente el análisis fisicoquímico de los filtros nos dará una idea de la magnitud de la contaminación ambiental producida básicamente por la combustión vehicular.

### 2.3.-Extracción de la Materia Orgánica de los filtros de $PM_{2.5}$ de Cúcuta

La materia orgánica de los filtros de  $PM_{2.5}$  (HAPs) se extrae por ultrasonido en un baño ultrasónico (Branson 1510, modelo 1510R-MT); se utiliza como solvente de extracción el sistema compuesto por diclorometano-etanol-tolueno. Los filtros de  $PM_{2.5}$  provenientes del monitoreo diario se colocan en un vaso de precipitado con 20 ml del solvente por un periodo de 10 minutos a una temperatura de  $23^{\circ}C$ - $24^{\circ}C$  esta extracción se repite diez veces.- Un procedimiento común para el análisis de los HAPs consiste en la extracción seguido por el análisis instrumental, como la cromatografía de gases o la cromatografía líquida.

### 2.4.-Concentración de la materia orgánica

Una vez obtenido el extracto orgánico, se lo concentra mediante una destilación hasta aproximadamente 15 ml (extracto global). Posteriormente el extracto global se transfirió a tres viales cada uno de 5ml, para la determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) por Cromatografía de Gases, para el fraccionamiento mediante





columna de separación de Silicagel y para los ensayos mutagénicos.

Las muestras de HAPs se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , con el fin de eliminar el agua residual y preparar la muestra para el análisis cromatográfico. Se guardaron en frasco ámbar, manteniéndolas refrigeradas a 4 °C.

### **2.5-Fraccionamiento del extracto global de la materia orgánica del PM 2.5**

Se utiliza para el fraccionamiento del extracto global una columna de Silicagel. La Silica tuvo un tratamiento térmico de ocho días a 170<sup>0</sup> C y durante dos días de 110 °C. Se coloca en una columna 10 gramos de Silica, se agregan los 5 ml del extracto global al que se han adicionado 10 ml de Hexano. Posteriormente a esta columna se agregan 200 ml de diclorometano, obteniéndose la fracción 1; obtenida esta fracción se agregan 200 ml de una mezcla Diclorometano-Hexano obteniéndose la fracción 2, posteriormente a la columna se agregan 200 ml de Hexano obteniéndose la fracción 3 y por último se agregan 450 ml de metanol obteniéndose la fracción 4.

### **2.6.-Identificación de Hidrocarburos Aromáticos Poli cíclicos (HAPs)**

Para identificar los Hidrocarburos Aromáticos Poli cíclicos (HAPs) presentes en el PM<sub>2.5</sub> del aire de Cúcuta (extracto global y las fracciones), se utilizó un equipo de Cromatografía de Gases marca Agilent Technologies 6890A Plus Series II Hewlet-Packard Plus con detector FID (Flame Ionization Detector). La columna utilizada es

Restek Rxi-17 Sil MS, 30m de longitud, 0.25mm de diámetro, 0.25 $\mu$ m de diámetro interno (silarylene similar a 50% phenyl/50% dimethyl polysiloxane). Para la identificación de los HAPs se utilizó el patrón de 16 hidrocarburos de Restek (catalogo # 31841 EPA Method 8310 PAH Mixture). La identificación cualitativa de los HAPs presentes en el extracto global se realizó de acuerdo a las siguientes condiciones: detector FID a 320°C Mezcla (mL/min): Aire 400 – H<sub>2</sub> 30 – N<sub>2</sub> 45. Se inyectó 1  $\mu$ l, modo splitless a 320°C. 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. Temperatura del inyector 250 °C.

## **3. DETECCIÓN DEL DAÑO EN EL ADN**

### **3.1. Ensayo cometa**

El ensayo cometa es una técnica altamente sensible para evaluar el daño y la reparación del ADN en cualquier tipo de célula eucariota. Este, en su versión alcalina, permite detectar roturas de simple cadena y sitios sensibles al álcali que se originan durante la reparación dando lugar a la formación de la cola del cometa. En general el principio básico del ensayo, es la migración del ADN en una matriz de agarosa bajo condiciones de electroforesis. Luego, al ser observada la célula al microscopio, presenta la apariencia de un cometa, con una cabeza (región nuclear) y cola (formada por fragmentos nucleares que han migrado en dirección del ánodo) por lo que este ensayo es también





conocido como ensayo Cometa, debido al patrón de migración del ADN que se produce en las células dañadas.

