

UNIVERSIDAD DE CUENCA



Facultad de Ciencias Químicas

Maestría en Toxicología Industrial y Ambiental

“Caracterización de metales pesados níquel, plomo, hierro y zinc en el material particulado 2,5 del aire de la ciudad de Cuenca y su efecto tóxico sobre células ováricas de hámster chino CHO-K1”

Trabajo de titulación previo a la obtención
del título de magister en Toxicología Industrial y Ambiental.

Autora: Bqf. Mónica Alexandra Narváez Vera

C.I. 0104715297

Directora: Ing. Ana Lucía Astudillo Alemán Msc.

C.I. 0103681557

Cuenca-Ecuador

2019



RESUMEN

La contaminación ambiental por material particulado 2,5 es una de las causas que favorecen al desarrollo de enfermedades crónicas como el asma, rinitis alérgicas, cáncer de pulmón. El $PM_{2,5}$ tiene fundamental importancia por ser la fracción respirable, el mismo que al ser inhalado ingresa al tracto respiratorio, va por la tráquea, los pulmones y finalmente alcanza los sacos alveolares. Por el alcance que tiene, fue primordial determinar la composición y concentración de las partículas que se introducen en el organismo, las mismas que se encuentran principalmente asociadas a la combustión de diésel de los automóviles. El objetivo de este trabajo fue evaluar el daño celular producido por los extractos acuosos del $PM_{2,5}$ recolectado en tres zonas del cantón Cuenca, sobre la línea ovárica de hámster chino CHO-K1. Las muestras fueron recolectadas utilizando filtros de Pallflex de microcuarzo de 47 mm, empleando un muestreador de bajo volumen Partisol con cabezal para $PM_{2,5}$. Además se realizó la caracterización química para determinar la presencia de metales pesados: hierro, plomo, níquel, zinc utilizando la técnica de ultrasonido, con agua desionizada y espectroscopía de absorción atómica, también se evaluó el daño celular que producen los extractos acuosos sobre las células, exponiéndolas a una concentración de $1,6 \text{ m}^3/\text{mL}$, utilizando el ensayo del Cometa, concluyendo que el $PM_{2,5}$ de los tres sitios de estudio de la ciudad de Cuenca tiene como parte de su composición zinc y hierro; además los puntos: Av. de las Américas sector Basílica ; Gaspar Sangurima y Luis Cordero presentan daño genotóxico.

PALABRAS CLAVES: Material particulado. $PM_{2,5}$. Genotoxicidad. Ensayo del cometa. Metales pesados.

**ABSTRACT**

Environmental pollution by particulate material 2.5 is one of the causes that make the development of chronic diseases such as asthma, allergic rhinitis, lung cancer among. The $PM_{2.5}$ is the most important because it is the respirable fraction, which when is inhaled enters to the respiratory tract, goes through the trachea, the lungs and finally reaches the alveolar sacs. Due to its scope, it is essential to determine the composition and concentration of the particles that enter the body. It is mainly associated with the combustion of diesel in automobiles. The objective of this work was to evaluate the cellular damage produced by the aqueous extracts of $PM_{2.5}$ collected in three areas of the canton of Cuenca, on the Chinese Hamster ovarian line (CHO-K1). Samples were collected using 47-mm Pallflex microcumber filters, using a low volume Partisol sampler with $PM_{2.5}$ head. In addition, the chemical characterization was carried out to determine the presence of heavy metals: iron, lead, nickel, zinc, by using the ultrasound technique, with deionized water and atomic absorption spectroscopy. The type of cell damage produced by the aqueous extracts was also evaluated. By, exposing them to a concentration of $1.6 \text{ m}^3/\text{mL}$, using the Cometa test. In conclusion, the particulate $PM_{2.5}$ material of the three studied sites of the city of Cuenca has zinc and iron as part of its composition. In addition, the points: Av. of the Américas sector Basilica, Gaspar Sangurima and Luis Cordero present genotoxic damage.

KEY WORDS: $PM_{2.5}$. Particulate matter. Genotoxicity. Comet assay. Heavy metals.



ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
ÍNDICE DE CONTENIDO	4
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	9
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA	11
AGRADECIMIENTO	13
DEDICATORIA	15
1. INTRODUCCIÓN	16
1.1. Hipótesis General	18
1.2. Objetivos	18
1.2.1. Objetivo General	18
1.2.2. Objetivo Específicos	18
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1. Contaminación Ambiental.....	19
2.2. Material Particulado.....	20
2.2.1. Material Particulado PM _{2,5}	22
2.3. Composición elemental del material particulado	23
2.4. Normativa Legal Vigente	24
2.5. Metales.....	25
2.5.1. Toxicidad de los metales	26
2.5.1.1. Hierro:	27
2.5.1.2. Plomo:	27
2.5.1.3. Níquel:	28
2.5.1.4. Zinc	28
2.6. Sistema respiratorio, generalidades	29
2.6.1. Mecanismos de depósito del material particulado en el sistema respiratorio.....	29
2.6.2. Distribución del material particulado en el aparato respiratorio	31
2.6.3. Mecanismos de depuración del material particulado del aparato respiratorio	32
2.7. Mecanismos de defensa del sistema respiratorio	33
2.8. ADN y Genotoxicidad	34
2.9. Actividad mutagénica y genotóxica en el PM _{2,5}	37
2.10. Interacción de los Metales pesados con el ADN	39
MÓNICA ALEXANDRA NARVÁEZ VERA	4



2.11.	Biomarcadores	40
2.12.	Ensayo cometa	41
2.13.	Estado del Arte	42
3.	METODOLOGÍA.....	45
3.1.	Estudio realizado	45
3.2.	Área de estudio	45
3.3.	Determinación de los puntos de monitoreo	45
3.4.	Diseño de estudio.....	47
3.4.1.	Recolección de las muestras	47
3.5.	Estabilización de filtros y corrección de las concentraciones de PM _{2,5}	49
3.6.	Determinación de las concentraciones de zinc, plomo, hierro, níquel en las muestras de PM _{2,5} del aire de la ciudad de Cuenca.	50
3.6.1.	Preparación de los extractos acuosolubles de PM _{2,5}	50
3.7.	Ensayo de Viabilidad Celular	51
3.7.1.	Modelo Biológico	51
3.7.2.	Condiciones del cultivo	52
3.7.3.	Controles	52
3.7.4.	Siembra y Cosecha	52
3.7.5.	Viabilidad mediante el ensayo de doble tinción de FDA-EtBr.....	53
3.7.6.	Ensayo cometa	53
3.8.	Análisis Estadístico	55
4.	RESULTADOS	56
4.1.	Concentración del material particulado 2,5 (PM _{2,5}).....	56
4.1.1.	Prueba de Kolmogorov-Smirnov, prueba de Kruskal-Wallis, prueba de Medianas.....	57
4.1.2.	Análisis de las concentraciones obtenidas en los tres puntos de monitoreo	58
4.2.	Caracterización del Material Particulado PM _{2,5}	59
4.3.	Evaluación del daño celular producido por las sustancias presentes en los extractos acuosos del PM _{2,5} sobre línea celular ovárica de hámster chino (CHO- K1)	60
4.3.1.	Viabilidad del extracto acuoso de material particulado 2,5 en la línea celular ovárica de hámster chino.....	60
4.3.2.	Ensayo de Cometa	62
4.3.2.1.	Análisis de la longitud de la cola del cometa (formada por fragmentos nucleares que han migrado en dirección del ánodo), obtenidas en el bioensayo.....	62
4.3.2.1.1.	Prueba de Kruskal-Wallis, Test de comparación múltiple de Dunn en valores obtenidos en la longitud de la cola	62
4.3.2.2.	Análisis del momento de la cola (producto del por ciento del ADN en el cometa, y la media entre la distancia de la cabeza y la cola) obtenidas en el bioensayo	64



4.3.2.2.1. Prueba de Kruskal-Wallis, test de comparación múltiple de Dunn en valores derivados del momento de la cola.....	65
4.3.2.3. Análisis de la intensidad de la cola (número de fragmentos) obtenidas en el bioensayo. 67	
4.3.2.3.1. Prueba de Kruskal-Wallis, test de comparación múltiple de Dunn de valores derivados de la intensidad de la cola.....	68
4.3.2.4. Daño Celular	70
4.3.2.4.1. Análisis del Índice de daño genotóxico con relación a la intensidad de la cola..	70
4.3.2.4.2. Análisis del Índice de daño genotóxico con relación a al largo de la cola el cometa 73	
4.4. Daño celular producido por sustancias presentes en extractos acuosos del PM _{2,5} y comparación con el efecto dañino producido por el extracto acuoso del PM ₁₀ en la ciudad de Cuenca.....	75
4.4.1. Prueba de Kruskal-Wallis, de valores derivados de la longitud de la cola, aplicando una dosis de 1,63 m ³ /mL del extracto acuoso del PM ₁₀ y PM _{2,5}	78
5. DISCUSIÓN.....	79
5.1. Análisis de las concentraciones obtenidas respecto a la normativa ecuatoriana	79
5.2. Composición Química del Material Particulado PM _{2,5}	81
5.3. Evaluación el tipo de daño celular producido por las sustancias presentes en los extractos acuosos del PM _{2,5} sobre la línea celular ovárico de hámster chino (CHO- K1).....	83
5.3.1. Análisis del largo de la cola del cometa (formada por fragmentos nucleares que han migrado en dirección del ánodo), obtenidas en el bioensayo	83
5.3.2. Análisis del momento de la cola obtenidas en el bioensayo.	84
5.3.3. Análisis de la intensidad de la cola obtenida en el bioensayo.	85
5.3.4. Daño Celular	85
5.4. Determinación el daño celular producido por las sustancias presentes en los extractos acuosos del PM _{2,5} y comparación con el efecto dañino producido por el extracto acuoso del PM ₁₀ presente en Cuenca.....	88
6. CONCLUSIONES	89
7. RECOMENDACIONES	91
8. BIBLIOGRAFÍA	92
9. ANEXOS	100
Anexo 1. Cronograma de monitoreo ambiental	100
Anexo 2. Registro de las concentraciones de Material Particulado PM ₁₀ y PM _{2,5} del área urbana de la ciudad de Cuenca.	101
Anexo 3. Concentraciones de Material Sedimentable en el área urbana de Cuenca (Del 17/05/2017 hasta el 18/06/2017).....	103
Anexo 4. Concentraciones de PM _{2,5}	104
Anexo 5. Análisis Químico del PM _{2,5}	106



Anexo 6: Imágenes del proceso de toma de muestra y preparación del extracto acuoso... 107
..... 110
Anexo 7: Imágenes del Ensayo Cometa 111



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos de depósito de las partículas en el árbol respiratorio	30
Figura 2: Distribución de las partículas en el aparato respiratorio dependiendo de su diámetro aerodinámico.....	32
Figura 3: Depuración alveolar de las partículas	33
Figura 4: Estructura del ADN y los puntos vulnerables al ataque en la biomolécula por especies químicas reactivas	35
Figura 5: Esquema de la reacción Fenton- Haber Weiss. Catálisis de ROS.	36
Figura 6. Mecanismos propuestos de carcinogénesis inducida por metales	40
Figura 7: Mapa de la ciudad de Cuenca con los puntos del monitoreo preliminar.	46
Figura 8: Flujograma del proceso.....	47
Figura 9: Equipo Partisol	48
Figura 10: Filtros estabilizándose.....	49
Figura 11: Obtención del extracto acuoso	50
Figura 12: Extracto acuoso.....	51
Figura 13: Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	57
Figura 14: Concentración de Material Particulado _{2,5} en los tres puntos de monitoreo. ..	59
Figura 15: Porcentaje de viabilidad en células ováricas de hamster chino CHO-K1 del ensayo a 1,63 m ³ /mL por un periodo de 24 horas.....	61
Figura 16: Daño en el ADN con respecto al valor de la media de la longitud de la cola del cometa de las células ováricas de hámster chino CHO-K, usando una concentración de 1,63 m ³ /mL.....	64
Figura 17: Momento del Cometa de las células ováricas de hámster chino CHO-K, usando una concentración de 1,63 m ³ /mL.....	67
Figura 18: Intensidad del cometa de las células ováricas de hámster chino CHO-K, usando una concentración de 1,63 m ³ /mL.....	70
Figura 19: Índice de daño genotóxico con respecto a la intensidad.....	72
Figura 20: Índice de daño con relación con la longitud de cola.....	75
Figura 21: Medias de la longitud de Cola en el ensayo cometa a una concentración 1,63m ³ /mL en los extractos acuosos del PM ₁₀ y PM _{2,5}	78



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Factores que influye en los mecanismos de depósito.....	31
Tabla 2: Mecanismos de defensa pulmonar	34
Tabla 3: Clasificación de los Hidrocarburos aromáticos.....	38
Tabla 4: Puntos de muestreo.....	46
Tabla 5: Análisis estadístico descriptivo de las tres zonas de estudio.....	56
Tabla 6: Prueba de normalidad Kolmogórov-Smirnov	57
Tabla 7: Resumen de la prueba de Medianas y Kruskal-Wallis para muestras independientes.	57
Tabla 8: Resumen de la prueba de U de Mann Whitney para muestras independientes.	58
Tabla 9: Metales pesados presentes en el Material Particulado 2,5 de los tres sitios de monitoreo.....	60
Tabla 10: Porcentaje de viabilidad en las células ováricas de hámster chino (CHO- K1)	61
Tabla 11: Análisis estadístico descriptivo del largo de la cola (μm).....	62
Tabla 12: Resumen de la prueba Kruskal-Wallis para muestras independientes.	63
Tabla 13: Test de comparación múltiple de Dunn de Longitud de la Cola	63
Tabla 14: Análisis estadístico descriptivo del momento de la cola (μm).....	65
Tabla 15: Resumen de la prueba Kruskal-Wallis para muestras independientes.....	65
Tabla 16: Test de comparación múltiple de Dunn del momento de cola (μm)	66
Tabla 17: Análisis estadístico descriptivo la intensidad de la cola (%).....	68
Tabla 18: Resumen de la prueba Kruskal-Wallis para muestras independientes.	68
Fuente	68
Tabla 19: Test de comparación múltiple de Dunn de intensidad de cola (%).....	69
Tabla 20: Índice de daño con relación a la intensidad de la cola del cometa.	71
Tabla 21: Resumen de contraste de hipótesis General del IDG intensidad de la cola del cometa.....	71
Tabla 22: Resumen de contrastes de hipótesis de IDG con relación a la intensidad, con respecto al control negativo.....	72
Tabla 23: Resumen de contraste de hipótesis General del IDG longitud de cola	73
Tabla 24: Resumen de contraste de hipótesis General del IDG largo de cola (UA).....	73
Tabla 25: Resumen de contrastes de hipótesis de IDG con respecto la longitud de la cola, con relación al control negativo.	74
Tabla 26: Metales presentes en el PM_{10} en tres sitios de Cuenca	75



Tabla 27: *Genotoxicidad (expresada en longitud de cola, μm) de tres experimentos en células epiteliales alveolares A549, expuestos a diferentes dosis de material particulado PM_{10} a la ciudad de Cuenca.* 77

Tabla 28 *Longitud de la cola del cometa en células ováricas de hámster chico CHO-K1 al aplicar una dosis de $1,63 \text{ m}^3/\text{mL}$ de los extractos acuosos de material particulado 2,5. ($\text{PM}_{2,5}$)*..... 77

Tabla 29: *Resumen de la prueba Kruskal-Wallis para muestras independientes* 78



ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ANOVA: Análisis de Varianza

CEA: Centro de Estudios Ambientales.

CESEMIN: Centro de Servicios y Análisis de Minerales Universidad de Cuenca.

CORPAIRE: Corporación Municipal de Mejoramiento de la calidad de Aire de Quito

EPA: Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos

FDA/EtBr: Diacetato de fluoresceína-Bromuro de Etidio

IARC: La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer

ID: Índice de Daño.

INSHT: El Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo

MP_{2,5}: Material Particulado 2,5

MPS: Material Particulado Sedimentable

OMS: Organización Mundial de la Salud

PM₁₀: Material Particulado 10

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

TULSMA: Texto unificado legislación secundaria, medio Ambiente,

UA: Unidades Arbitrarias

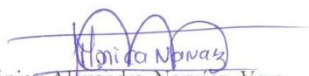


CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Mónica Alexandra Narváez Vera en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación *"Caracterización de metales pesados níquel, plomo, hierro y zinc en el material particulado 2,5 del aire de la ciudad de Cuenca y su efecto tóxico sobre células ováricas de hámster chino CHO-K1 "*, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, febrero del 2019


Mónica Alexandra Narváez Vera
C.I: 0104715297



CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Mónica Alexandra Narváez Vera, autora del trabajo de titulación "*Caracterización de metales pesados níquel, plomo, hierro y zinc en el material particulado 2,5 del aire de la ciudad de Cuenca y su efecto tóxico sobre células ováricas de hámster chino CHO-K1* ", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, febrero del 2019.


Mónica Alexandra Narváez Vera
C.I: 0104715297



AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por regalarme a mi familia que ha creído en mí siempre.

A mi esposo Marco Iván por su apoyo incondicional, por siempre estar conmigo, apoyándome en cada etapa de mi vida. A mi hija, Ivana Sofía por ser la luz de mis ojos y por apoyarme en esta etapa de crecimiento profesional, pese a su corta edad siempre me tuvo la paciencia para ayudarme a cumplir esta meta.

A mis padres, a mis hermanos por siempre estar pendientes de nosotros.

Una gratitud especial a mi directora, Ing. Ana Lucia Astudillo Alemán que en este proyecto me ha brindado su guía y amistad.

A la Dra. Nancy García un agradecimiento por permitirme formar parte de este proyecto de investigación.

También agradezco a todo el personal del C.E.A. por su ayuda y apoyo.

Al personal del laboratorio de Genotoxicidad de la UTPL muchas gracias por todo el apoyo brindado.

Y finalmente a todas las personas que de una u otra forma contribuyeron en el desarrollo de este proyecto de investigación.

Mónica Alexandra Narváez Vera



DEDICATORIA

El presente trabajo va dedicado primeramente a Dios por siempre estar presente en mi vida.

A mi esposo Marco Iván y a mi hija Ivana Sofía por ser el pilar fundamental en mi vida, por ser mi fortaleza y mi inspiración; por el amor, cariño, comprensión y apoyo que día a día me regalan.

A mis padres Miguel (+) y Filomena porque a ellos les debo lo que hoy soy.

Mónica Alexandra Narváez Vera



1. INTRODUCCIÓN

En la ciudad de Cuenca se han realizado investigaciones sobre la fracción respirable de material particulado 10 (PM₁₀) que evidencian concentraciones superiores a lo establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Los valores promedio de concentración de PM₁₀ registrados para los años 2008 y 2013 en la ciudad oscilaron entre 32,0 µg/m³ y 42,0 µg/m³ respectivamente (Espinoza y Molina., 2014).

De acuerdo a investigaciones realizadas por el Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca (CEA) existen sectores de la urbe como el centro histórico y el sur de la ciudad donde las concentraciones de PM₁₀ superan los límites estipulados en el Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria el Ministerio del Ambiente (TULSMA) (Astudillo, Orellana, Alvear, Arévalo, Valle, Moscoso., 2015).

Otra investigación realizada por García y Abad., 2015 concluye que las concentraciones de material particulado sedimentado obtenidas en tres puntos de monitoreo de la ciudad de Cuenca presenta concentraciones que varían entre 0,56 mg/cm²x30 días y 1,20 mg/cm²x 30 días.

Al existir publicaciones que demuestran que las concentraciones de material particulado sedimentable (MPS) y PM₁₀ superan las normativas establecidas por la OMS y el TULSMA se presumió que también el material particulado PM_{2,5} se encontraría fuera de los límites estipulados en las normativas antes mencionadas.