### **Extracción de linfocitos**

Se toman 5 ml de sangre total fresca de una persona sana y se mezcla suavemente con 5 ml de PBS. En otro tubo diferente se adicionan 3 mL de Histopaque y 9 mL de sangre, se centrifuga durante 30 min a 2.300 rpm y se recoge la capa intermedia que es donde están los linfocitos

### **Tratamiento**

A 200  $\mu$ l de células, se adiciona 50  $\mu$ l del tratamiento o control (dosis:  $D_1= 50 \mu\text{g}$ ;  $D_2= 100 \mu\text{g}$ ;  $D_3= 200 \mu\text{g}$ ). Para el control positivo se utilizó  $\text{H}_2\text{O}_2$  25mM y para el control negativo PBS. Posteriormente se incuban estas dosis y controles durante 1h a 37°C. Se toma 75  $\mu$ l agarosa de punto de fusión normal (LMA) y se mezcla con 10  $\mu$ l de células tratadas. Seguidamente la mezcla anterior se adiciona a la lamina base e inmediatamente se coloca el cubre objeto y se lleva a incubación durante 6 min a 4°C. Después de cumplidos los 6 min a 4°C, se retira el cubre objeto y se adicionan otros 75  $\mu$ l de agarosa, se incuba durante 6 min a 4°C. Terminado este tiempo se quita el cubre objeto y se incuba durante 1h a 4°C en solución de trabajo de lisis. A continuación se lavan las placas con PBS y se colocan en una cámara de electroforesis (que contiene solución de trabajo de buffer de electroforesis) durante 30 minutos sin conectar a la fuente. Posteriormente se conecta la cámara durante 30 minutos a 300 Amperios. Culminado el tiempo se procede a retirar de la cámara las placas; las cuales se lavan con solución

neutralizante. Se dejan secar e inmediatamente se adiciona 30  $\mu$ l de bromuro de etidio y se cubre con un cubre objetos para la lectura de las células. Luego se observa en el microscopio de fluorescencia Olympus U-RFKT50 con el objetivo de 25X y se mide la migración del ADN de 200 células; contando con la reglilla hacia la derecha a partir del núcleo de la célula.

**Análisis estadístico.** Se determinó homogeneidad de varianzas usando la prueba de Levene. Si el comportamiento de los datos es paramétrico, se aplica Análisis de varianza (ANOVA). Si los datos son no paramétricos se utilizan 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 expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar ( $X \pm DS$ ) y las pruebas se consideraron significativas con una  $p \leq 0.05$ .

## **4. RESULTADOS Y DISCUSION**

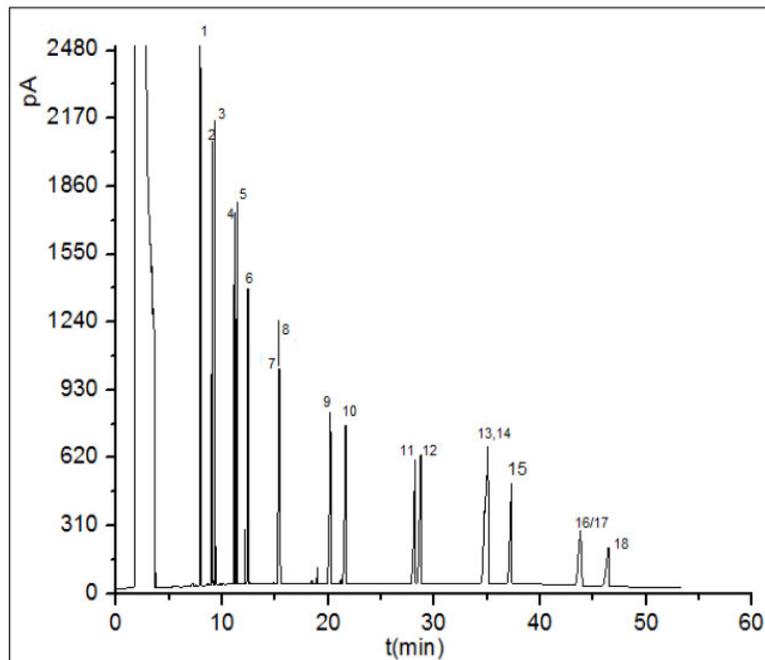
### **4.1.-Identificación de hidrocarburos aromáticos polícíclicos (HAPs) por Cromatografía de Gases/FID con la columna Restek RXI 17 Sil MX**

Para la identificación de los diferentes HAPs presentes en el extracto global del  $\text{PM}_{2.5}$  de Cúcuta, se tomó como referencia el cromatograma de la muestra patrón de 18 Hidrocarburos aromáticos policíclicos (EPA Method 8310 PAH Mix.), en este caso el cromatograma





que se muestra en la figura 1 se obtuvo con la columna RESTEK Rxi®-17Sil MS.



**Figura 1.** Cromatograma del patrón estándar de los 18 HAPs (Restek EPA method 8310 PAH Mix)

En la tabla 1 se listan los compuestos presentes en la muestra patrón EPA Method 8310 PAH Mix.

**Tabla N° 1** Hidrocarburos Aromáticos Poli cíclicos presentes en la muestra patrón EPA

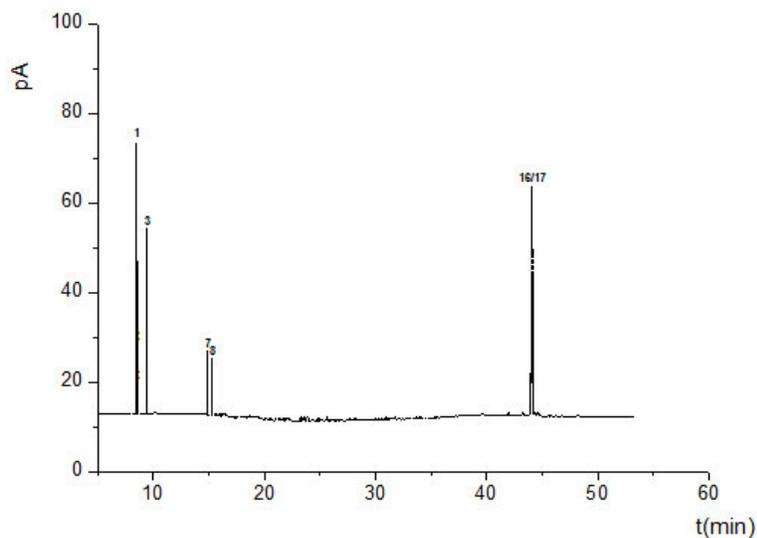
Nº	Abreviatura	Nombre
1	NAP	Naftaleno
2	1MNAP	1-Metilnaftaleno
3	2MNAP	2-Metilnaftaleno
4	ACY	Acenaftileno
5	ACE	Acenafteno
6	FLU	Fluoreno
7	PHE	Fenantreno
8	ANT	Antraceno
9	FLA	Fluoranteno
10	PYR	Pireno
11	B(A)A	Benzo(a)antraceno
12	CRI	Criseno
13	B(B)F	Benzo(b)fluoranteno
14	B(K)F	Benzo(k)fluoranteno
15	B(A)P	Benzo(a)pireno
16	IND	Indeno(1,2,3-cd)pireno
17	D(AH)A	Dibenzo(a,h)antraceno
18	B(GHI)P	Benzo(ghi)perileno





*Method 8310 PAH Mix.*

En la figura 2 se muestran los HAPs encontrados en la muestra global de la materia orgánica del aire de Cúcuta.



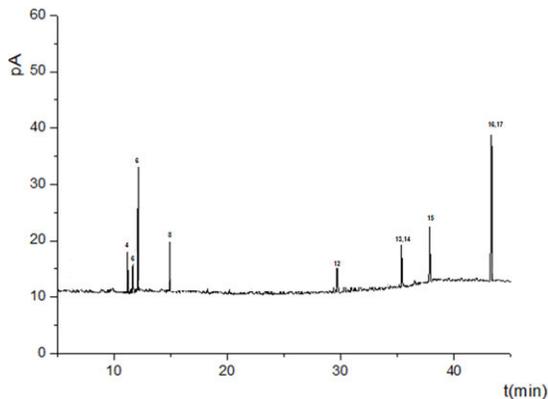
**Figura 2.** Hidrocarburos Aromáticos Poli cíclicos (HAPs) extraídos con el sistema Diclorometano-Etanol-Tolueno del  $PM_{2.5}$  del aire de Cúcuta (extracto global)