El material particulado es conocido por causar daños a la salud, en varios estudios se evidencia que la exposición a material particulado está asociada con enfermedades cardiovasculares, respiratorias, muertes prematuras (Hoek, Brunekreef, Goldbohm, Fischer y Brandt., 2002), trastornos neurodegenerativos (Shah et al., 2013) y cáncer de pulmón



(Goldberg et al., 2001). Además, se ha visto que a mayor tiempo de exposición a material particulado se induce a un incremento en la morbilidad y mortalidad del hombre (Schwartz, Dockery y Neas., 1996).

Las partículas se clasifican según su diámetro aerodinámico en: gruesas $\leq 10\mu\text{m}$, finas $\leq 2,5\mu\text{m}$ y ultrafinas $\leq 0,14\mu\text{m}$ (Bell, Samet y Dominici., 2004). Las partículas menores a $10\mu\text{m}$ (PM_{10}) principalmente básicas, son partículas líquidas o sólidas dispersas en la atmósfera y se deben a la combustión no controlada, esta fracción ingresa al tracto respiratorio, va por la tráquea, y finalmente alcanza los pulmones. Las partículas finas generalmente ácidas tienen un diámetro aerodinámico igual a $2,5\mu\text{m}$ las mismas que muestran mayor peligro al ser completamente respirables debido que pueden ingresar a los pulmones y depositarse en los sacos alveolares y durar mayor tiempo en ellos, acarreando con ellas sustancias de alta toxicidad (Samara y Voutsas., 2005).

A nivel local no existen investigaciones que aborden la toxicidad del material particulado $\text{PM}_{2,5}$; esta situación es preocupante dado que presenta genotoxicidad (Meléndez, Martínez y Quijano., 2012).

Con esta investigación se determinaron las concentraciones de $\text{PM}_{2,5}$ en tres sitios representativos de la ciudad de Cuenca y se evaluó su efecto tóxico sobre una línea celular. Complementariamente se determinaron las concentraciones de níquel, plomo, hierro y zinc en el $\text{PM}_{2,5}$ utilizando espectroscopia de absorción atómica, la evaluación del efecto toxicológico se realizó mediante el ensayo del cometa aplicando una concentración de $1,63\text{ m}^3/\text{mL}$ de $\text{PM}_{2,5}$ en una línea celular derivada del ovario de hámster chino (CHO-K1) el cual permitió identificar el daño celular que este provoca.



1.1. Hipótesis General

Los extractos acuosos del material particulado 2,5 presente en tres zonas de la ciudad de Cuenca producirían daños en una línea celular ovárica de hámster chino CHO-K1.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Evaluar el daño producido por los extractos acuosos del material particulado 2,5 de tres zonas diferentes de la ciudad Cuenca sobre la línea ovárica de hámster chino CHO-K1.

1.2.2. Objetivo Específicos

1. Determinar las concentraciones de $PM_{2,5}$ y comparar con los límites estipulados en la normativa nacional.
2. Determinar las concentraciones de zinc, plomo, hierro y níquel en las muestras de material particulado 2,5 y comparar con los límites establecidos en las diferentes normativas.
3. Evaluar el daño celular producido por las sustancias presentes en los extractos acuosos del $PM_{2,5}$ sobre una línea ovárica de hámster chino CHO-K1.
4. Determinar el daño celular producido por las sustancias presentes en los extractos acuosos del $PM_{2,5}$ y comparar con el efecto dañino producido por el extracto acuoso del PM_{10} presente en Cuenca.



2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Contaminación Ambiental

La contaminación ambiental está dentro de la problemática actual que afronta la sociedad. Los individuos diariamente se exponen a grandes rangos de mezclas ambientales complejas, entre ellas productos de fuentes industriales, mezclas del humo de cigarrillo, elementos tóxicos de los alimentos asados, restos de petróleo, emisiones vehiculares, entre otros (Zuluaga, Valencia y Ortiz., 2009).

Cualquier sustancia que agregada a la atmósfera cause un efecto considerado en los individuos o el medio se le puede llamar contaminante (Fonfría y Ribas., 1989).

Romero, Olite y Álvarez., 2006 afirman que la contaminación en el proceso de industrialización alcanzó una nueva dimensión. En Inglaterra desde el siglo XVI, se empezó con la utilización de la hulla como combustible, por la aparición de una crisis leñosa. Gracias a esta revolución industrial se dio un cambio en la economía y el ambiente, la contaminación del aire es producida por los requerimientos de energía en una tecnología basada en el hierro y acero.

Romero et al., 2006 afirman que la contaminación ambiental es la consecuencia en la que el ambiente es afectado o degradado.

Así mismo Toro, Ramírez, Quiceno y Zuluaga., 2001, enuncian que la disminución de la eficacia del aire se debe a la exposición de contaminantes de origen vehicular, lo cual afecta la constitución química de la atmósfera regional y local.

Según Melgarejo, Soria, Spielvogel, Orozco, Villanueva y Cajas., 2010, se han descrito más de 100 contaminantes en la atmósfera, entre estos existen un grupo de contaminantes críticos en función de los efectos en salud y el medio ambiente, como, por ejemplo: monóxido



de carbono (CO), el óxido de nitrógeno (NO), el ozono troposférico (O₃), el Dióxido de azufre (SO₂), material particulado (PM) y el plomo (Pb).

2.2. Material Particulado

El material particulado (PM) se refiere a una agrupación de partículas líquidas y sólidas exhibidas directas al aire (Fang et al., 2003) que puede ser producida por distintas fuentes de origen natural (polen, polvo, emisiones volcánicas) o antropogénico como lugares con poca ventilación, acciones industriales, movimiento de personas, el transporte vehicular, y el microclima (Molina et al., 2004; Querol et al., 2001).

Billet et al., 2007 enuncian que el material particulado consiste en agrupaciones de compuestos químicos, elementos biológicos, entre los cuales están los compuestos volátiles, metales, materiales de carbón, sales, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y endotoxinas.

Rodríguez., 2003 plantea que según el mecanismo de formación las partículas pueden ser primarias (que se encuentran en la atmósfera), partículas secundarias (formadas por reacciones químicas).

Según Suárez y Augusto., 2012 refieren que la EPA 2004 indica que el material particulado (PM) posee una extensa escala de propiedades físicas, termodinámicas, químicas y morfológicas (EPA, 2004).

Las características físicas (masa, tamaño y densidad) y características químicas (presencias de compuestos orgánicos, inorgánicos, metales y contaminantes primarios y secundarios) del material particulado son cruciales para establecer el tipo y dimensión de los efectos sobre la salud humana (Préndez, Corvalán y Cisternas., 2007).



Según la normativa Ecuatoriana el material particulado está compuesto por material líquido, sólido, en forma de partículas, a excepción del agua no combinada presente en la atmósfera. Al material particulado de diámetro aerodinámico menor a 2,5 se le llama PM_{2,5} y al material particulado de diámetro aerodinámico menor a 10 se le denomina PM₁₀ (TULSMA., 2003).

Según Bellt et al., 2004, las partículas se clasifican según su diámetro aerodinámico, forma y composición variada en: gruesas $\leq 10\mu\text{m}$, finas $\leq 2,5\mu\text{m}$ y ultrafinas $\leq 0,14\mu\text{m}$.

Las partículas en la atmósfera presentan un tamaño entre 0,001 y 50 μm (Morawska, Thomas, Jamriskja y Johnson., 1999).

Las partículas de diámetro menor o igual a 10 μm pueden penetrar el sistema respiratorio a diferentes profundidades, las partículas de diámetro 2,5 μm son 100 % respirables y las partículas de 0,5 μm penetran los mecanismos de defensa y llegan a los alvéolos pulmonares (Préndez y Ulriksen, 1993; Cohen y Hering., 1995).

Las partículas menores a 10 μm (PM₁₀), son partículas sólidas o líquidas dispersas en la atmósfera y se deben a la combustión no controlada. Las partículas finas tienen un diámetro aerodinámico igual a 2,5 μm , las mismas que muestran mayor peligro al ser completamente respirables debido que pueden ingresar a los pulmones y durar mayor tiempo en ellos, acarreando con ellas sustancias de alta toxicidad (Samara y Voutsas., 2005).

Ding, Ke, Wang, Dann y Austin., 2009 enuncian que las partículas gruesas (MPS, material particulado sedimentable) superiores de 10 μm se consideran de toxicidad menor debido a que se instalan principalmente en las cavidades nasales y orales.

El tiempo de permanencia de las partículas en la atmósfera también está determinado por el tamaño de las mismas, así las partículas menores a 2,5 μm pueden permanecer días o



semanas y se pueden transportar miles de kilómetros (Sosaky, Kurita, Carmichael, Chang y Muran., 1988). Mientras que las partículas mayores a 2,5 μm pueden permanecer minutos, horas y ser transportadas unos pocos centenares de kilómetros (Vana, Tamm y Vill., 1999).

La contaminación ambiental puede presentar efectos como la variación en la visibilidad, deterioro en los materiales, vegetación, problemas en la salud humana y en el bienestar (García, Pinzón y Cueto., 2005).

Determinar la composición química del material particulado, es muy importante tanto desde el punto vista química en la atmósfera como también sobre la calidad del aire que se respira en las diferentes ciudades (Quijano Parra, Quijano Vargas y Henao Martínez., 2010).

Según Brunekreef y Holgate., 2002 los daños en la salud ocasionados por el material particulado ambiental han sido experimentados por décadas.

Se necesita conocer las características físicas y químicas del aire, las mismas obedecen de las fuentes (origen), la intensidad de la emisión y la interacción molecular entre los componentes inorgánicos y orgánicos, para valorar el efecto dañino del material particulado (Buschini et al., 2001).

Según Suárez, Álvarez, Bendezú y Pomalaya., 2017 enuncian que el material particulado presenta una gran importancia en la visibilidad atmosférica (smog), salud pública, clima y conservación de los materiales artificiales (corrosión).

2.2.1. Material Particulado PM_{2,5}

El material particulado PM_{2,5} al ser cien por ciento respirable, se convierte en la fracción con mayor peligrosidad a la salud, debido que pueden ingresar al sistema respiratorio, colocarse en los alvéolos pulmonares y alcanzar al torrente sanguíneo ocasionando aumento en las



enfermedades respiratorias, cardíacas, asma, bronquitis, enfisema, cáncer pulmonar, y disminución del funcionamiento pulmonar (Samet et al., 2000; Quijano et al., 2015).

Las partículas $PM_{2.5}$ contienen elementos tóxicos como los metales pesados y compuestos orgánicos, los mismos que son desencadenantes de cáncer (Quijano et al., 2010).

El material particulado atmosférico está compuesto por: sulfatos, nitratos, amonio, ión hidrógeno, agua adherida a las partículas, carbono elemental, compuestos orgánicos y elementos de la corteza terrestre.

2.3. Composición elemental del material particulado

Sobre la composición del material particulado, Quijano et al., 2010, señalan que los estudios realizados muestran una relación entre composición química y tamaño de las partículas, en la que se puede encontrar que la fracción fina está compuesta por carbón elemental, sulfatos, ion hidrógeno, amonio, etc.; mientras que la fracción gruesa del PM está compuesta por elementos de la corteza como hierro, magnesio, sílice, aluminio, calcio y materia orgánica. Por otra parte, los nitratos y potasio pueden encontrarse en ambas fracciones.

En informes emitidos por la Corporación Municipal de Mejoramiento de la calidad de Aire de Quito (CORPAIRE) en el año 2006, se muestran que los principales componentes del material particulado son: el polvo mineral (41 %), carbón total, 25 % de iones y 3 % de componentes no identificados. Estudios realizados por el Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca, concluyen que el material particulado presente en el aire de la ciudad de Cuenca, tiene como parte de su composición química metales como el aluminio, cromo, cadmio, cobre, hierro, zinc, plomo, níquel y manganeso. Los metales se encuentran presentes en pequeñas cantidades entre 1 % y 2 % en peso en el material particulado (Jachero y Moscoso., 2009).



Sienra, Rosazza y Préndez., 2005 enuncian que en el PM se puede encontrar compuestos orgánicos (hidrocarburos aromáticos policíclicos), algunos presentan efectos cancerígenos y mutagénicos y además se puede descubrir metales pesados como Pb, Cd, Ni, Cu, Mo y V, que pueden afectar a la salud de las personas (Préndez, et al.,1991; Goyer, 1995; Ondov y Wexler., 1998; WHO., 2000).

2.4. Normativa Legal Vigente

En el Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente Norma de Calidad del Aire Ambiente o Nivel de Inmisión Libro VI Anexo 4, se ha establecido que el promedio aritmético de la concentración de $PM_{2,5}$ de todas las muestras en un año, no deberá exceder de quince microgramos por metro cúbico ($15 \mu\text{g}/\text{m}^3$). La concentración máxima en 24 horas, de todas las muestras colectadas, no deberá ser mayor a cincuenta microgramos por metro cúbico ($50 \mu\text{g}/\text{m}^3$).

Se considera sobrepasada la norma de calidad del aire para material particulado $PM_{2,5}$ cuando el percentil 98 de las concentraciones de 24 horas registradas durante un período anual en cualquier estación monitorea sea mayor o igual a $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

La OMS da como valores referenciales de $PM_{2,5}$: $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de media anual y $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de media en 24h.

Los valores referenciales para el Cadmio según la normativa ecuatoriana es $5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{m}^3$.

Al no existir valores límites de las concentraciones de níquel, plomo, zinc, hierro en el aire ambiente para la protección de la salud humana por inhalación, en la normativa Nacional Ecuatoriana, se tomó como referencia el valor límite recomendado por la normativa canadiense de $120 \mu\text{g}/\text{m}^3$ para zinc (Astete et al; 2014).



La OMS da como valores referenciales para Plomo $0,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y $0,005 \mu\text{g}/\text{m}^3$ para cadmio como promedio anual (Astete et al.; 2014), no existe valores límites para el hierro.

La Normativa Europea indica como valor límite $20 \text{ ng}/\text{m}^3$ para el níquel.

2.5. Metales

Los metales se encuentran naturalmente en la corteza terrestre formando parte importante de las funciones bioquímicas y fisiológicas en el organismo. Existen oligoelementos necesarios para el sostenimiento de los sistemas bioquímicos de los seres vivos, como, por ejemplo, cobre, manganeso o zinc, son fundamentales en el metabolismo de los mamíferos. Además, existen metales que pueden desenvolverse como poderosos tóxicos para los ecosistemas y para los seres humanos, dependerá de la vía de exposición, la dosis absorbida, naturaleza química, etc., algunos incluso pueden ser cancerígenos siempre en función de los niveles detectados (Ferré, Schuhmacher, Llobet y Domingo., 2007).

La mayoría de los metales encontrados en fuentes naturales proceden de la corteza terrestre, sin embargo, una fuente de exposición a metales es la atmósfera contaminada con elementos en forma de polvos, humos o aerosoles, que pueden ser de origen industrial, procedentes de la combustión fósil. Las personas están expuestas a estos contaminantes por inhalación (Ferré et al., 2007).

Los metales pesados se pueden encontrar en los diferentes compartimentos ambientales (aire, agua, suelos, flora y fauna) y debido a su carácter acumulativo y de permanencia se puede detectar en el organismo humano (Mejía, Chitiva y Cabrera., 2013).

Los metales cumplen funciones biológicas importantes como: componentes enzimáticos, sistemas de óxido reducción, activadores enzimáticos (Carmona, Dauder y Creus., 2009).



Los metales no se pueden degradar ni destruir, pueden ser ingeridos, inhalados o absorbidos dérmicamente a partir de partículas de polvo resuspendidas del suelo (Ferré et al., 2007).

El tráfico generado por el aumento en la movilidad de la sociedad actual, se ha convertido en una de las principales causas de contaminación atmosférica por combustión fósil (Ferré et al., 2007).

Los metales pueden clasificarse según su toxicología y desde el enfoque biológico en: metales con toxicidad aparente entre los cuales están, el mercurio, arsénico, plomo, cadmio, y uranio; metales traza esenciales cromo, cobalto, manganeso, selenio y zinc; otros metales con importancia biológica como son el níquel y vanadio; y metales con interés farmacológico aluminio, galio, litio y platino (Carmona et al., 2009).

2.5.1. Toxicidad de los metales

Los metales pesados son elementos que se encuentran en muy pequeñas cantidades en el material particulado y que provienen principalmente de algunos procesos de combustión, procesos industriales específicos, incineradores, antidetonantes de gasolinas y aceites de motores de combustión interna (Galvis y Rojas., 2006). Entre los principales están: calcio, aluminio, plomo y hierro, con menor frecuencia se encuentra sodio, potasio, vanadio, magnesio, cobre, cromo y manganeso (Capó., 2002).

Varios metales según Pachón y Sarmiento, 2008 se han identificado en distintas fuentes como: aluminio, silicio, titanio y calcio que se encuentran en el suelo y corteza terrestre; el bromo, plomo, cobre y hierro son afines a las emisiones vehiculares, el manganeso, zinc y potasio provienen principalmente de procesos industriales y elementos como el hierro y el zinc se producen de la resuspensión del polvo al paso de vehículos y de su combustión en el caso de los vehículos a diésel.



Entre los metales que exhiben mayores inconvenientes para la salud están el plomo, cadmio, mercurio y arsénico, de los cuales el plomo y el cadmio son los más peligrosos para animales y humanos, atacando principalmente al sistema nervioso central (plomo) y los riñones (cadmio). Algunos problemas asociados a los metales son: retraso en el desarrollo, cáncer, daño renal, neurotoxicidad y muerte (Varona, Vila, Cabrera, Arocha., 2014).

2.5.1.1. Hierro:

Es un metal muy abundante en la naturaleza, el mismo que al ser inhalado es causante de irritaciones locales de los pulmones y el tracto gastrointestinal (Gunnar., 2001).

La inhalación de polvo que contenga óxido de hierro o sílice puede originar neumoconiosis, pero no existen conclusiones definitivas con relación al papel de las partículas de óxido de hierro en el desarrollo del cáncer de pulmón en el hombre.

Los experimentos en animales indican que el polvo de óxido de hierro podría actuar como una sustancia “co-cancerígena”, favoreciendo el desarrollo del cáncer cuando se combina simultáneamente con la exposición a sustancias cancerígenas (Astudillo et al., 2015).

2.5.1.2. Plomo:

La contaminación atmosférica por plomo ambiental se conoce como uno de los peligros más significativos en la salud, debido a sus efectos permanentes, acumulativos y mortales en el proceso neurológico de los niños (Needleman et al., 1979). Los principales daños que presentan son descenso en la elaboración de hemoglobina y la anemia, perjudica la asimilación de la vitamina D, daño renal, hipertensión arterial, encefalopatía, deteriora el desarrollo cognitivo y físico de los niños, y puede darse la muerte (Howson, Hernández y Rall., 1996).



2.5.1.3. Níquel:

Los efectos dañinos por exposición a níquel o sus compuestos pueden ser agudos y crónicos estos van a depender del tipo de compuesto y de las características de la exposición, entre los daños más frecuentes a la salud existen: dermatitis alérgica, inflamación pulmonar, asma ocupacional, bronquitis crónica, fibrosis con reducción permanente de la función pulmonar, así como cáncer pulmonar y de senos nasales (Tamayo, Esquivel, Cantillo, Luna, y Romero., 2014).

La inhalación de partículas que tengan este metal puede causar irritación pulmonar, asma, neumoconiosis, edema pulmonar, fibrosis pulmonar (Moreno., 2003).

La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) atribuye al níquel de posibles y probables agentes carcinógenos en humanos.

El riesgo cancerígeno refiere la posibilidad de desarrollar cáncer tras un tiempo de exposición fijo, 6 años para los niños y 70 años para los adultos (Ferré et al., 2007).

Según Zamarreño y Díaz., 2010 en su investigación sobre metales en material particulado PM_{2,5} en la atmósfera de la ciudad de La Serena, Chile, encontraron valores de níquel que está en el límite del valor referencial de la OMS (0,03 µg/m³).