Como se observa en esta figura los HAPs presentes en el extracto global de la materia orgánica de las muestras de  $PM_{2.5}$  del aire de Cúcuta son:

1.-Naftaleno ;3.-2-Metil naftaleno;7.- Fenantreno;8.-Antraceno;16.- Indeno(1,2,3 c-d) pireno; 17.-Dibenzo (a,h) antraceno

En la figura 3 se muestran los HAPs encontrados en la fracción 1 del  $PM_{2.5}$  del aire de Cúcuta



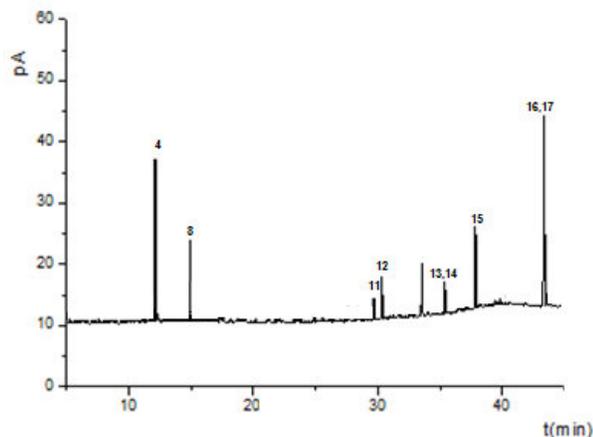


**Figura 3** HAPs encontrados en la fracción 1 del PM<sub>2.5</sub> del aire de Cúcuta

Como se observa en esta figura los HAPs presentes en la fracción 1 de la muestra global del aire de Cúcuta son:

4.-Acenaftileno ;8.-Antraceno ;11.- Benzo(a)antraceno ;12.-Criseno ;13.- Benzo(b)fluoranteno ;14.- Benzo(k)fluoranteno ;15.-Benzo(a)pireno ;16.-Indeno(1,2,3 -cd)pireno ;17.- Dibenzo(a,h)antraceno

En la figura 4 se muestran los HAPs encontrados en la fracción 2 del PM<sub>2.5</sub> del aire de Cúcuta

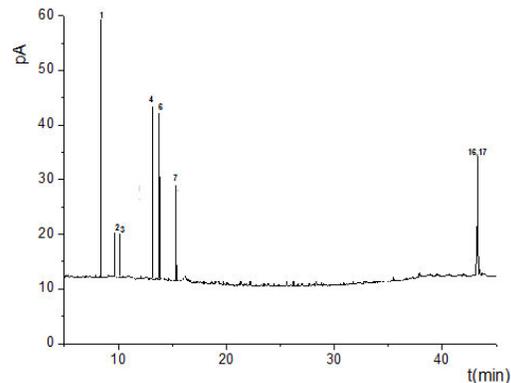


**Figura 4** HAPs encontrados en la fracción 2 del PM<sub>2.5</sub> del aire de Cúcuta

Como se observa en esta figura los HAPs presentes en la fracción 2 de la muestra global del aire de Cúcuta son:

4.-Acenaftileno ;5.-Acenafteno ;6.- Fluoreno ;8.-Antraceno ;12.-Criseno ;13.- Benzo(b)fluoranteno ;14.- Benzo(k)fluoranteno ;15.-Benzo(a)pireno ;16.-Indeno(1,2,3 -cd)pireno ;17.- Dibenzo(a,h)antraceno

En la figura 5 se muestran los HAPs encontrados en la fracción 3 del PM<sub>2.5</sub> del aire de Cúcuta