2.5.1.4. Zinc

El zinc es un elemento no abundante pero muy distribuido en la naturaleza, representando el 0,012 % de la corteza terrestre (Robert et al., 1997; González et al., 1998). Estudios han asociado un consumo elevado de zinc con un riesgo de cáncer avanzado de próstata, así como elevación del nivel de testosterona, colesterol y disminución de los niveles de HDL y consigue provocar una disfunción inmune (Moyad., 2004).



2.6. Sistema respiratorio, generalidades

El aire inspirado constituye la principal fuente de oxígeno para el cuerpo, pero durante esta acción, se puede también encontrar partículas, gases tóxicos y microorganismos que van hacia el tracto respiratorio.

Para una mayor comprensión se divide el aparato respiratorio en: vía respiratoria superior, o extratorácica, compuesta por la nariz, la nasofaringe, la boca, la orofaringe, laringofaringe; la vía respiratoria media o torácica, que incluye la parte inferior de la laringe, la tráquea, los bronquios hasta los bronquiolos terminales y la vía respiratoria inferior alveolar, la cual incluye a los bronquiolos respiratorios, los conductos alveolares, los sacos alveolares y los alvéolos (Gordon y Amdur., 2012).

2.6.1. Mecanismos de depósito del material particulado en el sistema respiratorio.

Según Sierra Vargas., 2012; Raabe O., 1982 los mecanismos por los cuales una partícula se puede depositar en el tracto respiratorio son:

-Impactación: Se da cuando el recorrido del flujo de aire cambia de manera brusca como resultado del cambio en la dirección de las vías aéreas. Es el principal mecanismo de depósito de las partículas mayores a 5 μm .

-Intercepción: Las fibras se colocan primordialmente por este mecanismo. Se da cuando un extremo o una parte de la superficie de la partícula se unen con las paredes de las vías respiratorias hasta que se detiene debido a la fuerza de fricción.

-Sedimentación: Se da lugar cuando la partícula es balanceada por la flotabilidad del aire y a su resistencia, este mecanismo va a depender de la gravedad. De este modo se depositan las partículas con diámetro de entre 1-5 μm .

-Difusión: Tiene lugar debido al bombardeo de la partícula por las moléculas de gas, estimulando un movimiento de tipo Browniano, el mismo que hace que la partícula entre en contacto con la pared de las vías aéreas en un momento dado, mediante este mecanismo se depositan partículas menores a $0,5 \mu\text{m}$.

-Atracción electrostática: En este mecanismo existirá una atracción sobre la superficie de las vías aéreas debido a que contienen una carga eléctrica determinada.

A continuación, la figura 1, presenta el mecanismo de depósito de las partículas.

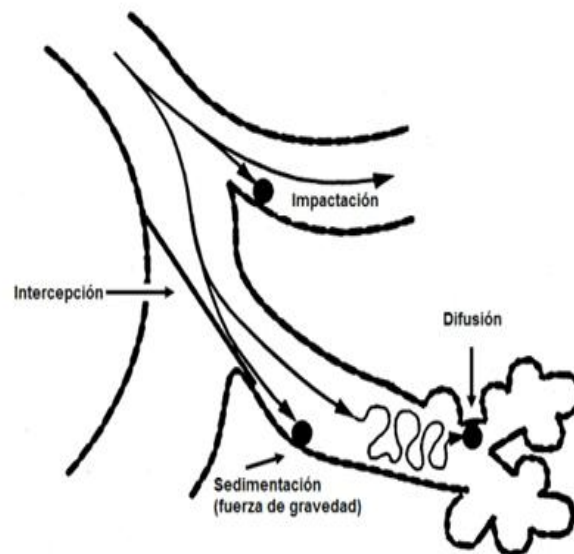


Figura 1: Mecanismos de depósito de las partículas en el árbol respiratorio

Fuente: Adaptada de Beleño, Quijano, y Meléndez, 2013. Actividad mutagénica y genotóxica del material particulado PM_{2.5} en Cúcuta, Colombia. Revista MVZ Córdoba, 18.

Yeh, Phalen, y Raabe., 1976 afirman que los mecanismos de depósito no infieren directamente a nivel del tracto respiratorio, sino que resultan de la combinación y el predominio de unos sobre otros y dependerá de los siguientes factores enunciados en la tabla 1.

**Tabla 1:** Factores que influye en los mecanismos de depósito

Características de la partícula	Geometría del aparato respiratorio	Características de la ventilación	Otros factores
-Tamaño	-Calibre de las vías aéreas	-Tipo de respiración	-Exposición a irritantes
-Forma	-Patrón de ramificación del árbol traqueobronquial.	Frecuencia respiratoria	-Enfermedades pulmonares
-Densidad	-Longitud de las vías aéreas terminales	-Volumen corriente	-Crecimiento
-Higroscopicidad		-Flujo y velocidad	-Edad
-Carga eléctrica		-Distribución interlobular de la respiración	-Género
		-Duración de las pausas respiratorias	

Fuente: Autor

2.6.2. Distribución del material particulado en el aparato respiratorio

Sierra Vargas., 2012 clasifica al material particulado por el nivel en que estas se sitúen (Figura 2):

-Fracción inhalable: Las partículas que se adhieren al sistema respiratorio ya sea por la boca o la nariz.

-Fracción extratorácica: En esta zona se encuentran las partículas que penetran a nivel de las vías respiratorias superiores hasta la parte superior de la laringe, aquí se obtienen las partículas de diámetro de 5 μm – 10 μm .

-Fracción torácica: Se encuentran partículas que se adhieren entre la laringe y los bronquiolos terminales, aquí encontramos las partículas con diámetro de 2,5 μm - 5 μm .

-Fracción respirable o alveolar: Las partículas observadas en esta zona son las que tienen un diámetro $\leq 2,5 \mu\text{m}$ (PM_{2,5}) principalmente las ultra finas cuyo diámetro aerodinámico es menor a 0,1 μm , y van a estar depositadas en los bronquiolos respiratorios hasta los alvéolos.

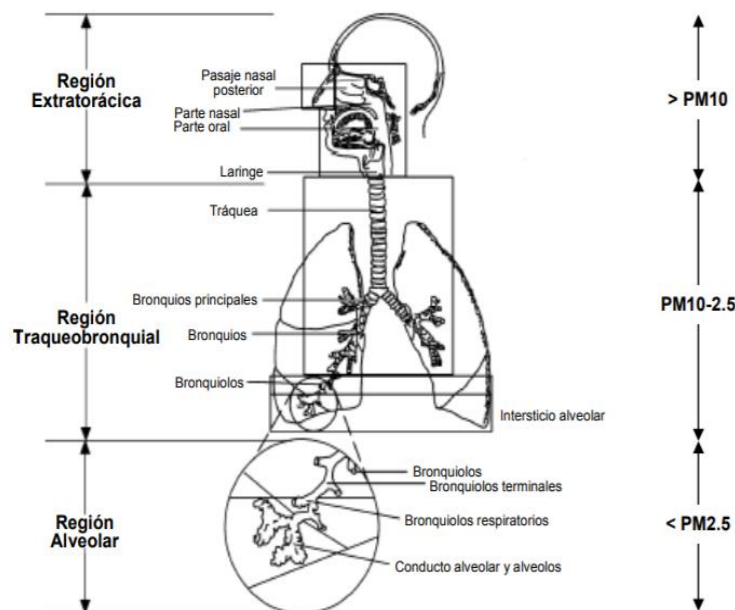


Figura 2: Distribución de las partículas en el aparato respiratorio dependiendo de su diámetro aerodinámico.
Fuente: Adaptada de Beleño, Quijano, y Meléndez, 2013. Actividad mutagénica y genotóxica del material particulado PM2.5 en Cúcuta, Colombia. Revista MVZ Córdoba, 18.

2.6.3. Mecanismos de depuración del material particulado del aparato respiratorio

Raabe O., 1982 afirma que el aparato respiratorio presenta mecanismos de defensa para eliminar las partículas contaminantes en el árbol traqueo bronquial, detalladas a continuación:

-Depuración traqueobronquial: Este mecanismo se da en un lapso de 24 a 48 horas y consiste en transportar las partículas envueltas en una capa de moco o que han sido fagocitadas por los microfitos, esta depuración está dada por el escalador mucociliar.

-Depuración pulmonar: Este elemento incluye las siguientes alternativas: 1) las partículas puede ser evacuadas vía el escalador mucociliar al quedar atrapadas en la capa de moco; 2) las partículas pueden ser eliminadas vía circulación linfática al ser fagocitadas por los macrófagos; 3) el material depositado puede ser trasladado a la circulación al pasar por un proceso de disolución y 4) las partículas debido a su tamaño, pueden entrar directamente al torrente sanguíneo y ser llevadas a otros órganos del cuerpo ya que atraviesan la barrera

alveolar. Dependiendo del grado de solubilidad y de la sobrecarga de las partículas se observará el tiempo de residencia de las partículas en el tracto respiratorio (Figura 3).

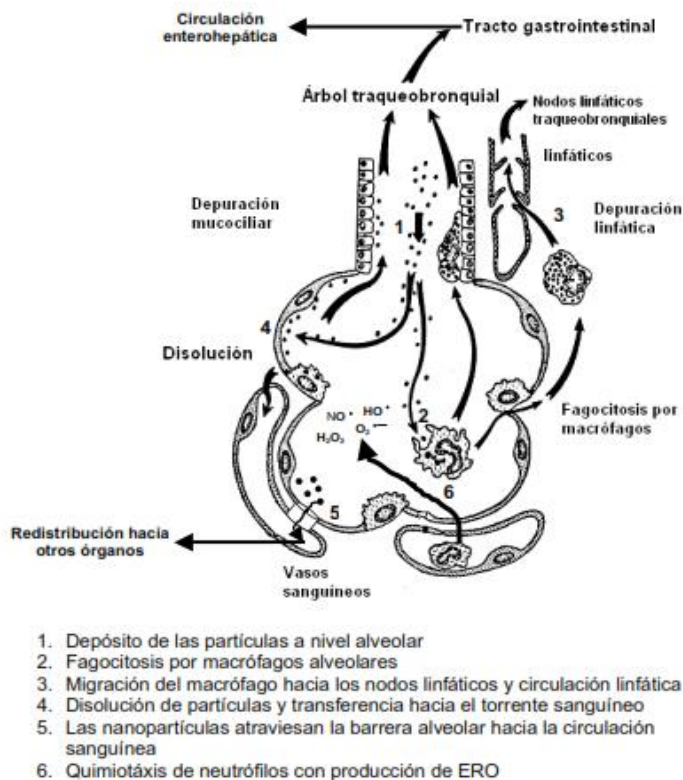


Figura 3.- Depuración alveolar de las partículas

Figura 3: Depuración alveolar de las partículas

Fuente: Adaptado de Raabe, O. *Deposition and clearance of inhaled aerosols*. In: *Mechanisms in Respiratory Toxicology*. Volume I. Witschi, H. and Nettekheim, P. Edit. CRC Press Inc. pp. 223; 1982.

2.7. Mecanismos de defensa del sistema respiratorio

Según Nicod.,2005 los mecanismos de defensa pulmonar pueden ser: constitutivos o mecánicos (se da como respuestas automáticas o inmediatas) y adaptativos o inmunológicos (estos en cambio demandan un lapso de latencia, desenrollan memoria y provocan efectos más intensos cuando se ha tenido un contacto previo). La tabla 2 presenta los mecanismos de defensa pulmonar.



Tabla 2: *Mecanismos de defensa pulmonar*

Mecanismos constitutivos	Mecanismos adaptativos o inmunológicos
<p>Estos mecanismos son una barrera importante para evitar el ingreso de partículas o de microorganismos $>3\mu\text{m}$ a las vías respiratorias inferiores. Entre estas tenemos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • La nariz • Mucosidad de las vías respiratorias • Estornudo • Tos • Escalador mucociliar • Epitelio respiratorio 	<p>Entran en acción como los mecanismos constitutivos no son suficientes entre estos tenemos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Inmunoglobulina A secretora (S-IgA) • Inmunoglobulina M (IgM) • Inmunoglobulina G (IgG) • Inmunoglobulina E (IgE) • Complemento • Células epiteliales • Eosinófilos • Mastocitos • Basófilos • Neumocitos tipo I y II • Macrofagos alveolares • Linfocitos • Neutrofilos

Fuente: *Autor*

2.8. ADN y Genotoxicidad

El ácido desoxirribonucleico (ADN) nuclear, está comprometido en la transmisión hereditaria, contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos. El ADN está formado por cadenas largas que se acoplan para formar los cromosomas. Las células eucariotas del ADN se encuentran en el núcleo y en la mitocondria. Este ADN puede sufrir alteraciones en su estructura química básica al exponerse a la agresión de distintos agentes físicos o químicos que se presentan en el ambiente y que interacciona con él. El ADN se sujeta a métodos de replicación y transcripción del código base, por lo que el ADN está exhibido y sometido a ataques químicos que pueden alterar su integridad, la molécula de ADN está expuesta a diferentes cambios que dan lugar al funcionamiento celular por lo que se puede decir que el ADN no se encuentra en estado estático. Muchos de los agentes físicos y químicos que se encuentra en el medioambiente pueden reaccionar con el material genético y alterar física y químicamente al ADN (Sahagún M., 2009).

Mientras que Hoffman, Rattner, Burton, y Cairns., 2002 indican dos tipos de modificaciones en la estructura del ADN: la primera consiste en las transformaciones que identifican la especie genotóxica responsable de la modificación estructural y la segunda están en los cambios estructurales no de un determinado genotóxico en particular, sin embargo, apuntan que la exposición ha dado lugar a la fractura de la hebra de ADN lo que puede repercutir cuando un genotóxico produce radicales libres.

De acuerdo a las investigaciones el ADN puede interactuar con las moléculas esencialmente a tres patrones: interacciones electrostáticas, pérdida de la sensibilidad y modificaciones químicas de las bases por intercalación. Las lesiones dadas en el ADN pueden dar lugar a mutaciones o re-arreglos genéticos, esto se da cuando la lesión no se arregla. Entendiéndose como lesión en el ADN, cuando un componente de la molécula contiene solo un sitio de daño apartado por más de un par de bases o cuando un componente contiene más de un daño elemental. Este daño se puede atribuir a diferentes tipos, pueden ser específicas o inespecíficas, oxidativas, delección de bases o rupturas de una cadena (Sahagún M., 2009). A continuación, la figura 4 presenta la estructura del ADN y los puntos vulnerables al ataque en la biomolécula por especies químicas reactivas.

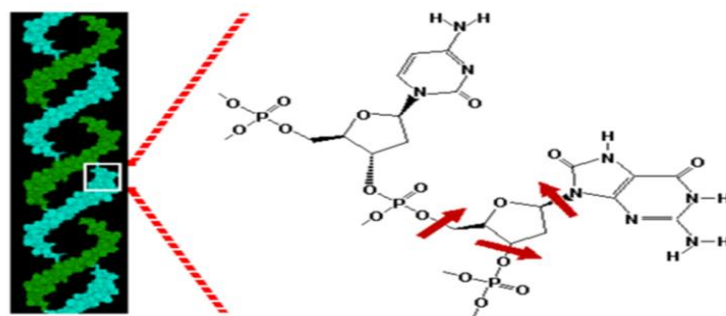


Figura 4: Estructura del ADN y los puntos vulnerables al ataque en la biomolécula por especies químicas reactivas

Fuente: Adaptada de Sahagún, 2009. "Efecto genotóxico de las partículas Atmosféricas Urbanas". Tesis de Pregrado. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigaciones y Estudios sobre Medio Ambiente y Desarrollo (CIEMAD).



Knaapen, Borm, Albretcht y Shins., 2004; Sorensen, Schins, Hertel y Loft., 2005; Gutierrez, Cebrian, Vizcaya, Roubicek, Sordo y Ostrosky., 2006; Gutiérrez et al., (2006); Shi, Duffin, Borm, Li, Weishaupt y Schins., 2006 afirman que estudios realizados han argumentado los daños oxidativos al ADN y su correlación con las partículas atmosféricas. Se puede producir especies reactivas de oxígeno a partir de fracciones de partículas atmosféricas de tamaños variados y componentes acuosos y orgánicos solubles e insolubles.

Los metales solubles en agua presentes en las partículas atmosféricas tales como vanadio, hierro, níquel, cromo, cobre, zinc, manganeso, dan lugar a la reacción Fenton y Haber Weiss para formar el radical hidroxilo a partir de la reducción del peróxido de hidrógeno, observado en el esquema de la reacción figura 5 (Donaldson et al., 1997; Knaapen, Schins, Steinfartz y Höhr., 2000; Dellinger et al., 2001; Prahalad et al., 2001; Brits, Schoeters and Verschaeve., 2004; Karlsson, Nygren y Möller., 2004; Danielsen, Loft y Møller., 2008).

Mientras que Li, Hao, Phalen, Hinds, Nel., 2003 afirman que la fracción orgánico-soluble presente en las partículas atmosféricas pueden estar formados por componentes orgánicos que dan a lugar al ciclo redox, como las quinonas, las mismas que aumentarían la formación del radical superóxido.

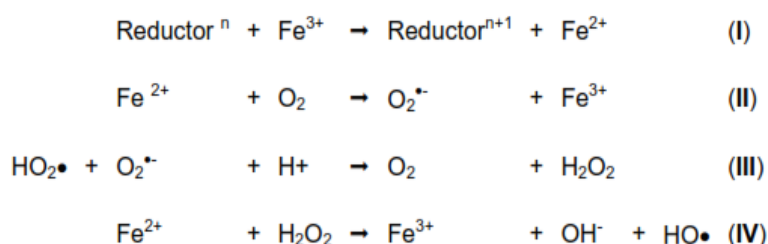


Figura 5: Esquema de la reacción Fenton- Haber Weiss. Catálisis de ROS.

La presunción predominante para los efectos la salud provocado por partículas, es el estrés oxidativo. Las dosis exaltadas, la inadecuada remoción de especies reactivas de oxígeno (ROS), los componentes altamente reactivos en la respuesta al estrés oxidativo pueden causar



severas disfunciones metabólicas, daño biológico a las macromoléculas y muerte celular por cualquiera de los procesos necróticos (Sahagún M., 2009).

2.9. Actividad mutagénica y genotóxica en el PM_{2,5}

Westerholm y Li, 1994 afirman que el PM_{2,5} se presenta como resultado de la combustión de los motores a diésel considerados como tóxicos debido a la presencia de cancerígenos y su capacidad de producir problemas cardiovasculares y respiratorios (Stayner, Dankovic, Smith, Steenland., 1998); además pueden dar lugar a reacciones alérgicas (Kleinman et al., 2005). Mientras que Zhang, Cui y Qi., 2001 afirman que existe un acrecentamiento en la morbilidad y mortalidad como resultado del incremento de partículas finas ambientales y el estrés oxidativo provocado. Mientras que Claxton y Woodall., 2007 atribuyen el efecto de mutagenicidad y carcinogenicidad a la presencia de combustión en el aire.

Según Piñeiro et al., 2003 es transcendental saber la composición química del material particulado presente en la atmósfera, ya que facilitará observar el efecto sobre la salud humana debido a las sustancias tóxicas y cancerígenas unidas a este material y además contribuye a la contaminación del aire ambiente.

El Instituto Nacional de Seguridad y Salud Ocupacional a través de los experimentos ejecutados de la genotoxicidad y carcinogenicidad pudo ultimar que las partículas del diésel se deben considerar como " potencial " carcinógeno humano (NIOSH., 1988) y la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) refiere a las emisiones de diésel como un " carcinógeno humano "probable" (IARC., 1989).

Los efectos tóxicos y cancerígenos presentes en el aire contaminado se dan principalmente por la producción de hidrocarburos aromáticos poli cíclicos (HAPs) que están presentes en el material particulado como respuesta a las partículas de diésel en el ambiente. Estos hidrocarburos demuestran propiedades cancerígenas debido a su mutagenicidad, no



obstante, los HAPs también se presentan como receptores aril hidrocarburos, los mismos que pueden presentarse con efectos no genotóxicos. Los HAPs unidos a partículas de diámetro menor de 2 μm puede situarse en los pulmones y producir cáncer durante largos períodos de exposición (Meléndez et al., 2012). La tabla 3 resume la clasificación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Tabla 3: Clasificación de los Hidrocarburos aromáticos

Agencia Internacional de Investigación en Cáncer – IARC– (IARC, 2010) dependiendo de las características carcinogénicas de los HAPs los divide en:	La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA),	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) enuncia un subgrupo que son carcinogénicos para los animales, e igualmente son trabajados por la U.S. EPA como cancerígenos viables para los humanos.
Carcinogénico para humanos, probablemente carcinogénicos, no clasificable como carcinogénico, probablemente no carcinogénicos para humanos.	HAPs prioritarios: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, antraceno, fenantreno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(a)pireno, benzo(k)fluoranteno, benzo(b)fluoranteno, benzo(g,h,i) perileno, dibenzo(a,h)antraceno, indeno(1,2,3-c,d)pireno.	Algunos ejemplos son: benzo(a)antraceno (2B),criseno (2A), benzo(a)pireno (1), benzo(b)fluoranteno (2B), benzo(j)fluoranteno (2B), benzo(k)fluoranteno (2B), dibenzo(a, h) antraceno(2A), indeno (1,2,3-c,d) pireno(2B).

Fuente: Autor

Claeys, et al., 2004 manifiestan que, como resultado de la combustión inconclusa dan lugar los productos químicos gaseosos cancerígenos como, por ejemplo: benceno, aldehídos, alquenos y HAPs. Estudios realizados en el diésel permiten visualizar que el material particulado contiene compuestos orgánicos mutagénicos (Lewtas et al., 1979).

Un poderoso mutágeno de acción directa aislado de la combustión del diésel y del ambiente es la 3-nitrobenzantrona (3-NBA) (Enya, Suzuki, Watanabe, Hirayama, Hisamatsu., 1997) en donde se puede observar que la principal fuente de ingreso de esos HAPs al organismo, es por el tracto respiratorio, y por ende los pulmones y tracto respiratorio son los encargados de transportarlos a la sangre y tejidos (Hałatek, Zinzuk-Walczak, Szymczak, Rydzynski., 2005).



Un estudio realizado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos., 2002 (U.S. EPA) con respecto a las emisiones de escape del diésel da como referencia la mayor certeza de la carcinogenicidad en los seres humanos. Mientras que Bhatia, Lopipero y Smith., 1998; Lipsett y Campleman., 1999 enuncian que los cánceres asociados con la inhalación del escape de diésel son el pulmón, la vejiga y el tejido linfático.

Nguyen y Byeong-Kyu., 2010 afirman que la mutagenicidad que presenta la materia particulada se debe a la presencia de plomo, zinc, vanadio, cadmio en el aire, los mismos que pueden estar presente en diferentes fuentes como automóviles, calentadores de agua de la casa y otras.

2.10. Interacción de los Metales pesados con el ADN

En estudios realizados no existe información clara sobre la toxicidad de los metales. Sin embargo, el arsénico (III), cobre (II), níquel (II), cadmio (II), y manganeso (II), incrementan la frecuencia de mutación cuando son combinados con luz ultravioleta y/o agentes alquilantes. Esto sugiere que una inhibición de los procesos de reparación del ADN puede ser un mecanismo predominante en la genotoxicidad inducida por metales. Además, la mayoría de los compuestos metálicos carcinogénicos han mostrado incrementar la citotoxicidad, mutagenicidad y clastogenicidad en células de mamífero cuando se combinaron con diferentes tipos de agentes dañinos del ADN (Hartwing., 2000). En la Figura 6 se muestran los diferentes niveles de interacción de los compuestos metálicos tóxicos en el proceso carcinogénico.

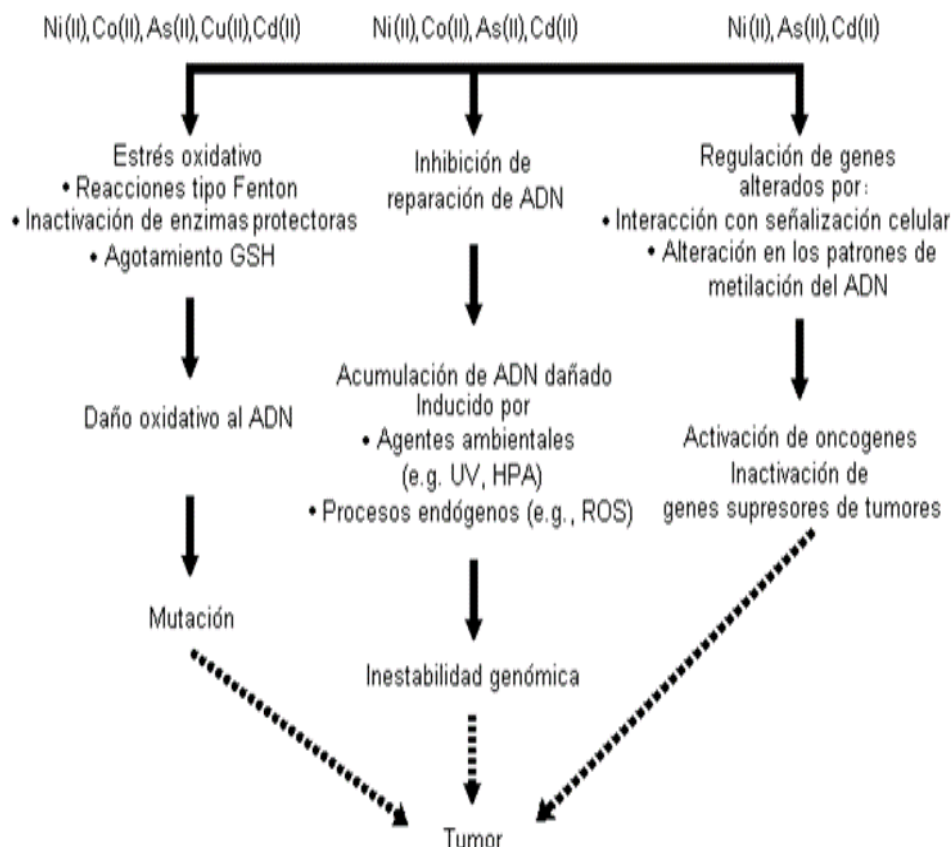


Figura 6. Mecanismos propuestos de carcinogénesis inducida por metales
Fuente: Hartwing., 2000.

2.11. Biomarcadores

Según Crebelli et al., 1995; Viras et al., 1991; Isidori, Ferrara, Lavorgna, Nardellim y Parrella., 2003 los estudios realizados en genotoxicidad del PM la mayor parte son ejecutados en Estados Unidos y Europa por lo que existe la posibilidad de no ser admitidas en los países hispanoamericanos ya que difieren en condiciones climáticas, geográficas y socioeconómicas. Por lo tanto, se manifiesta que los estudios en el ambiente de genotoxinas debería ser lo principal en temas de salud en estos países, para así poder regular reglas de prevención o remisión de los efectos originados por estas partículas.

Entre algunos bioindicadores de contaminación ambiental usados por varios años están las diferentes especies de plantas superiores, líquenes y musgos debido a que estos dan



respuesta de un individuo frente a un contaminante por un periodo de tiempo, y también dan resultados con otras variables atmosféricas, meteorológicas y otros contaminantes que pueden presentar interacción consigo mismo. (Seaward M., 1995).

Batalha et al., 1999; Monarca, Feretti, Zanardini, Falistocco y Nardi.,1999 afirman que la especie que se utiliza con mayor frecuencia como biomarcador es el género *Tradescantia* ya que presenta mayor sensibilidad, vigencia y bajo costo y este puede ser utilizado tanto para estudios en el aire, agua y suelo.

2.12. Ensayo cometa

El ensayo cometa o llamado electroforesis en gel de células individuales es uno de los métodos que actualmente es muy usado para observar rupturas en el ADN debido a que no utilizan etiquetas radiactivas y se necesita un número de células pequeñas, el mismo que ayuda a valorar el perjuicio en células individuales. En esta técnica se combina linfocitos humanos con microgeles de agarosa ampliada sobre placas portaobjetos, empapados en medio de lisis y el ADN es desnaturalizado con hidróxido de sodio (Ostling y Johanson., 1984).

Carmona, Dauder, y Creus., 2009 resumen en los siguientes pasos al ensayo del cometa:

1. Las células estudiadas se suspenden en agarosa y se les coloca en un portaobjeto.
2. Se da lugar a la lisis de la célula debido a la presencia de sales en concentraciones elevadas, provocando la eliminación de proteínas celulares y liberando el ADN.
3. Para dar lugar el desenrollamiento y relajación del ADN se va a exponer a una solución alcalina, dando lugar a la ruptura de cadenas simples y álcali lábiles.
4. Se da lugar la electroforesis en entornos alcalinos produciendo las roturas del ADN y haciendo que vayan hacia el ánodo.
5. Se neutraliza.



6. Se da lugar a la tinción del ADN y se realiza la visualización microscópica (electroforesis).

7. Se analiza los niveles de daños genéticos visualizados mediante el recuento.

Mientras que Ostling y Johanson., 1984 establecieron el corrido electroforético después del rompimiento de las células en el microgel de agarosa, colorearon el ADN con bromuro de etidio y se valora el daño a través de la visualización de la fluorescencia del ADN migrado. Singh, McCoy, Tice, Schneider., 1998, purificó la técnica utilizando situaciones alcalinas para alterar las estructuras secundaria y terciaria del ADN.

2.13. Estado del Arte

Entre las investigaciones iniciales acerca de material particulado 2,5 están numerosos estudios epidemiológicos realizados a partir de la década de 1990 (Dockery y Pope., 1993; Dockery y Pope., 1996; Hoek et al., 2002; Pope et al., 2002), los cuales han demostrado la presencia de efectos adversos para la salud generados de la exposición puntual o prolongada a niveles elevados de material particulado atmosférico.

Debido a los efectos adversos que presentan los contaminantes del material particulado en la salud de las personas y los ecosistemas; dan lugar al creciente interés que existe hoy en día las investigaciones en este campo. Por ejemplo, el estudio “Análisis de la genotoxicidad de material particulado recolectado en dos ciudades de la provincia de Córdoba, Argentina”, realizado por Ferreyra y Arancibia, 2008 se empleó el ensayo de micronúcleos (Trad-MCN) con la especie *Tradescantia pallida* Rose.Hunt. cv. *Purpurea Boom*, concluye que la fracción tratada con agua del material particulado mostró genotoxicidad en las dos muestras analizadas sugiriéndose que los extractos acuosos podrían contener elementos con capacidad genotóxica.

En la investigaciones denominada “Material particulado-fracción respirable PM_{2,5} en Pamplona-Norte de Santander-Colombia” se demuestra la presencia de metales en el aire de



Pamplona, entre los cuales están: cromo ($0,8854\mu\text{g}/\text{m}^3$), hierro ($22,97\ \mu\text{g}/\text{m}^3$), potasio ($651,34\ \mu\text{g}/\text{m}^3$), manganeso ($0,3385\ \mu\text{g}/\text{m}^3$), níquel ($0,2729\ \mu\text{g}/\text{m}^3$), plomo ($1,02\ \mu\text{g}/\text{m}^3$), zinc ($245,83\ \mu\text{g}/\text{m}^3$), realizándose luego de unos años la investigación sobre el efecto genotóxico en la misma ciudad concluyendo que el $\text{PM}_{2,5}$ podría constituir un factor de riesgo en el índice de cáncer en sus habitantes expuestos, debido a que consiguen inducir mutaciones en el genoma de las células expuestas y penetrar hasta el núcleo de linfocitos humanos y producir daño genotóxico en su ADN. Asociando esta genotoxicidad a las emisiones de los motores diésel que circulan por la ciudad de Cúcuta (Parra, Vargas y Martínez., 2010; Meléndez et al., 2012; Parra, Gélvez., 2014).

También se han realizado estudios de “Citotoxicidad y genotoxicidad del material químico en filtros $\text{PM}_{2,5}$ de las estaciones de monitoreo de la red de calidad del aire del Valle de Aburrá” dando como resultados quiebres del ADN inducidas por $\text{PM}_{2,5}$ en las tres estaciones de monitoreo evaluadas. En donde la concentración $30,0\ \mu\text{g}/\text{ml}$ mostró mayor daño genotóxico (65 %) en el ensayo cometa, mientras que las aberraciones cromosómicas no mostraron resultados significativos en las tres estaciones de monitoreo (Betancur Sánchez., 2016).

En estudios referentes a Ecuador se ha encontrado varias investigaciones entre ellas la “Contaminación por material particulado en Quito y caracterización química de las muestras” realizada por Suárez y Pérez., 2006 en donde se realizó la determinación del material particulado PM_{10} , revelando que los principales componentes son el polvo mineral 41 %, carbón total, 25 % de iones y 3 % de componentes no identificados, dentro de los iones se cuantificaron sulfatos, nitratos, amonio y cloruros, observándose el efecto del alto contenido de azufre en los combustibles utilizados en el Distrito Metropolitano de Quito y la influencia de los gases emitidos por los volcanes activos. Otro estudio realizado “Medición y Evaluación de la calidad del aire en los sectores de Fertisa y Trinitaria de la ciudad de Guayaquil debido a la presencia de material particulado menor a $10,0\ \mu\text{m}$ y $2,5\ \mu\text{m}$ ” realizada por Angulo, 2008;



concluyendo que los sectores de Fertisa y Trinitaria muestran concentraciones de material particulado PM_{10} , dentro de los límites máximos permisibles para una exposición de 24 horas y para una exposición anual, en el caso de las concentraciones de material particulado $PM_{2,5}$ en el sector Trinitaria se estima que sobrepasa los límites de concentración máximas permitidas para una exposición anual, se debe al elevado tránsito de vehículos pesados que ingresan a los tres puertos que se encuentran en el sector y a la cercanía que existe entre el sitio de medición de concentración de material particulado y la avenida principal de ingreso a los puertos.

Estudios realizados en la ciudad de Cuenca por García y Abad., 2015 titulada “Análisis preliminar de la fitotoxicidad del material particulado sedimentable de la zona urbana de Cuenca” concluye que las concentraciones de material particulado sedimentado obtenidas en tres puntos de monitoreo superan la normativa de la OMS ($0,50 \text{ mg/cm}^2 \times 30 \text{d}$) con valores que varían entre $0,56 \text{ mg/cm}^2 \times 30 \text{ días}$ y $1,20 \text{ mg/cm}^2 \times 30 \text{ días}$. El estudio de Espinoza y Molina, 2014 sobre la Contaminación del aire exterior de Cuenca – Ecuador en los años 2009- 2013 y sus posibles efectos en la salud, demuestra que los promedios de Material Particulado 10 (PM_{10}) superan los límites establecidos por la OMS ($20 \mu\text{g/m}^3$). Astudillo et al., 2015 concluyen que la solución acuosolubles de PM_{10} del aire ambiente de la ciudad de Cuenca, tiene como parte de su composición metales pesados (hierro, zinc, manganeso, cobre, níquel) y aniones (cloruros, nitratos y sulfatos). Además, esta solución provocó daño sobre las células epiteliales alveolares A549, lo que se podría atribuir a la presencia de metales y aniones, sin embargo, recomienda ampliar el estudio a la solución orgánica.



3. METODOLOGÍA

3.1. Estudio realizado

La investigación realizada es cualitativa-cuantitativa, además es un estudio descriptivo y analítico transversal.

3.2. Área de estudio

Santa Ana de los Ríos de Cuenca, capital de la provincia del Azuay se encuentra localizada geográficamente en la parte sur del Ecuador, en un valle de la cordillera de los Andes.

Es la tercera ciudad más poblada del país, luego de Guayaquil y Quito, según el censo del 2010 con 329.928 habitantes, por esta ciudad atraviesan los ríos Tomebamba, Tarqui, Yanuncay y Machángara, tiene una altitud de 2 550 msnm, situada a una latitud de 2° 53' 57" sur y longitud 79° 00' 55" oeste. En Cuenca se puede encontrar climas con temperaturas que varían entre 7 °C y 15 °C en invierno y 12 °C a 25 °C en verano. Gozando de un clima primaveral todo el año debido a que se encuentra dentro de un extenso valle en medio de la columna andina.

3.3. Determinación de los puntos de monitoreo

La determinación de los puntos de monitoreo se realizó en función de un estudio preliminar de material particulado (PM_{2,5}; PM₁₀; material sedimentable) efectuado por el Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca.

La tabla 4, presenta los sitios de estudio con sus respectivas coordenadas.



Tabla 4: *Puntos de muestreo*

Denominación	Sito de muestreo	Coordenadas	
		Latitud	Longitud
Punto 1	Gaspar Sangurima y Luis Cordero	2°53'37.63" S	79°0'13.92" O
Punto 2	Av. de las Américas (Sector Basílica de la Universidad católica de Cuenca).	2°54'48.19" S	79°2'14.08" O
Punto 3	Av. de las Américas (Sector Coral Centro)	2°53'7.86" S	79°0'33.23" O

Fuente: *Autor*

A continuación, la figura 7 presenta los sitios de monitoreo del estudio preliminar

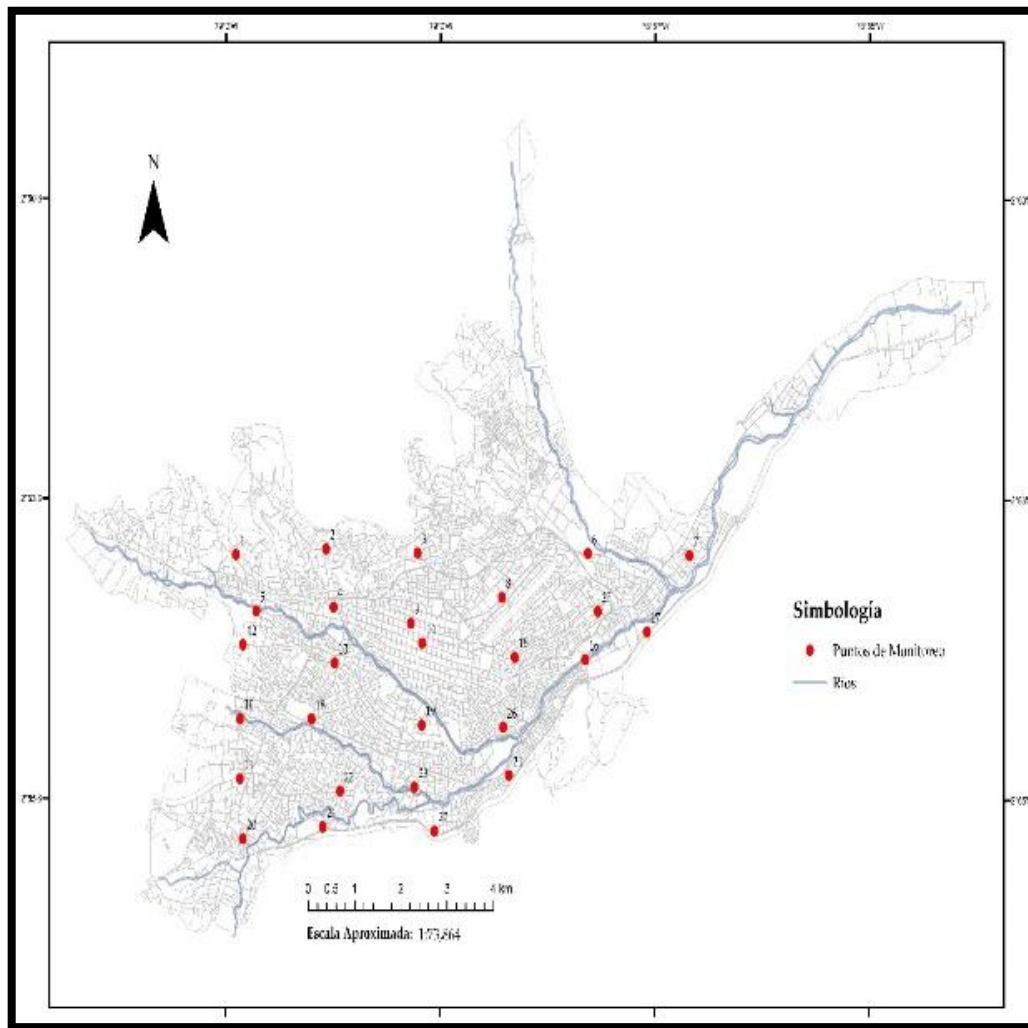


Figura 7: *Mapa de la ciudad de Cuenca con los puntos del monitoreo preliminar.*

Fuente: *Autor*

3.4. Diseño de estudio

La figura 8 presenta un diagrama de flujo de las actividades planteadas en la metodología.