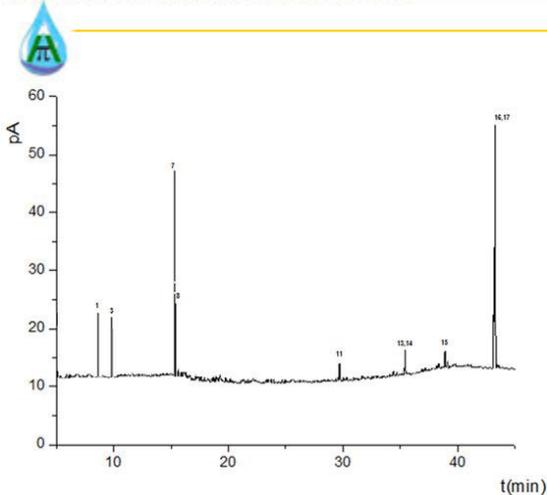


**Figura 5** HAPs encontrados en la fracción 3 del PM<sub>2.5</sub> del aire de Cúcuta

Como se observa en esta figura los HAPs presentes en la fracción 3 de la muestra global del aire de Cúcuta son:

1.-Naftaleno ;3.-2-Metilnaftaleno ;7.- Fenantreno ;8.-Antraceno ;11.- Benzo(a)antraceno ;13.- Benzo(b)fluoranteno ;14.- Benzo(k)fluoranteno ;15.- Benzo(a)pireno ;16.-Indeno(1,2,3 -cd)pireno ;17.-Dibenzo(a,h)antraceno

En la figura 6 se muestran los HAPs encontrados en la fracción 4 del PM<sub>2.5</sub> del aire de Cúcuta



**Figura 6** HAPs encontrados en la fracción 4 del PM<sub>2.5</sub> del aire de Cúcuta

Como se observa en este cromatograma los HAPs presentes en la fracción 4 de la muestra global del aire de Cúcuta son:

1.-Naftaleno ;2.-1-Metilnaftaleno ;3.-2-Metilnaftaleno ;4.-Acenaftileno ;6.-Fluoreno ;7.-Fenantreno ;16.-Indeno(1,2,3 -cd) pireno ;17.-Dibenzo(a,h) antraceno

En la tabla No 2 se muestran los HAPs encontrados en el aire de Cúcuta, extraídos con el sistema: Diclorometano-Etanol-Tolueno, tanto en el extracto global como en cada una de las cuatro fracciones

El dibenzo([a,h] antraceno, fue el primer HAPs en demostrar tener capacidad carcinogénica. El benzo[a]pireno se considera altamente carcinógeno.

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA)

identificó los HAPs más frecuentes y los clasificó como “los 16 HAPs prioritarios según la EPA”

Según este listado encontramos que el Benzo(a)pireno está clasificado en el grupo 1 como carcinógeno para

humanos; el Benzo(b)fluoranteno, Benzo(k)fluoranteno, Benzo(a)antraceno, Indeno[1,2,3-cd]pireno se clasifican en el grupo 2B como posiblemente carcinogénico para humanos ;el Dibenzo[a,h]antraceno se clasifica en el grupo 2 A como probablemente carcinogénico para humanos; el Benzo[g,h,i]perileno se clasifica en el grupo 3 como no clasificable como carcinogénico para Humanos, este último HAP se considera un indicador de HAP emitidos por los escapes de los motores de diesel y de gasolina.

Es de anotar que estos HAPs provienen exclusivamente de la combustión de las fuentes móviles que circulan con diesel y gasolina.

Los resultados de los metales [47] e Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) encontrados en el PM<sub>2.5</sub> del aire de Cúcuta son razonables, porque los orígenes de estos son principalmente emitidos de los tubos de escape del tráfico vehicular que es la principal fuente de PM<sub>2.5</sub> en esta ciudad y concuerdan con un estudio realizado [48] en una zona de influencia netamente vehicular.

#### 4.3.- DETERMINACIÓN DEL DAÑO DEL ADN POR ENSAYO COMETA

Las concentraciones de las dosis que se trabajaron en el ensayo cometa fueron: (D<sub>1</sub>;12.5, D<sub>2</sub>; 25, D<sub>3</sub>; 50 µg).