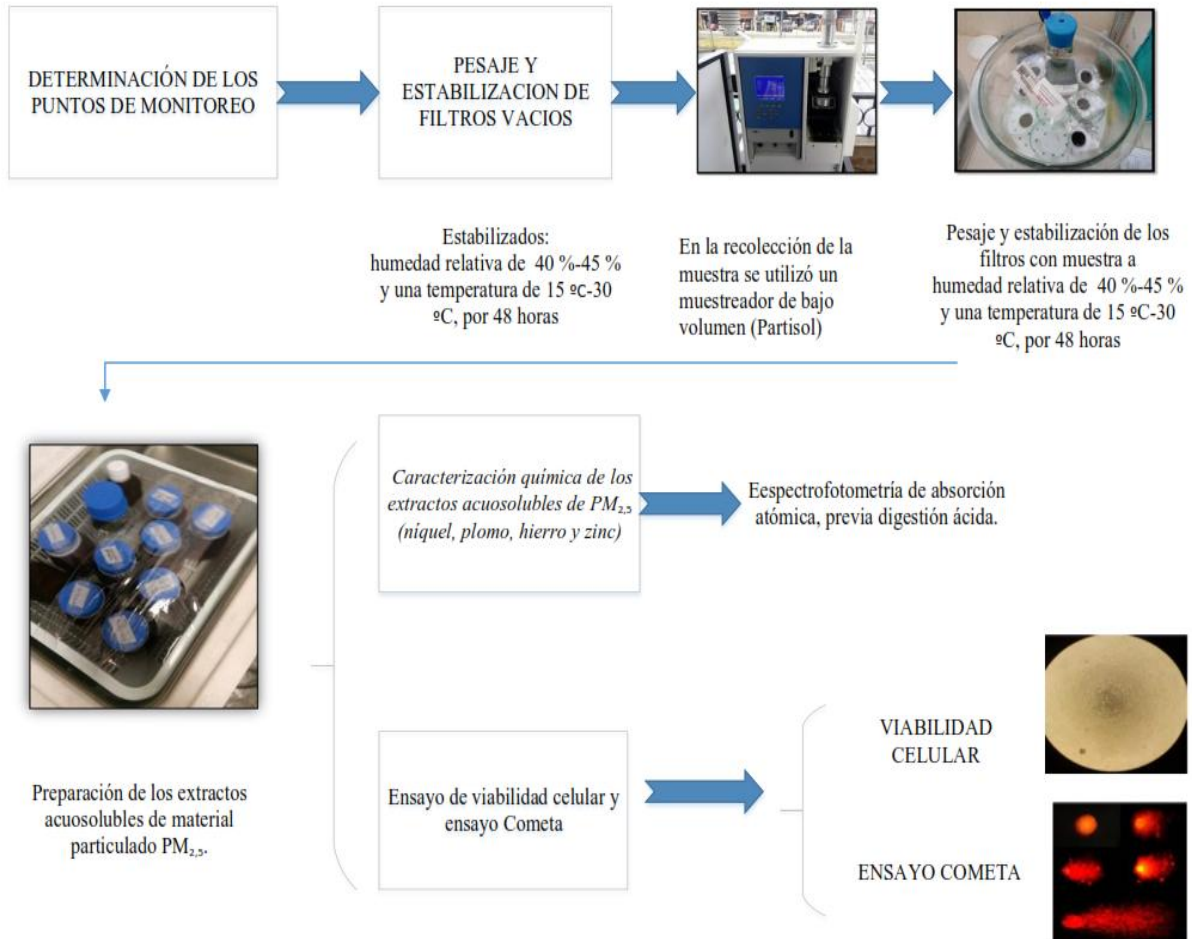


Figura 8: *Flujograma del proceso*

Fuente: Autor

3.4.1. Recolección de las muestras

Las muestras de PM_{2.5} se recolectaron mediante método gravimétrico con un muestreador de bajo caudal (Partisol 2000i), referencia 40 CFR Part 50 (TULSMA., 2003) El equipo cuenta con separador de partículas finas de diámetro aerodinámico de 2,5µm, localizado en la entrada del aire.

El muestreador operó 24 horas, con un flujo aproximado de 16,3 L/min. Se utilizaron filtros de fibra de teflón de 47 mm, 2 μm . El equipo fue colocado a 7,5 m de altura, las muestras fueron recolectadas durante un período de seis meses (dos meses por cada punto de estudio).

El Partisol está equipado con un mecanismo para encenderse automáticamente al iniciar un período de muestreo, además proporciona datos de temperatura y presión ambiental. La concentración en masa de material particulado $\text{PM}_{2,5}$, se calculó con la masa total de las partículas recogidas en el rango de tamaño deseado, dividido para el volumen real de aire muestreado, y se expresó en microgramos por metro cúbico de aire ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) (Rojano, Angulo, y Restrepo., 2013; Betancur Sánchez., 2016; Suárez y Augusto., 2012).

La figura 9 muestra el equipo empleado para la recolección y determinación de las muestras de $\text{PM}_{2,5}$.



Figura 9: *Equipo Partisol*
Fuente: *Autor*

3.5. Estabilización de filtros y corrección de las concentraciones de $PM_{2,5}$

Tomando en referencia lo indicado por Balcarce., 2009. Los filtros fueron pesados vacíos y posteriormente estabilizados a una humedad relativa que varió entre 40 % y 45 % y una temperatura de 15 °C a 30 °C, por 48 horas (peso 1).

Los filtros con muestras fueron pesados y estabilizados a una humedad relativa de 40 % a 45 % y una temperatura de 15 °C a 30 °C (peso 2).

La concentración de las partículas fue definida por análisis gravimétrico en ($\mu\text{g}/\text{m}^3$).

Se realizó la corrección de las concentraciones como lo indica la norma ecuatoriana en el Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria, del Ministerio del Ambiente, tomando en cuenta la temperatura y presión que reportaba el equipo, utilizando la ecuación 1:

$$C_c = C_o \times \frac{760\text{mmHg}}{P_{bl}\text{mmHg}} \times \frac{(273 + t^{\circ}\text{C})^{\circ}\text{K}}{298^{\circ}\text{K}}$$

En donde:

C_c = Concentración corregida

C_o = Concentración observada

P_{bl} = Presión atmosférica local en mmHg

$t^{\circ}\text{C}$ = Temperatura local en °C

Ecuación 1: Corrección de las concentraciones

La figura 10, presenta un registro fotográfico de la estabilización de los filtros



Figura 10: Filtros estabilizándose

Fuente: Autor

3.6. Determinación de las concentraciones de zinc, plomo, hierro, níquel en las muestras de PM_{2,5} del aire de la ciudad de Cuenca.

3.6.1. Preparación de los extractos acuosolubles de PM_{2,5}.

Para la extracción de los filtros se utilizó agua doblemente desionizada, vía ultrasonicación durante 15 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 2.500 g (g: gravedad) durante 30 min para sedimentar la materia insoluble. Se retiró el fluido sobrenadante de los filtros, el cual fue transvasado cuantitativamente, filtrado y aforado a un volumen conocido, se colocaron en frascos de vidrio ámbar y se almacenaron en refrigeración hasta su posterior análisis (Gutiérrez et al., 2006; Ortiz., 2004; Astudillo et al., 2015). La figura 11, presenta imágenes de la obtención del extracto acuoso.

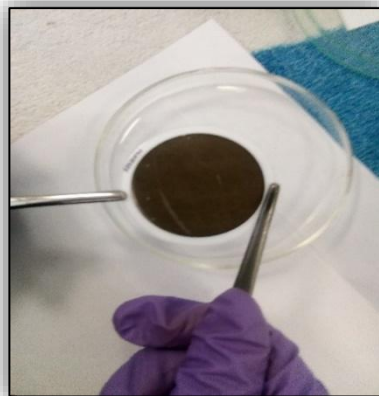


Figura 11: *Obtención del extracto acuoso*
Fuente: *Autor*

Para el análisis químico de níquel, zinc, plomo, hierro, se utilizó espectrofotometría de absorción atómica de acuerdo a lo determinado en los métodos de análisis de PerKin Elmer, previa digestión ácida de las muestras en una solución de ácido nítrico y ácido clorhídrico. Para asegurar la calidad de los resultados analíticos se digieren blancos de filtros y patrones de referencia, siguiendo las mismas pautas que con las muestras (Parra et al., 2010; Lodhi, Ghauri, Khan, Rahman y Shafique., 2009).

El análisis de los metales pesados lo realizó personal técnico del Centro de Servicios y Análisis de Minerales (CESEMIN) de la Universidad de Cuenca.

La figura 12, presenta imágenes del extracto acuoso para su posterior análisis.



Figura 12: *Extracto acuoso*
Fuente: *Autor*

3.7. Ensayo de Viabilidad Celular

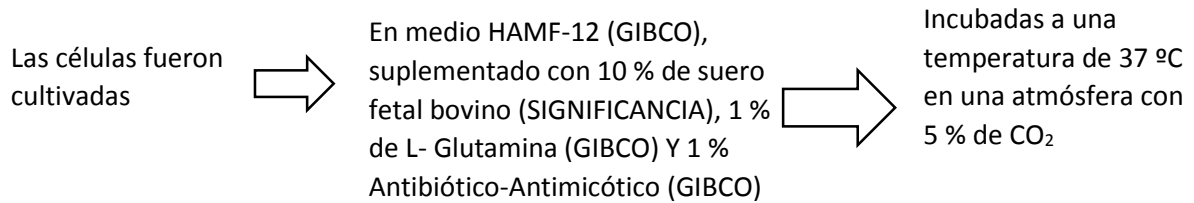
3.7.1. Modelo Biológico

Para los ensayos de viabilidad y ensayo cometa se usó la línea celular proveniente del ovario de hámster chino (CHO-K1) donadas por el Centro de Biología Celular y Molecular de la Universidad Técnica Particular de Loja.



3.7.2. Condiciones del cultivo

Para este ensayo se utilizó la línea celular proveniente del ovario de hámster chino (CHO-K1).



3.7.3. Controles

Como control Positivo, se usó Doxorrubicina en una concentración 2 μ M, para el control negativo se empleó el cultivo de células sin tratamiento alguno, además se trabajó con un blanco que corresponde al cultivo de células y la solución acuosa del lavado de filtros.

3.7.4. Siembra y Cosecha

Para el ensayo de viabilidad celular y genotoxicidad se sembraron los cultivos anteriormente preparados, luego de ser removidas con 1 mL de tripsina; y se incubó durante 24 horas, transcurrido este tiempo se colocó nuevo medio con la concentración de la suspensión acuosa de material particulado PM_{2,5} a probar 1,63 m³/mL (metros cúbicos de aire por mililitro de extracto acuoso). Además, se aplicaron los controles positivo, negativo y blanco. Las células se incubaron por 24 horas más.

Para recoger las células tratadas con PM_{2,5} se pasaron a tubos cónicos de 15 mL, se centrifugó a 500 rpm por 5 minutos, se desechó el medio y se resuspendió el pellet obtenido 1 ml con medio de HAMF-12, se pasó a tubos de 1,5 mL, se centrifugó a 1000 rpm por 2 minutos, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el pellet con 40 μ L de medio HAMF-12 suplementado.



3.7.5. Viabilidad mediante el ensayo de doble tinción de FDA-EtBr

La viabilidad de los ensayos se determinó mediante la siguiente técnica: Se tomaron 20 μL de la resuspensión, los cuales se mezclaron con 20 μL de la solución de FDA-EtBr (Diacetato de Fluoresceína 5 mg/mL – Bromuro de Etidío 1 mg/ 5 mL), posterior a ello, se colocó la muestra en una placa de portaobjetos, y se observó en el microscopio de fluorescencia las células vivas. Se contabilizaron 200 células por placa entre vivas y muertas. Las teñidas de color rojo indican muerte celular y las teñidas de color verde indican que están vivas.

3.7.6. Ensayo cometa

A 25 μL de la suspensión cosechada se añadió 150 μL de agarosa de normal punto de fusión al 0,5 % de esta suspensión se colocó 75 μL en dos laminillas y se les cubrió inmediatamente con un cubreobjetos cada una, se refrigeró por 10 minutos, transcurrido el tiempo, retirando previamente el cubreobjetos se añadió 300 μL de agarosa de bajo punto de fusión y se volvió a poner los cubreobjetos, se refrigeró a 4 °C por 10 minutos más, pasado el tiempo se retiró los cubreobjetos de las laminillas y se colocó solución de lisis (1 mL de tritón X-100, y 99 mL de solución lisis madre). La solución lisis madre fue preparada a partir de agua desionizada, NaCl, EDTA, tris base e NaOH a pH 10, Estos coupling fueron refrigerados por un tiempo de 24 hora a 4 °C.

Se dejó reposar las laminillas en el buffer de electroforesis pH > 13 (300 mM NaOH y 1 mM EDTA) por 20 minutos, cubriendo completamente las laminillas.

Luego de este tiempo se ejecutó la corrida electroforética horizontalmente, terminada la corrida las laminillas se lavaron con buffer de neutralización pH 7.5 (0,4 M tris), y para su análisis posterior fueron deshidratadas con etanol 96 %.



Para la observación del daño al ADN provocado por las soluciones acuosolubles de PM_{2,5} los portaobjetos fueron hidratados con agua desionizada fría y se tiñeron con 60 µL de bromuro de Etidio (30 µg/ml).

Los ensayos se realizaron por cuadruplicado, incluido los controles. Para la cuantificación del daño genotóxico se evaluó la migración del DNA contabilizando visualmente 100 cometas por placa, en un microscopio de fluorescencia (Zeiss) con el objetivo 40x. Con estos resultados el software determina valores de la longitud, momento e intensidad de la cola del cometa

Se cuantificó el índice de daño producido, según las categorías establecidas por Carballo et al., (2005) y Guilherme et al., (2010), el mismo que indica 4 a 5 categorías determinadas por el largo de cola e intensidad del cometa

Categoría 0: No hay daño (<5 µm)

Categoría I: (5 µm -20 µm)

Categoría II: Medio (20 µm -40 µm)

Categoría III: Alto (40 µm -80 µm)

Categoría IV: Células totalmente dañadas (>80 µm)

La puntuación total, indicada como índice de daño genético (IDG), se calculó multiplicando el porcentaje medio de células de cada clase por el factor correspondiente, con la siguiente ecuación:

$$IDG = \frac{[(n0 * 0) + (n1 * 1) + (n2 * 2) + (n3 * 3) + (n4 * 4)]}{total\ de\ células}$$

Ecuación 2: *índice de daño genotóxico*

En donde:

n0: número de células en la categoría 0

n1: número de células en la categoría 1

n2: número de células en la categoría 2

n3: número de células en la categoría 3

n4: número de células en la categoría 4

Expresando los resultados como unidades arbitrarias (UA)



Para el análisis de genotoxicidad se trató las células con la concentración de las suspensiones acuosas de material particulado $PM_{2,5}$ de $1,63 \text{ m}^3/\text{mL}$; para ser cosechadas y analizadas. Los controles fueron los mismos que para las pruebas de viabilidad y se realizaron cuatro réplicas.

3.8. Análisis Estadístico

Los datos resultantes se trabajaron con el programa IBM-SPSS™ versión 23.0 y GraphPad Prism 8.0.

Las concentraciones fueron tratadas con las siguientes pruebas: ANOVA, Kruskal-Wallis, test de comparación múltiple de Dunn, U de Mann-Whitney, además se usó el programa Grapher 8 para la elaboración de los gráficos.



4. RESULTADOS

4.1. Concentración del material particulado 2,5 (PM_{2,5})

El análisis estadístico descriptivo muestra que las concentraciones promedio de PM_{2,5} registradas en los tres sitios de monitoreo oscilan entre 19,93 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Sector Basílica Universidad Católica de Cuenca) y 37,31 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Av. de las Américas, sector Coral Centro), cumpliendo con el valor referencial estipulado en la normativa nacional (50,0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$); sin embargo sobrepasan el límite establecido por OMS (25,0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$); a excepción del punto localizado en el sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca (19,93 $\mu\text{g}/\text{m}^3$).

Las concentraciones mínimas de las zonas estudiadas son 5,44 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca); 16,09 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Gaspar Sangurima y Luis Cordero) y 16,20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Av. de las Américas sector Coral Centro) encontrándose dentro de los valores referenciales establecidos en las normativas nacional e internacional.

La concentración máxima de PM_{2,5} de las zonas Gaspar Sangurima (59,56 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) y en la Av. de las Américas Sector Coral Centro (60,13 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) sobrepasan el valor referencial estipulado en la Normativa Nacional, a excepción del punto localizado en el sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca (38,52 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), y todos los valores máximos sobrepasan la normativa descrita por la OMS (Tabla 5).

Tabla 5. *Análisis estadístico descriptivo de las tres zonas de estudio*

	Concentración promedio $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Concentración mínima $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Concentración máxima $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Desviación estándar
Gaspar Sangurima y Luis Cordero	29,81	16,09	59,56	11
Basílica de la Universidad Católica de Cuenca	19,93	5,44	38,52	10
Av. de las Américas sector Coral Centro	37,31	16,20	60,13	14

Fuente: Autor



4.1.1. Prueba de Kolmogorov-Smirnov, prueba de Kruskal-Wallis, prueba de Medianas.

Al aplicar la prueba de normalidad Kolmogórov-Smirnov, se obtuvo un valor de significancia de 0,001 indicando que la distribución de los datos no es normal (tabla 6).

Tabla 6: Prueba de normalidad Kolmogórov-Smirnov

Prueba de normalidad Kolmogórov-Smirnov			
Hipótesis	Estadísticos	gl	Sig.
Los datos de PM _{2,5} presentan una distribución normal.	0,146	66	0,001

Fuente: Autor

Se aplica la prueba de Medianas y Kruskal-Wallis para muestras independientes, obteniendo un valor de nivel de significatividad igual a 0,007 y 0,02 respectivamente; por lo tanto, existe diferencia significativa entre los datos de las zonas en estudio (tabla 7, figura 13).

Tabla 7: Resumen de la prueba de Medianas y Kruskal-Wallis para muestras independientes.

Resumen de contrastes de hipótesis			
Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
Las medianas de PM _{2,5} son las mismas entre las categorías de Zona	Prueba de Medianas para muestras independientes	0,007	Rechaza la hipótesis nula
La distribución de PM _{2,5} es la misma entre las categorías de Zona	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	0,002	Rechaza la hipótesis nula
Se muestra significaciones asintóticas. El nivel de significación es 0,05			

Fuente: Autor

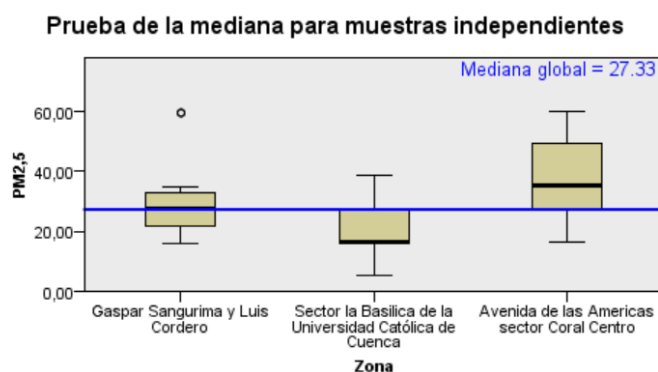


Figura 13: Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes

Fuente: Autor

En la tabla 8 se observa que existe diferencia significativa entre el sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca en relación con Gaspar Sangurima y Luis Cordero



(significatividad = 0,023), y Avenidas de las Américas sector Coral Centro (significatividad = 0,001). Además, se determinó que no existe diferencia significativa entre los puntos Gaspar Sangurima y Av. Américas sector Coral Centro (significatividad: 0,152).

Tabla 8: Resumen de la prueba de U de Mann Whitney para muestras independientes.

Hipótesis nula	Prueba	Significatividad	Decisión
	U de Mann-Whitney	100	
Sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca.	W de Wilcoxon	353	Rechaza la hipótesis nula
Avenida de las Américas sector Coral Centro son iguales	Z	-3,33	
	Sig. asintótica (bilateral)	,001	
	U de Mann-Whitney	145	
Sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca.	W de Wilcoxon	398	Rechaza la hipótesis nula
Gaspar Sangurima y Luis Cordero entre las categorías de Zona	Z	-2,27	
	Sig. asintótica (bilateral)	,023	
	U de Mann-Whitney	181	
Gaspar Sangurima y Luis Cordero.	W de Wilcoxon	434	Se acepta la hipótesis
Avenida de las Américas sector Coral Centro	Z	-1,43	
	Sig. asintótica (bilateral)	,152	

Se muestra significaciones asintóticas. El nivel de significación es 0,05

Fuente: Autor

4.1.2. Análisis de las concentraciones obtenidas en los tres puntos de monitoreo

La figura 14 presenta las concentraciones de PM_{2,5}; registradas en los tres puntos de monitoreo durante dos meses en cada uno.

Las concentraciones registradas durante el monitoreo en las calles Gaspar Sangurima y Luís Cordero, demuestran que un 72,77 % superan la normativa establecida en la OMS y un 9,09 % supera la normativa nacional (TULSMA).

En el sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca las concentraciones cumplen con lo establecido en el TULSMA, sin embargo, el 31.8 % de estas sobrepasan la normativa de la OMS.

En la Avenida de las Américas sector Coral Centro el 13,63 % de las concentraciones superan el valor referencial dado por la normativa nacional, y el 81,81 % sobrepasan la normativa de la OMS.

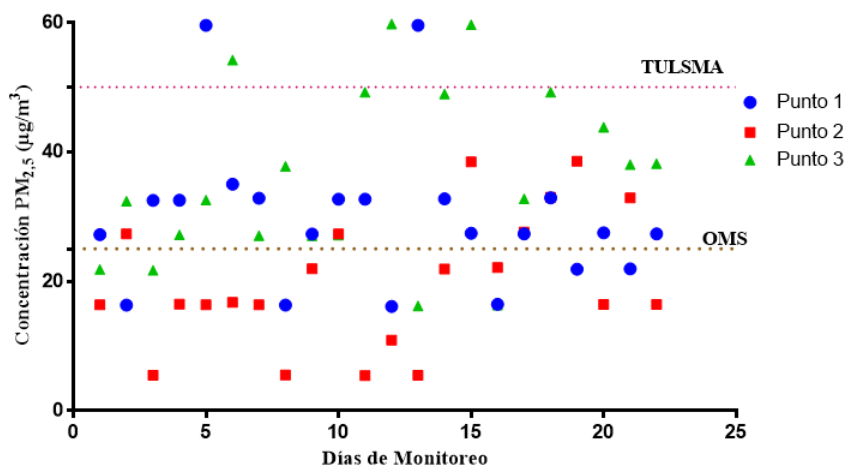


Figura 14: Concentración de Material Particulado_{2,5} en los tres puntos de monitoreo.

Fuente: Autor

4.2. Caracterización del Material Particulado PM_{2,5}

Los resultados del análisis de absorción atómica no registran valores para níquel, plomo y cadmio, sin embargo, se registran concentraciones de hierro y zinc.

La tabla 9 muestra que la máxima concentración de hierro se reporta para la Av. de las Américas Sector Coral Centro, con un valor de 2,25 mg/L, mientras que la concentración de 1,42 mg/L se registra para la Av. Gaspar Sangurima y Luis Cordero. Para el zinc las concentraciones varían entre 0,10 mg/L en el Sector de la Basílica de la Universidad Católica de Cuenca y 0,19 mg/L en Av. de las Américas Sector Coral Centro.

Debido a los límites de detección de cadmio (0,038 mg/L), plomo (0,15 mg/L), y níquel (0,10 mg/L) de la técnica usada por el CESEMIN, se puede concluir que no existen concentraciones mayores a estos valores, sin embargo, no se puede afirmar que no existen estos metales en las mismas.

**Tabla 9:** Metales pesados presentes en el Material Particulado 2,5 de los tres sitios de monitoreo

MUESTRA	Fe mg/L	Zn mg/L	Ni mg/L	Pb mg/L	Cd mg/L
Gaspar Sangurima y Luis Cordero	1,42	0,11	N.C	N.C	N.C
Sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca	1,46	0,10	N.C	N.C	N.C
Avenida de las Américas Sector Coral Centro	2,25	0,19	N.C	N.C	N.C

Fuente: Autor

Resultados laboratorio CESEMIN

OBSERVACIONES:

- N.C: No cuantificado
- Límite de detección de cadmio: 0,038 mg/L
- Límite de detección de Plomo: 0,15 mg/L
- Límite de detección del Níquel: 0,10mg/L
- Límite de detección del Hierro: 0,027mg/L.

Se visualiza que, en todos los puntos de muestreo, sobrepasan la normativa canadiense para zinc ($0,12 \text{ mg/m}^3$).

4.3. Evaluación del daño celular producido por las sustancias presentes en los extractos acuosos del PM_{2,5} sobre línea celular ovárica de hámster chino (CHO-K1)

El objetivo principal de esta investigación fue evaluar si los extractos acuosos del PM_{2,5} de tres zonas diferentes de Cuenca producían daño sobre la línea celular.

Antes de realizar las pruebas de genotoxicidad es primordial demostrar que el daño citotóxico no está interviniendo en el efecto genotóxico, por lo tanto, se realizó un estudio del porcentaje de viabilidad de las células utilizando el ensayo de tinción FDA-BrEt.

4.3.1. Viabilidad del extracto acuoso de material particulado 2,5 en la línea celular ovárica de hámster chino.

Se realizó la prueba de viabilidad en la línea celular ovárica de hámster chino (CHO-K1), la cual se expuso a los extractos acuosos del PM_{2,5} recolectado en tres zonas de la ciudad de Cuenca a una concentración de $1,63 \text{ m}^3/\text{mL}$ por un período de 24 horas, de igual forma se trató con los controles positivo, negativo y blanco.

El porcentaje de viabilidad para proseguir con el análisis de genotoxicidad fue el recomendado ($>70 \pm 5\%$).

La tabla 10 registra el número de células vivas en las cuatro réplicas y el porcentaje de viabilidad.

Tabla 10: Porcentaje de viabilidad en las células ováricas de hámster chino (CHO- K1)

	Primera réplica	Segunda réplica	Tercera réplica	Cuarta réplica	promedio	% viabilidad
Control negativo	186	194	187	197	191,0	95,5
Blanco	199	183	199	194	193,75	96,87
Punto 1	181	184	180	182	181,75	90,87
Punto 2	182	177	197	186	185,5	92,75
Punto 3	179	174	190	183	181,5	90,75
Control positivo	170	190	186	177	180,75	90,37

Fuente: Autor

En la figura 15 se representa el porcentaje de las células ováricas de hámster chino CHO-K1 vivas en cada punto de muestreo, control positivo, negativo y blanco, se puede observar que las viabilidades van desde 90,37 % que corresponde al control positivo hasta 96,5 % blanco. Se realizó el análisis estadístico no paramétrico, One way (ANOVA), análisis de varianza Kruskal-Wallis ($P > 0,005$), no existe diferencia significativa entre los puntos del muestreo.

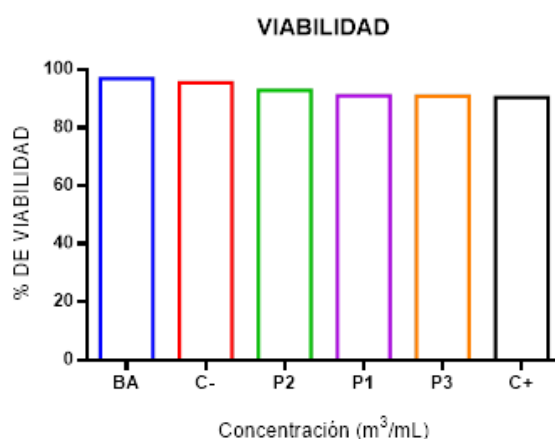


Figura 15: Porcentaje de viabilidad en células ováricas de hamster chino CHO-K1 del ensayo a $1,63 \text{ m}^3/\text{mL}$ por un periodo de 24 horas.

Fuente: Autor

*B (Blanco), C-(control negativo), punto 2 (sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca), punto 1 (Gaspar Sangurima), punto 3 (Av. Américas sector Coral Centro).



4.3.2. Ensayo de Cometa

4.3.2.1. Análisis de la longitud de la cola del cometa (formada por fragmentos nucleares que han migrado en dirección del ánodo), obtenidas en el bioensayo.

En el análisis estadístico descriptivo del daño en el ADN de las células ováricas de hámster chino CHO-K1, usando una concentración de $1,63 \text{ m}^3/\text{mL}$, en referencia la longitud de la cola del cometa se puede observar que los valores mínimos varían de $0,50 \text{ }\mu\text{m}$ (control positivo) a $23,43 \text{ }\mu\text{m}$ (Sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca y Av. Américas sector Coral Centro). El valor máximo oscila desde $162,5 \text{ }\mu\text{m}$ (control negativo) a $267,4 \text{ }\mu\text{m}$ (control positivo). Las medias varían desde $43,8 \text{ }\mu\text{m}$ (blanco) a $91,25 \text{ }\mu\text{m}$ (control positivo).

En el test de normalidad de D'Agostino y Pearson el valor de significancia es menor a 0,05 por lo cual se concluye que los datos no presentan una distribución normal (tabla 11).

Tabla 11. Análisis estadístico descriptivo del largo de la cola (μm)

	B (Blanco)	C- (Control Negativo)	Punto 1	Punto 2	Punto 3	C+ (Control Positivo)
Número de Valores	312	226	402	407	405	402
Máxima	184,4	162,5	214,9	209,8	191,5	267,4
Mínima	20,37	6,62	21,39	23,43	23,43	0,50
Mediana	43,8	45,84	57,05	64,69	48,39	93,21
Media	55,83	52,4	74,77	80,77	60,52	91,25
Desviación estándar	32,81	24,89	39,07	42,64	34,12	44,47
Prueba de normalidad D'Agostino & Pearson.						
K2	124,5	103,1	42,55	37,89	136,7	8,63
Valor de p	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0.0133
¿Pasó la prueba de normalidad (alfa = 0,05)?	No	No	No	No	No	No
Resumen de valores de p	****	****	****	****	****	*

Fuente: Autor

4.3.2.1.1. Prueba de Kruskal-Wallis, Test de comparación múltiple de Dunn en valores obtenidos en la longitud de la cola.

Se aplica la prueba Kruskal-Wallis para muestras independientes, obteniendo un valor de



significancia menor a 0,0001 indicando que existe diferencia significativa entre los datos de las zonas en estudio (tabla 12).

Tabla 12: Resumen de la prueba Kruskal-Wallis para muestras independientes.

Test de Kruskal-Wallis	
Tabla analizada	longitud de la cola
Valor de P	<0,0001
Valor de P exacto o aproximado	Aproximado
Resumen de valores de P	****
¿Las medianas varían significativamente? ($P < 0.05$)?	Si
Número de grupos	6
Estadística de Kruskal-Wallis.	242,9
Resumen de datos	
Número de tratamientos (columnas)	6
Número de valores (total)	2154

Fuente: Autor

Al aplicar el test de comparación múltiple de Dunn, (tabla 13) se puede observar que existe diferencias significativas entre el punto 1 (Gaspar Sangurima y Luis Cordero) y punto 2 (Sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca) con respecto al control negativo sin embargo no existe diferencia significativa con el punto 3 (Av. de las Américas Sector Coral Centro).

Tabla 13: Test de comparación múltiple de Dunn de Longitud de la Cola

Prueba de comparaciones múltiples de Dunn	Significativo	Resumen
B (Blanco) vs. C- (Control negativo)	No	ns
B (Blanco) vs. P1 (Gaspar Sangurima y Luis Cordero)	Si	****
B (Blanco) vs. P2 (Sector Basílica)	Si	****
B (Blanco) vs. P3 (Av. de las Américas sector Coral Centro)	No	ns
B (Blanco) vs. C+ (Control Positivo)	Si	****
C- (Control negativo) vs. P1 (Gaspar Sangurima y Luis Cordero)	Si	****
C- (Control Negativo) vs. P2 (Sector Basílica)	Si	****
C- (Control Negativo) vs. P3(Av. de las Américas sector Coral Centro)	No	ns
C- (Control Negativo) vs. C+ (Control Positivo)	Si	****
P1 (Gaspar Sangurima y Luis Cordero) vs. P2 (Sector Basílica)	No	ns
P1 (Gaspar Sangurima y Luis Cordero) vs. P3 (Av. de las Américas sector Coral Centro)	Si	****
P1 (Gaspar Sangurima y Luis Cordero) vs. C+ (Control Positivo)	Si	***
P2 (Sector Basílica) vs. P3 (Av. de las Américas sector Coral Centro)	Si	****
P2 (Sector Basílica) vs. C+ (Control Positivo)	No	ns
P3 (Av. de las Américas sector Coral Centro) vs. C+ (Control Positivo)	Si	****
Alpha	0,05	

Fuente: Autor

****: < 0,0001; ***: 0,0001

En la figura 16 se puede observar el daño en el ADN con respecto al valor de la media de la longitud de la cola del cometa de las células ováricas de hámster chino CHO-K1, usando una concentración de $1,63 \text{ m}^3/\text{mL}$, en donde se aprecia que van en el siguiente orden: $52,40 \mu\text{m}$ (control negativo); $55,83 \mu\text{m}$ (blanco); $60,52 \mu\text{m}$ (punto 3, Av. de las Américas Sector Coral Centro); $74,77 \mu\text{m}$ (punto 1, Gaspar Sangurima y Luis Cordero); $80,77 \mu\text{m}$ (punto 2, Sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca) y $91,25$ (control positivo).

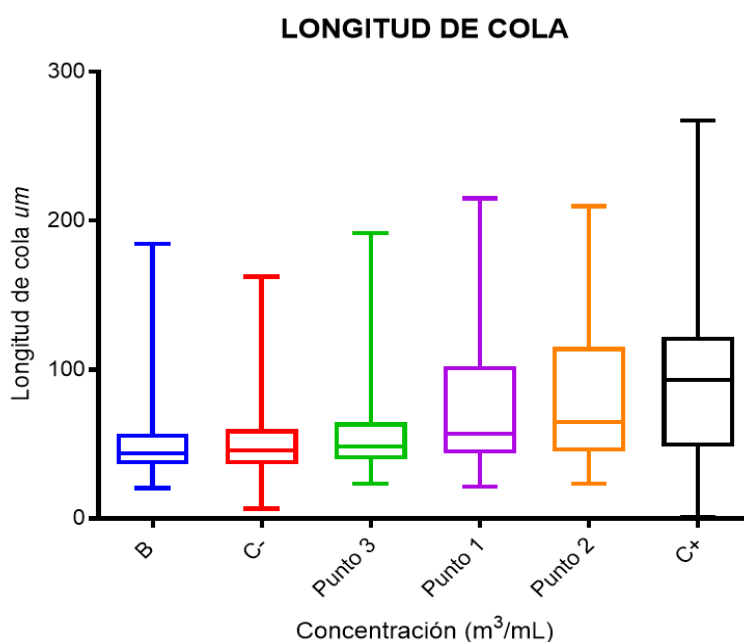


Figura 16: Daño en el ADN con respecto al valor de la media de la longitud de la cola del cometa de las células ováricas de hámster chino CHO-K, usando una concentración de $1,63 \text{ m}^3/\text{mL}$.

Fuente: Autor

*B (Blanco), C-(control negativo), punto 2 (sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca), punto 1 (Gaspar Sangurima), punto 3 (Av. de las Américas sector Coral Centro).

4.3.2.2. Análisis del momento de la cola (producto del porcentaje del ADN en el cometa, y la media entre la distancia de la cabeza y la cola) obtenidas en el bioensayo

En el análisis estadístico descriptivo del momento de la cola presenta valores mínimos de $0 \mu\text{m}$ en todos los puntos analizados. El valor máximo varía de $74,32 \mu\text{m}$ (control negativo) a $110,60 \mu\text{m}$ (punto 3, Av. de las Américas sector Coral Centro). Las medias oscilan desde $4,36 \mu\text{m}$ (control negativo) a $18,69 \mu\text{m}$ (control positivo). En el test de normalidad de



D'Agostino y Pearson el valor de P de los puntos es menor a 0,0001, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula, concluyendo que los datos no presentan distribución normal (tabla 14).

Tabla 14. Análisis estadístico descriptivo del momento de la cola (μm).

	B (Blanco)	C- (Control negativo)	Punto 1	Punto 2	Punto 3	C+ (Control Positivo)
Número de Valores	312	226	402	407	405	402
Máxima	85,11	74,32	91,19	95,65	110,6	101,3
Mínima	0	0	0	0	0	0
Mediana	1,56	1,285	3,88	4,3	1,67	14,24
Media	6,99	4,36	14,07	15,36	8,45	18,69
Desviación estándar	14,08	9,77	19,76	21,06	17,16	18,63
Prueba de normalidad D'Agostino & Pearson.						
K2	220,5	243,1	111,5	116,5	243,5	115,8
Valor de p	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
¿Pasó la prueba de normalidad (alfa = 0.05)?	No	No	No	No	No	No
Resumen de valores de p	****	****	****	****	****	****

Fuente: Autor

4.3.2.2.1. Prueba de Kruskal-Wallis, test de comparación múltiple de Dunn en valores derivados del momento de la cola.

La prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes, registra un valor de significación menor a 0,0001 mostrando que existe diferencia significativa entre los datos de las zonas en estudio (tabla 15).

Tabla 15: Resumen de la prueba Kruskal-Wallis para muestras independientes

Test de Kruskal-Wallis	
Tabla analizada	momento de la cola
Valor de P	<0,0001
Valor de P exacto o aproximado	Aproximado
Resumen de valores de P	****
¿Las medianas varían significativamente? (P < 0.05)?	Si
Número de grupos	6
Estadística de Kruskal-Wallis.	229,3
Resumen de datos	
Número de tratamientos (columnas)	6
Número de valores (total)	2154

Fuente: Autor

En la tabla 16, se puede observar que existe diferencias significativas entre el momento de la cola del control negativo, con el punto 1 (Gaspar Sangurima y Luis Cordero) y punto 2



(Sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca) sin embargo no presentan diferencia significativa con el punto 3 (Av. de las Américas Sector Coral Centro).