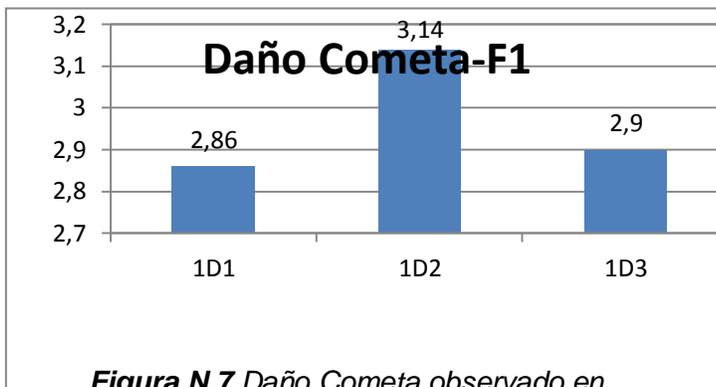
Se realizaron tres ensayos, cada uno por duplicado, (F<sub>1D1</sub>, F<sub>1D2</sub>, F<sub>1D3</sub>, C<sup>+</sup> y C<sup>-</sup>), (F<sub>2D1</sub>, F<sub>2D2</sub>, F<sub>2D3</sub>, C<sup>+</sup> y C<sup>-</sup>), (F<sub>3D1</sub>, F<sub>3D2</sub>, F<sub>3D3</sub>, C<sup>+</sup> y C<sup>-</sup>).

En estos ensayos cometas se observaron 200 células individuales (linfocitos) por cada dosis, con la



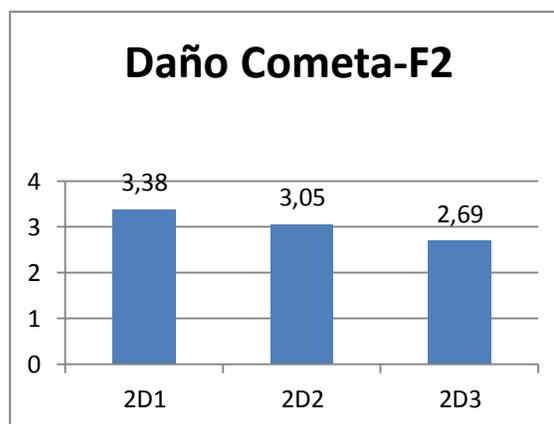
finalidad de evaluar la fragmentación del ADN ocasionada por la exposición a contaminantes genotóxicos. Para llegar a ello, básicamente se tuvieron en cuenta los siguientes pasos: se obtuvieron las células (sangre total), posteriormente se fijaron con agarosa en un portaobjetos, las cuales fueron sometidas a una solución de lisis con la finalidad de romper su membrana celular, y además, se utilizó una solución amortiguadora para desenrollar el ADN, por la interrupción de los enlaces por puentes de hidrógeno entre las dobles cadenas del ADN, el paso a seguir, fue someter al ADN desenrollado a una electroforesis en tampón alcalino, en el cual los fragmentos negativamente cargados de ADN (ADN dañado) migran fuera del núcleo en dirección al ánodo para formar un halo, apreciándose el daño, el cual es representado por un aumento de fragmentos del ADN que migran fuera de las células del núcleo bajo una forma característica similar a la cola de un cometa; estos fragmentos son generados por rompimientos del ADN; esto se puede observar por medio de un microscópico de fluorescencia; finalmente se utiliza un software para tabular estos datos y determinar el daño al material genético

En la figura 7 se observa el daño del ADN sufrido en la fracción 1 con cada una de las dosis



**Figura N.7** Daño Cometa observado en la fracción 1 en las tres dosis estudiadas

En la figura 8 se observa el del ADN daño sufrido en la fracción 2 con cada una de las dosis



**Figura N.8** Daño Cometa observado en la fracción 2 en las tres dosis

Como se observa en estas tres figuras, en las dosis 2 y 3 es en donde se observa un daño mayor en el ADN, aunque en la F1D1 el mayor daño se observa en la dosis 1, esto podría estar relacionado con la presencia de los HAPs encontrados en cada fracción.

Como se observa en estas graficas el daño en el ADN en cada una de las fracciones de HAPs estudiadas en función de cada una de las dosis, muestra que el daño al material genético se considera entre moderado y alto, lo que nos indica



que la presencia de HAPs en el material particulado PM<sub>2.5</sub> del aire de Cúcuta puede ocasionar efectos genotóxicos.

Este resultado nos 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.