Tabla 16: Test de comparación múltiple de Dunn del momento de cola (μm)

Prueba de comparaciones múltiples de Dunn	Significativo	Resume
B (Blanco) vs. C- (Control negativo)	No	ns
B (Blanco) vs. P1 (Gaspar Sangurima y Luis Cordero)	Si	****
B (Blanco) vs. P2 (Sector Basílica)	Si	****
B (Blanco) vs. P3 (Av. de las Américas sector Coral Centro)	No	ns
B (Blanco) vs. C+ (Control Positivo)	Si	****
C- (Control negativo) vs. P1 (Gaspar Sangurima y Luis Cordero)	Si	****
C- (Control Negativo) vs. P2 (Sector Basílica)	Si	****
C- (Control Negativo) vs. P3(Av. de las Américas sector Coral Centro)	No	ns
C- (Control Negativo) vs. C+ (Control Positivo)	Si	****
P1 (Gaspar Sangurima y Luis Cordero) vs. P2 (Sector Basílica)	No	ns
P1 (Gaspar Sangurima y Luis Cordero) vs. P3 (Av. de las Américas sector Coral Centro)	Si	****
P1 (Gaspar Sangurima y Luis Cordero) vs. C+ (Control Positivo)	Si	****
P2 (Sector Basílica) vs. P3 (Av. de las Américas sector Coral Centro)	Si	****
P2 (Sector Basílica) vs. C+ (Control Positivo)	Si	****
P3 (Av. de las Américas sector Coral Centro) vs. C+ (Control Positivo)	Si	****
Alpha	0,05	

Fuente: Autor

****: $< 0,0001$

La figura 17 muestra el momento de la cola de las células ováricas de hámster chino CHO-K1, usando una concentración de $1,63 \text{ m}^3/\text{mL}$, en el mismo se puede observar que las medias registran valores de: $4,36 \mu\text{m}$ (control negativo); $6,99 \mu\text{m}$ (blanco); $8,45 \mu\text{m}$ (punto 3, Av. de las Américas Sector Coral Centro); $14,07 \mu\text{m}$ (punto1, Gaspar Sangurima y Luis Cordero); $15,36 \mu\text{m}$ (punto 2, Sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca) y $18,69 \mu\text{m}$ (control positivo).

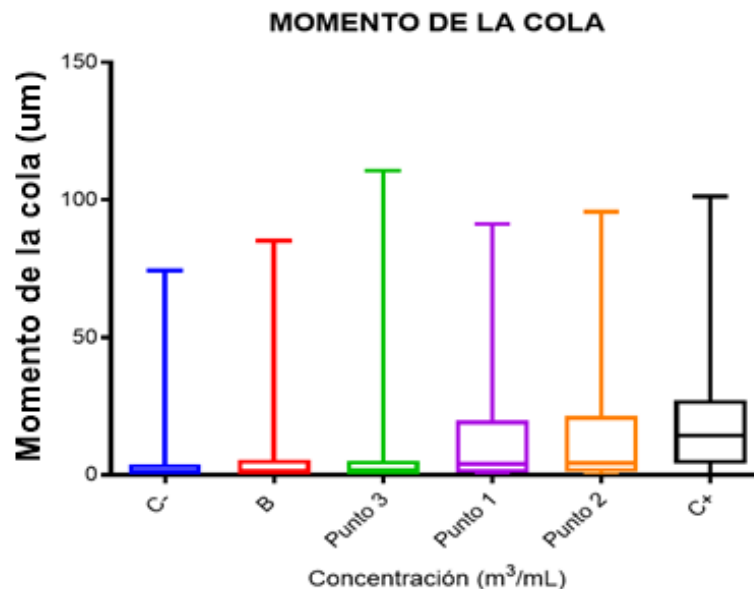


Figura 17: Momento del Cometa de las células ováricas de hámster chino CHO-K, usando una concentración de 1,63 m³/mL.

Fuente: Autor

*B (Blanco), C-(control negativo), punto 2 (sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca), punto 1 (Gaspar Sangurima), punto 3 (Av. de las Américas sector Coral Centro).

4.3.2.3. Análisis de la intensidad de la cola (número de fragmentos) obtenidas en el bioensayo.

La intensidad de la cola en el análisis estadístico descriptivo muestra un valor mínimo de cero en todos los puntos analizados, un valor máximo que va desde 96,41 % (control negativo) a 100 % (control positivo) un valor medio que oscila desde 12,83 % (control negativo) a 41,02 % (control positivo). Además, presenta un valor de P menor a 0,0001 en el test de normalidad de D'Agostino y Pearson, por ende, se concluye que presenta una distribución asimétrica. (tabla 17).

**Tabla 17.** Análisis estadístico descriptivo la intensidad de la cola (%)

	B (Blanco)	C- (Control Negativo)	Punto 1	Punto 2	Punto 3	C+ (Control Positivo)
Número de Valores	312	226	402	407	405	402
Máxima	99,15	96,41	99,37	99,37	99,19	100
Mínima	0	0	0	0	0	0
Mediana	8,41	6,49	17,63	20,13	7,7	41,39
Media	17,95	12,83	29,43	30,5	18,82	41,02
Desviación estándar	23,2	16,94	29,67	29,73	25,36	27,2
Prueba de normalidad D'Agostino & Pearson.						
K2	95,62	114,7	56,1	58,1	117,9	49,11
Valor de p	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
¿Pasó la prueba de normalidad (alfa = 0.05)?	No	No	No	No	No	No
Resumen de valores de p	****	****	****	****	****	****

Fuente: Autor

4.3.2.3.1. Prueba de Kruskal-Wallis, test de comparación múltiple de Dunn de valores derivados de la intensidad de la cola.

Se obtuvo un valor de significancia menor a 0,0001 en la prueba Kruskal-Wallis para muestras independientes, demostrando que los datos no son iguales (tabla 18).

Tabla 18: Resumen de la prueba Kruskal-Wallis para muestras independientes.

Test de Kruskal-Wallis	
Tabla analizada	Intensidad de la Cola
Valor de P	<0,0001
Valor de P exacto o aproximado	Aproximado
Resumen de valores de P	****
¿Las medianas varían significativamente? (P < 0.05)?	Si
Número de grupos	6
Estadística de Kruskal-Wallis.	221,9
Resumen de datos	
Número de tratamientos (columnas)	6
Número de valores (total)	2154

Fuente: Autor

Al realizar el test de comparación múltiple de Dunn se determinó que la intensidad de la cola del punto 1 (Gaspar Sangurima y Luis Cordero) y punto 2 (Sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca) presentan diferencias significativas con respecto al control negativo. El punto 3 (Av. de las Américas Sector Coral Centro) no presenta diferencia con el control negativo (tabla 19).



Tabla 19: Test de comparación múltiple de Dunn de intensidad de cola (%)

Prueba de comparaciones múltiples de Dunn	Significativo	Resumen
B (Blanco) vs. C- (Control negativo)	No	ns
B (Blanco) vs. P1 (Gaspar Sangurima y Luis Cordero)	Si	****
B (Blanco) vs. P2 (Sector Basílica)	Si	****
B (Blanco) vs. P3 (Av. de las Américas sector Coral Centro)	No	ns
B (Blanco) vs. C+ (Control Positivo)	Si	****
C- (Control negativo) vs. P1 (Gaspar Sangurima y Luis Cordero)	Si	****
C- (Control Negativo) vs. P2 (Sector Basílica)	Si	****
C- (Control Negativo) vs. P3(Av. de las Américas sector Coral Centro)	No	ns
C- (Control Negativo) vs. C+ (Control Positivo)	Si	****
P1 (Gaspar Sangurima y Luis Cordero) vs. P2 (Sector Basílica)	No	ns
P1 (Gaspar Sangurima y Luis Cordero) vs. P3 (Av. de las Américas sector Coral Centro)	Si	****
P1 (Gaspar Sangurima y Luis Cordero) vs. C+ (Control Positivo)	Si	****
P2 (Sector Basílica) vs. P3 (Av. de las Américas sector Coral Centro)	Si	****
P2 (Sector Basílica) vs. C+ (Control Positivo)	Si	****
P3 (Av. de las Américas sector Coral Centro) vs. C+ (Control Positivo)	Si	****
Alpha	0,05	

Fuente: Autor
 ****: < 0,0001

La figura 18 ejemplifica la intensidad del cometa, en el cual las medias siguen el siguiente orden: 12,82 % (control negativo); 17,95 % (blanco); 18,82 % (punto 3, Av. de las Américas Sector Coral Centro); 29,43 % (punto 1, Gaspar Sangurima y Luis Cordero) 30,5 % (punto 2, Sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca) y 41,02 % (control positivo).

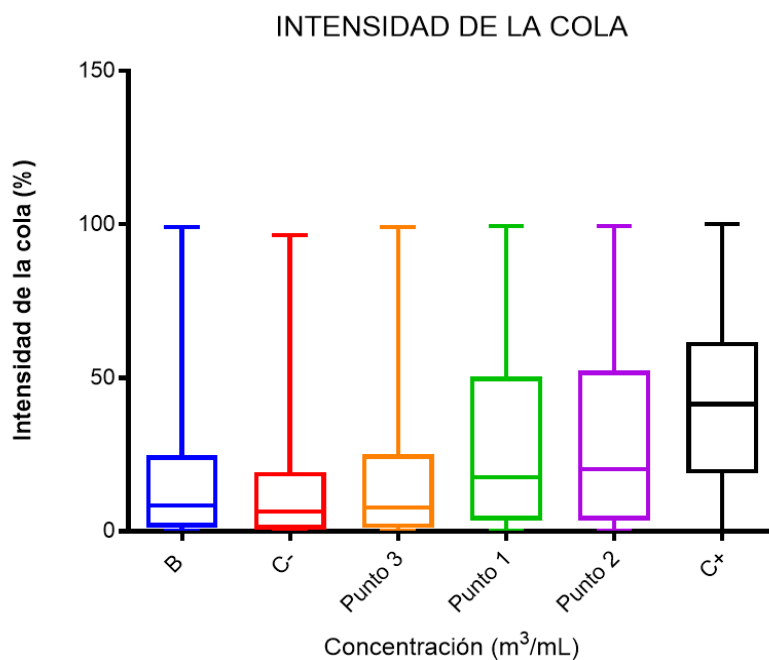


Figura 18: Intensidad del cometa de las células ováricas de hámster chino CHO-K, usando una concentración de 1,63 m³/mL.

Fuente: Autor

*B (Blanco), C-(control negativo), punto 2 (sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca), punto 1 (Gaspar Sangurima), punto 3 (Av. de las Américas sector Coral Centro).

4.3.2.4. Daño Celular

La magnitud del daño en el ADN se expresa en IDG (Índice de daño genotóxico), para ello se realizó el conteo en el centro de la agarosa de 100 células y se realizó la clasificación en grados diferentes (desde 0-4).

4.3.2.4.1. Análisis del Índice de daño genotóxico con relación a la intensidad de la cola.

En la tabla 20 se muestra el índice del daño celular con relación a la intensidad de la cola en los diferentes controles y puntos de muestreo, expresadas en UA (Unidades Arbitrarias).

**Tabla 20:** Índice de daño con relación a la intensidad de la cola del cometa.

	B (blanco)	C- (control negativo)	Punto 1	Punto 2	Punto 3	C+ (control positivo)
R1	0,87*	0,80*	1,08*	1,67*	1,20*	2,14*
R2	1,37*	0,89	1,26*	0,96*	0,38*	2,44*
R3	0,91	0,80*	2,2*	1,96*	1,18*	1,95*
R4	0,87*	0,89*	1,47*	1,71*	1,37*	1,94*

* UA (Unidades Arbitrarias)

Fuente: Autor

Al realizar las pruebas de Medianas y Kruskal-Wallis se puede rechazar la hipótesis nula (tabla 21) obteniendo un valor de significancia igual a 0,016 y 0,005 respectivamente.

Tabla 21: Resumen de contraste de hipótesis General del IDG intensidad de la cola del cometa

Hipótesis nula	Resumen de contrastes de hipótesis		
	Prueba	Sig.	Decisión
Las medianas de IDG intensidad, son la misma entre las categorías de Punto	Prueba de Medianas para muestra independientes	0,016	Rechaza la hipótesis nula
La distribución de IDG intensidad, son la misma entre las categorías de Punto	Prueba de Kruskal-Wallis para muestra independientes	0,005	Rechaza la hipótesis nula

Fuente: Autor

En la tabla 22 se puede observar que existe diferencia significativa entre el control negativo respecto al punto 1 (Gaspar Sangurima y Luis Cordero) y punto 2 (Sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca), sin embargo, no presentan diferencias significativas entre el control negativo y el punto 3 (Av. de las Américas Sector Coral Centro).



Tabla 22: Resumen de contrastes de hipótesis de IDG con relación a la intensidad, con respecto al control negativo (UA).

Hipótesis nula	Resumen de contrastes de hipótesis		Decisión
	Prueba	Sig.	
Control positivo y control negativo son iguales	U de Mann-Whitney	0,00	Rechaza la hipótesis nula
	W de Wilcoxon	10	
	Z	-2,33	
	Sig. asintótica (bilateral)	0,019	
	Significación exacta	0,029	
Control negativo y el punto 1 son iguales	U de Mann-Whitney	0,00	Rechaza la hipótesis nula
	W de Wilcoxon	10	
	Z	-2,33	
	Sig. asintótica (bilateral)	0,019	
	Significación exacta	0,029	
Control negativo y el punto 2 son iguales	U de Mann-Whitney	0,00	Rechaza la hipótesis nula
	W de Wilcoxon	10	
	Z	-2,33	
	Sig. asintótica (bilateral)	0,019	
	Significación exacta	0,029	
Control negativo y el punto 3 son iguales	U de Mann-Whitney	4	Acepta la hipótesis
	W de Wilcoxon	14	
	Z	-1,16	
	Sig. asintótica (bilateral)	0,243	
	Significación exacta	0,343	

Fuente: Autor

En la figura 19 se presenta el índice de daño genotóxico en relación a la intensidad de la cola, que sigue la tendencia expuesta anteriormente.

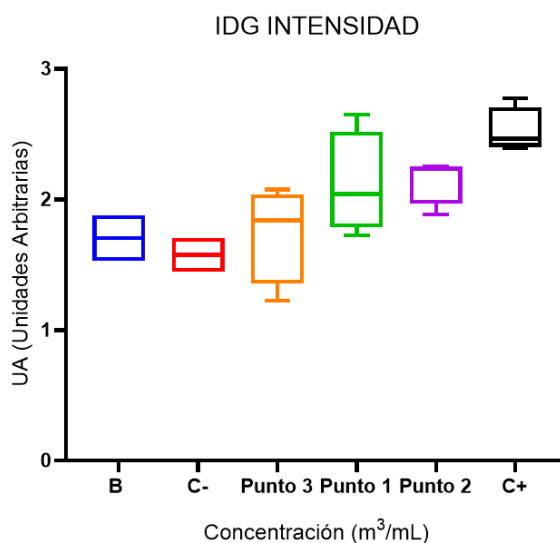


Figura 19: Índice de daño genotóxico con respecto a la intensidad

Fuente: Autor

*B (Blanco), C-(control negativo), punto 2 (sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca), punto 1 (Gaspar Sangurima), punto 3 (Av. de las Américas sector Coral Centro).

4.3.2.4.2. Análisis del Índice de daño genotóxico con relación a al largo de la cola el cometa

El índice de daño celular con respecto al largo de la cola se ejemplifica en la tabla 23, expresando en UA (Unidades Arbitrarias).

Tabla 23: Resumen de contraste de hipótesis General del IDG longitud de cola (UA).

	B (blanco)	C- (control negativo)	Punto 1	Punto 2	Punto 3	C+ (control positivo)
R1	2,73*	2,63*	2,89*	3,12*	2,88*	2,95*
R2	2,88*	2,78*	3,08*	2,86*	2,65*	3,56*
R3	2,68*	2,63*	3,45*	3,52*	2,97*	3,32*
R4	2,68*	2,78*	3,09*	3,27*	3,10*	3,4*

* UA (Unidades Arbitrarias)

Fuente: Autor

Al efectuar las pruebas de Medianas y Kruskal-Wallis sobre el índice de daño genotóxico con relación al largo de la cola se procede a rechazar la hipótesis nula obteniendo un valor de significancia igual a 0,016 y 0,009 respectivamente (tabla 24).

Tabla 24: Resumen de contraste de hipótesis General del IDG largo de cola (UA)

Resumen de contrastes de hipótesis			
Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
Las medianas de IDG largo de cola, son la misma entre las categorías de Punto	Prueba de Medianas para muestra independientes	0,016	Rechaza la hipótesis nula
La distribución IDG largo de cola, son la misma entre las categorías de Punto	Prueba de Kruskal-Wallis para muestra independientes	0,009	Rechaza la hipótesis nula

Fuente: Autor

En la tabla 25 se resume el contraste de hipótesis en relación al índice de daño genotóxico con relación a la longitud de la cola, en donde se demuestra que los datos del control negativo respecto al punto 1 (Gaspar Sangurima y Luis Cordero) y punto 2 (Sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca) muestran diferencias significativas, y con el punto 3 (Av. de las Américas Sector Coral Centro) no muestra diferencia significativa.



Tabla 25: Resumen de contrastes de hipótesis de IDG con respecto la longitud de la cola, con relación al control negativo.

Hipótesis nula	Resumen de contrastes de hipótesis		Decisión
	Prueba	Sig.	
Control positivo y control negativo son iguales	U de Mann-Whitney	0.000	Rechaza la hipótesis nula
	W de Wilcoxon	10.000	
	Z	-2.309	
	Sig. asintótica (bilateral)	0.021	
	Significación exacta	0.029	
Control negativo y el punto 1 son iguales	U de Mann-Whitney	0.000	Rechaza la hipótesis nula
	W de Wilcoxon	10.000	
	Z	-2.309	
	Sig. asintótica (bilateral)	0,021	
	Significación exacta	0.029	
Control negativo y el punto 2 son iguales	U de Mann-Whitney	.000	Rechaza la hipótesis nula
	W de Wilcoxon	10.000	
	Z	-2.309	
	Sig. asintótica (bilateral)	0.021	
	Significación exacta	0,029	
Control negativo y el punto 3 son iguales	U de Mann-Whitney	2.000	Acepta la hipótesis
	W de Wilcoxon	12.000	
	Z	-1.732	
	Sig. asintótica (bilateral)	0.083	
	Significación exacta	0,114	

Fuente: Autor

En la figura 20 se observa el índice de daño con respecto al largo de la cola, presentando el siguiente orden: Control negativo, Blanco, Punto 3 (Av. de las Américas Sector Coral Centro), punto 1 (Gaspar Sangurima y Luis Cordero), y punto 2 (Sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca), control positivo.

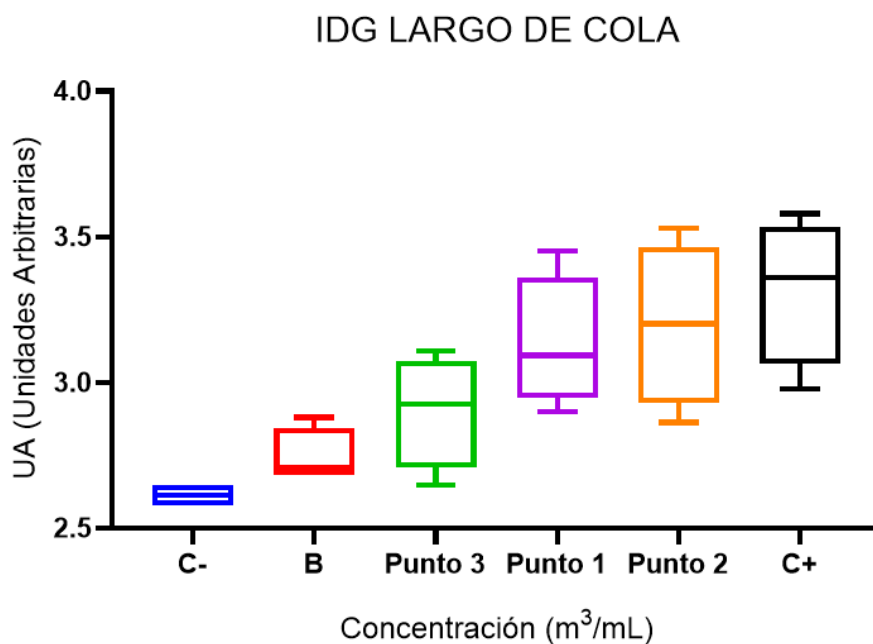


Figura 20: Índice de daño con relación con la longitud de cola

Fuente: Autor

*B (Blanco), C-(control negativo), punto 2 (sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca), punto 1 (Gaspar Sangurima), punto 3 (Av. de las Américas sector Coral Centro).