## 5. CONCLUSION

Los HAPs encontrados en el aire de Cúcuta y clasificados por la IARC como carcinógenos son: Benzo(a) antraceno, Criseno, Benzo(b)fluoranteno, Benzo(k)fluoranteno, Benzo(a)pireno, Indeno (c,d 1,2,3)pireno y Dibenzo(a,h) antraceno y son contaminantes altamente peligrosos por presentar actividad mutagenica y genotóxica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Beelen, R., Hoek, G., Van Den Brandt, P.A., Goldbohm, R.A., Fischer, P., Schouten, L.J., Armstrong, B., Brunekreef, B., 2008. Long-term exposure to traffic related air pollution and lung cancer risk. *Epidemiology* 19, 702–710.

Díaz O., Rafael, Vega S., Julio C. (2013). Efecto de la variación de la carga orgánica en el desempeño de un reactor uasb (upflow anaerobic sludge blanket) tratando efluentes de una planta extractora de aceite de palma. *Revista Ambiental Agua, Aire y Suelo*. ISSN 1900-9178, 4 (1). pp: 23-32.

Environmental European Agency (EEA), 2008. Annual European Community LRTAP Convention Emission Inventory Report 1990–2006),

Shah MH, Shaheen N, Jaffar M, Khalique A, Tariq SR, Manzoor S. Spatial variations in selected metal contents and particle size distribution in an urban and rural atmosphere of Islamabad, Pakistan. *Journal of Environmental Management*. 2006;78:128–137

Vinitketkumnuen U, Kalayanamitra K, Chewonarin T, Kamens R. Particulate matter, PM<sub>10</sub> & PM<sub>2.5</sub> levels, and airborne mutagenicity in Chiang Mai, Thailand. *Mutat. Res.* 2002;519:121–131

R. Boonyatumanond, M. Murakami, G. Wayyatakorn, A. Togo, H. Takada, Sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in street dust in a tropical Asian mega-city, Bangkok, Thailand, *Sci. Total Environ.* 384 (2007) 420–432.

S. Orecchio, V. Papuzza, Levels, fingerprint and daily intake of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in bread baked using wood as fuel, *J. Hazard. Mater.* 164 (2009) 876–83.

Ramón, Jarol D. (2013). Determinación de compuestos orgánicos volátiles biogénicos en una atmosfera rural (parque natural de Valderejo). *Revista Ambiental Agua, Aire y Suelo*. ISSN 1900-9178, 4 (1). pp: 1 – 12.

G.C. Fang, C.N. Chang, Y.S. Wu, P.P.C. Fu, I.L. Yang, M.H. Chen, Characterization, identification of





ambient air and road dust polycyclic aromatic hydrocarbons in central Taiwan, Taichung, Sci. Total Environ. 327 (2004) 135–146.

Quijano P., Alfonso., Quijano V., Mónica J., Gélvez, Iván. (2013). Influencia de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPS) y metales en la calidad del aire de pamplona y sus efectos genotoxicos. Revista Ambiental Agua, Aire y Suelo. ISSN 1900-9178, 4 (2). pp: 23 – 34.

E. Manoli, A. Kouras, C. Samara, Profile analysis of ambient and source emitted particle-bound polycyclic aromatic hydrocarbons from three sites in northern Greece, Chemosphere 56 (2004) 867–878.

B. Maliszewska-Kordybach, H. Terelak, Monitoring agricultural soils in Poland contamination with PAHs as related to heavy metals content, in: W. Harder, F. Arendt (Eds.), Contaminated Soil, Thomas Telford Publishing, Great Britain, 2000, pp. 1493–1494.

Liu, Y., Zhu, L., Shen, X., 2001. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in indoor and outdoor air of Hangzhou, China. Environ. Sci. Technol. 35, 840–844.





N. Kap-Soon, L. Do-Youn, J.H. Cha, W.A. Joo, E. Lee, K. Chan-Wha, Protein biomarkers in the plasma of workers occupationally exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons, *Proteomics* 4 (2004) 3505–3513.

World Health Organization (WHO), 1998. Environmental Health Criteria 202: Selected Non–Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. World Health Organization Publication, Geneva. accessed 19.09.2011, available from <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc202.htm#SectionNumber:1.3>.

International Agency for Research on Cancer (IARC), 2010. Some nonheterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 92, p. 773.

International Agency for Research on Cancer (IARC), 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 82, p. 367.

Ping,L.,& Panuwat,H.2006."Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on lime spray dryer (LSD) ash using different extraction methods". *Chemosphere*.vol62,pp 265-274