4.4. Daño celular producido por sustancias presentes en extractos acuosos del PM_{2,5} y comparación con el efecto dañino producido por el extracto acuoso del PM₁₀ en la ciudad de Cuenca.

Para cumplir con el cuarto objetivo específico se analizaron las concentraciones de los metales presentes en la investigación denominada “Estudio de Genotoxicidad del Material Particulado (PM₁₀) de la Zona Urbana del Cantón Cuenca” realizado por Astudillo Alemán Ana Lucia (tabla 26) y se compararon con las concentraciones de los metales caracterizados en la presente investigación.

Tabla 26: Metales presentes en el PM₁₀ en tres sitios de Cuenca

Muestra	Fe µg/ml	Cu µg/ml	Zn µg/ml	Mn µg/ml	Cd µg/ml	Ni µg/ml	Cr µg/ml
P1 primera etapa	1888,88	175,94	187,05	36,11	ND	26,83	NC
P1 segunda etapa	3981,11	22,22	274,05	75,88	ND	ND	ND
P2 primera etapa	2801,83	22,22	220,33	57,38	ND	ND	ND
P2 segunda etapa	4777,77	25,88	137,00	118,5	ND	ND	ND
P3 primera etapa	3180,55	10,16	107,38	10,16	ND	ND	ND
P3 segunda etapa	4722,66	88,88	97,22	88,88	ND	ND	ND

Fuente: Astudillo et al., (2015)

*P1: Calle Vega Muñoz, P2: Av. Loja y Remigio Tamariz; P3: Av. Ricardo Durán.



Al comparar los metales presentes en el material particulado PM_{10} en diferentes zonas de la ciudad de Cuenca, con los metales encontrados en el material particulado $PM_{2,5}$ en la presente investigación se observa que los dos tipos de material particulado presentan hierro y zinc, sin embargo, existe una diferencia muy importante en sus concentraciones. El PM_{10} dentro de su caracterización también tiene otros metales como el cobre, manganeso y níquel. Además, las dos investigaciones no detectan plomo, ni cadmio. Las mayores concentraciones de hierro y zinc se registran para PM_{10} .

Para comparar el daño genotóxico de los dos tipos de material particulado (PM_{10} y $PM_{2,5}$) se analizó la tabla 27 titulada genotoxicidad (expresada en longitud de cola, μm) de tres experimentos en células epiteliales alveolares A549, expuestos a diferentes dosis de material particulado PM_{10} , con las medidas de longitud de cola de las células ováricas de hámster chino CHO-K1, expuestas a extractos acuosos de $PM_{2,5}$ obtenidas en el bioensayo de este estudio tabla 28.



Tabla 27: Genotoxicidad (expresada en longitud de cola, μm) de tres experimentos en células epiteliales alveolares A549, expuestos a diferentes dosis de material particulado PM_{10} a la ciudad de Cuenca.

Punto de estudio	Tratamiento	Promedio
*Punto 1 (primera etapa)	C+	41
	C-	18
	0,82 m^3/mL	56
	1,25 m^3/mL	63
*Punto 1 (Segunda etapa)	1,63 m^3/mL	38
	C+	41
	C-	18
	0,82 m^3/mL	35
*Punto 2 (primera etapa)	1,25 m^3/mL	36
	1,63 m^3/mL	35
	C+	41
	C-	18
*Punto 2 (segunda etapa)	0,82 m^3/mL	55
	1,25 m^3/mL	31
	1,63 m^3/mL	62
	C+	41
*Punto 3 (primera etapa)	C-	18
	0,82 m^3/mL	31
	1,25 m^3/mL	53
	1,63 m^3/mL	42
*Punto 3 (segunda etapa)	C+	41
	C-	18
	0,82 m^3/mL	44
	1,25 m^3/mL	37
	1,63 m^3/mL	38

Fuente: Astudillo et al., (2015)

*P1: Calle Vega Muñoz, P2: Av. Loja y Remigio Tamariz; P3: Av. Ricardo Durán.

Tabla 28 Longitud de la cola del cometa en células ováricas de hámster chico CHO-K1 al aplicar una dosis de 1,63 m^3/mL de los extractos acuosos de material particulado 2,5. ($\text{PM}_{2,5}$)

Muestra	Media de la Longitud de la cola (μm)
*B (Blanco)	55,83
*C- (Control Negativo)	52,4
*Punto 1	74,77
*Punto 2	80,77
*Punto 3	60,52
*C+ (Control Positivo)	91,25

Fuentes: Autor

*B (Blanco), C-(control negativo), punto 2 (sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca), punto 1 (Gaspar Sangurima), punto 3 (Av. Américas sector Coral Centro).



4.4.1. Prueba de Kruskal-Wallis, de valores derivados de la longitud de la cola, aplicando una dosis de 1,63 m³/mL del extracto acuoso del PM₁₀ y PM_{2,5}

En la prueba de Kruskal-Wallis se consiguió un valor de significancia mayor a 0,9999 para muestras independientes, demostrando que los datos no presentan diferencia significativa (Tabla 29).

Tabla 29: Resumen de la prueba Kruskal-Wallis para muestras independientes

Test de Kruskal-Wallis	
Tabla analizada	Comparación PM ₁₀ y PM _{2,5}
Valor de P	>0,9999
Valor de P exacto o aproximado	Aproximado
Resumen de valores de P	ns
¿Las medianas varían significativamente? (P < 0.05)?	No
Número de grupos	6
Estadística de Kruskal-Wallis.	5000
Resumen de datos	
Número de tratamientos (columnas)	6
Número de valores (total)	6

Fuente: Autor

La figura 21 muestra los valores medios de la longitud de cola del cometa a una concentración de 1,63 m³/mL de los extractos acuosos del material particulado 10 (PM₁₀) y material particulado 2,5 (PM_{2,5}); observándose que los valores de longitud son mayores con los extractos acuosos de PM_{2,5}.

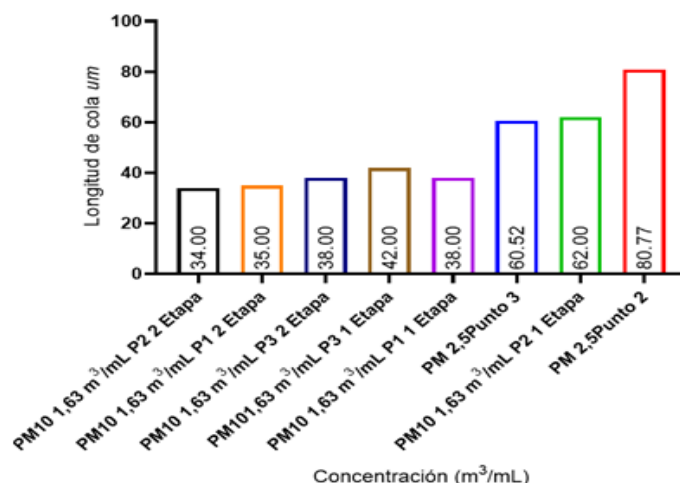


Figura 21: Medias de la longitud de Cola en el ensayo cometa a una concentración 1,63m³/mL en los extractos acuosos del PM₁₀ y PM_{2,5}.

Fuente: Autor

*P1: Calle Vega Muñoz, P2: Av. Loja y Remigio Tamariz; P3: Av. Ricardo Durán.

* Punto 1 (Gaspar Sangurima), punto 2 (sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca, punto 3 (Av. Américas sector Coral Centro).



5. DISCUSIÓN

5.1. Análisis de las concentraciones obtenidas respecto a la normativa ecuatoriana

El promedio de las concentraciones de material particulado $PM_{2,5}$ de los diferentes puntos de estudio se encuentran dentro del valor referencial estipulado en la normativa nacional ($50,0 \mu\text{g}/\text{m}^3$); sin embargo, sobrepasan el límite establecido por OMS ($25,0 \mu\text{g}/\text{m}^3$) a excepción del punto localizado en el sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca ($19,93 \mu\text{g}/\text{m}^3$).

Al realizar la prueba de medianas y Kruskal-Wallis para muestras independientes, se concluye que hay diferencia significativa entre las zonas de estudio.

Dieciséis de las concentraciones registradas en el punto Gaspar Sangurima y Luís Cordero que corresponden al 72,77 %: superan la normativa establecida en la OMS y dos concentraciones (9,09 %) supera la normativa nacional.

En el sector de la Basílica de la Universidad Católica de Cuenca, se observó que ninguna concentración sobrepasa el valor referencial de la normativa nacional, sin embargo, el 31,8 % de las concentraciones registradas supera la normativa de la OMS.

En la Avenida de las Américas sector Coral Centro el 18,18 % de las concentraciones anotadas superan el valor referencial de la normativa nacional y el 81,81 % de las concentraciones sobrepasan la normativa establecida por la OMS.

Además, se puede concluir que de las 66 concentraciones registradas en los tres sitios de monitoreo el 9,09 % supera la normativa nacional correspondiente al $PM_{2,5}$ y el 62,12 % de las concentraciones sobrepasan la Normativa de la OMS.

Concordando con lo declarado por la EMOV en donde manifiestan que las mayores concentraciones de material particulado 2,5 se observan en el mes de mayo y septiembre del 2017.



De las 44 concentraciones que sobrepasan la normativa OMS, se observa que el 63 % corresponden a días laborables y un 37 % a fines de semana, coincidiendo con la investigación denominada Efecto Fin de Semana en la calidad del aire de la ciudad de Cuenca, Ecuador; en donde se expone que los parámetros CO, NO₂ y MP_{2,5} durante los años 2013–2015 muestran mayores concentraciones en los días laborables y las menores durante el fin de semana, atribuyendo estos resultados a la disminución del flujo vehicular el fin de semana (Parra R., 2017).

Este estudio estableció que el punto 3 que corresponde a la Av. de las Américas sector Coral Centro muestra mayor concentración de material particulado 2,5 con relación a los otros puntos monitoreados, demostrando que la zona Sur de Cuenca presenta mayor contaminación lo cual coincide con la investigación realizada por Astudillo A et al., 2015 denominada “Caracterización química del material particulado PM₁₀ de la zona urbana de Cuenca- Ecuador e investigación de su genotoxicidad e inducción de estrés oxidativo en células epiteliales alveolares A549”

Otras investigaciones realizadas en el área urbana de la ciudad concluyen que Cuenca presenta niveles de material particulado elevados y exceden las normativas nacionales e internacionales (García Alvear et al., 2015). Con respecto al PM_{2,5} excede entre un 13,3 3% y 30,0 %, concordando con el presente trabajo en donde se observa que un 9,09 % de las concentraciones superan la normativa OMS y el 62,12 % la normativa nacional.

También se puede confrontar con el estudio realizado en Medellín por Carlos et al., 2012 en donde se concluye que las emisiones de material particulado PM₁₀, no cumplen con lo establecido por la OMS, pero están dentro de los promedios establecidos por la norma nacional. Lo que se refiere al PM_{2,5}; las concentraciones son alarmantes por su gran dominio en la salud, siendo una zona de alta movilidad vehicular y peatonal.



Una investigación realizada en Cúcuta-Norte de Santander-Colombia exhibe que concentraciones del material particulado $PM_{2,5}$ durante el periodo del monitoreo sobrepasan la norma diaria establecida por el Ministerio del Medio Ambiente de Colombia. Además, afirman que el material particulado $PM_{2,5}$ en esta zona es producto del flujo vehicular, ya que por sus alrededores no se encuentran industrias que puedan aportar partículas a la contaminación de la zona.

Además, se observa que no existe una relación entre la concentración de material particulado y las condiciones meteorológicas, ya que las mismas se mantienen constantes en todo el monitoreo, por ende, se asume que la variación de las concentraciones de material particulado se asocia a las emisiones vehiculares.

5.2. Composición Química del Material Particulado $PM_{2,5}$

Al realizar los análisis para la determinación de los metales pesados se observa que las muestras de $PM_{2,5}$ en los tres sitios de estudio no registran valores para níquel, plomo y cadmio, sin embargo, si registran concentraciones de hierro y zinc reportándose mayor concentración en la Av. de las Américas Sector Coral Centro.

En las calles Gaspar Sangurima y Luis Cordero, las concentraciones de metales pesados hierro y zinc fueron de 1,42 mg/L y 0,110 mg/L respectivamente; en la Av. de las Américas Sector Basílica los valores de hierro y zinc oscilaron entre 1,46 mg/L y 0,10 mg/L; y en la Avenida de las Américas Sector Coral Centro se registró un valor de 2,25 mg/L para hierro y 0,19 mg/L para zinc.

Debido a los valores de los límites de detección de cadmio (0,038 mg/L), plomo (0,15 mg/L), y níquel (0,10 mg/L) de la técnica usada por el CESEMIN, se puede concluir que no existen concentraciones mayores a estos valores, sin embargo, no se puede afirmar que no existen estos metales en las mismas.



Al no existir valores límites de las concentraciones de zinc y hierro en el aire ambiente para la protección de la salud humana por inhalación, en la normativa Nacional Ecuatoriana, se tomó como referencia la normativa canadiense para zinc es de $0,12 \text{ mg/m}^3$.

Al comparar las concentraciones registradas para el zinc, con lo recomendado por la normativa canadiense se puede concluir que todas las concentraciones sobrepasan las mismas.

Observando que el punto 3 (Av. de las Américas sector Coral Centro) presenta mayor concentración promedio de material particulado $\text{PM}_{2,5}$ y además muestra mayor concentración de zinc y hierro.

Estudios realizados por García Alvear et al., 2015 concluyen que el material particulado sedimentable registrado en la ciudad de Cuenca presenta concentraciones que superan la normativa de la OMS y dentro de su caracterización se encuentran metales pesados como hierro, cromo, manganeso y zinc, concordando con la presente investigación de los dos metales encontrados.

Astudillo et al., 2015 caracterizaron el material particulado PM_{10} de la ciudad de Cuenca encontrando aniones cloruro, nitrato y sulfato y metales pesados (cromo, hierro, níquel, zinc, cobre y manganeso), siendo el hierro y el zinc los que se registraron en mayores concentraciones, coincidiendo con el presente estudio.

El trabajo realizado por Jachero et al., 2010 indican la presencia de aluminio, hierro, cromo, plomo, magnesio, zinc, cobre en el material particulado PM_{10} en la ciudad de Cuenca.

En el estudio realizado en Nororiente Colombiano que caracterizó químicamente el material particulado $\text{PM}_{2,5}$ de Pamplona, mediante técnicas analíticas, de absorción atómica, difracción de rayos X y fluorescencia de rayos X se logró detectar la presencia en aire de siete metales: cromo, hierro, potasio, magnesio, níquel, plomo y zinc.



Gutiérrez et al., 2012 demostraron por primera vez la concentración diaria del $PM_{2,5}$ del aire de Cúcuta Norte de Santander y se descubrió la presencia de calcio, hierro, plomo, potasio, cromo, zinc y cadmio.

Todas estas investigaciones concluyen que, en el $PM_{2,5}$ se registra la presencia de metales como el Fe y Zn, concordando con los resultados obtenidos del presente trabajo.

Fernández et al., 2000 indican en su investigación que metales como hierro, aluminio, plomo, cobre y cromo se encuentran en fuentes como el suelo, tráfico vehicular e industrial, sin embargo, los metales plomo, cobre, níquel, cromo, cadmio y hierro, encontrados en las muestras de partículas suspendidas totales son atribuidos principalmente al tráfico vehicular.

5.3. Evaluación el tipo de daño celular producido por las sustancias presentes en los extractos acuosos del $PM_{2,5}$ sobre la línea celular ovárico de hámster chino (CHO-K1)

Al aplicar la dosis de $1,63 \text{ m}^3/\text{mL}$ se obtuvieron viabilidades que varían entre 90,75 % a 92,75 % en los diferentes puntos de monitoreo.

Observándose que no existe diferencia significativa entre los puntos del muestreo.

5.3.1. Análisis del largo de la cola del cometa (formada por fragmentos nucleares que han migrado en dirección del ánodo), obtenidas en el bioensayo

Al ejecutar el test de normalidad de D'Agostino y Pearson se observa que los datos del largo de la cola del cometa no presentan una distribución normal.

El daño en el ADN con relación al largo de cola del cometa en las células ováricas de hámster chino CHO-K1, usando una concentración de $1,63 \text{ m}^3/\text{mL}$ presenta las siguientes valores medios: 52,40 μm (control negativo); 55,83 μm (Blanco); 60,52 μm (punto 3, Av. de las Américas Sector Coral Centro); 74,77 μm (punto 1, Gaspar Sangurima y Luis Cordero);



80,77 μm (punto 2, Sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca) y 91,25 μm (control negativo).

Al aplicar la prueba de Kruskal-Wallis se registra un valor de significancia asintótica menor a 0,0001; lo cual indica que existe diferencia significativa entre el control negativo y los puntos de monitoreo.

Al exponer los datos al test de comparación múltiple de Dunn, se identificó que los datos del punto 1 (Gaspar Sangurima y Luis Cordero) y punto 2 (Sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca) no son iguales a los datos del control negativo, a diferencia con el punto 3 (Av. de las Américas Sector Coral Centro) donde los valores son iguales al control negativo, concluyendo que existe daño genotóxico a una dosis de 1,63 m^3/mL en los puntos situados en las calles Gaspar Sangurima y Luis Cordero, así como también en el Sector Basílica de la Universidad de Cuenca.

5.3.2. Análisis del momento de la cola obtenidas en el bioensayo.

Al realizar el análisis estadístico del momento de la cola del cometa se obtuvieron los siguientes valores medios: 4,36 μm (control negativo); 6,99 μm (blanco); 8,45 μm (punto 3 Av. de las Américas Sector Coral Centro); 14,07 μm (punto 1 Gaspar Sangurima y Luis Cordero); 15,36 μm (punto2, Sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca); y 18,69 μm (control negativo).

En el test de normalidad de D'Agostino y Pearson el valor de P (valor de significancia) de los puntos de estudio es menor a $<0,0001$, observándose diferencia significativa entre los valores del momento de cola.

Al analizar los datos con el test de comparación múltiple de Dunn se observa diferencia significativa entre el momento de cola del control negativo con los datos obtenidos en el punto 1 (Gaspar Sangurima y Luis Cordero) y punto 2 (Sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca), sin embargo, no presentan diferencia significativa, el control negativo y el punto 3



(Av. de las Américas Sector Coral Centro). Indicando que existe daño genotóxico a la dosis $1,63 \text{ m}^3/\text{mL}$ en las calles Gaspar Sangurima y Luis Cordero, así como también en el Sector Basílica de la Universidad de Cuenca.

5.3.3. Análisis de la intensidad de la cola obtenida en el bioensayo.

El porcentaje de los valores medios de la intensidad de la cola fueron: 12,82 %, (control negativo); 17,95 % (blanco); 18,82 % (punto 3, Av. de las Américas Sector Coral Centro); 29,43 % (punto 1, Gaspar Sangurima y Luis Cordero); 30,5 % (punto 2, Sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca); y 41,02 % (control negativo).

Al realizar la prueba Kruskal- Wallis, para determinar diferencias significativas entre los valores de la intensidad de cola se registra un valor de significancia asintótica menores a 0,0001 indicando que existe diferencia significativa, entre los datos de estudio.

Además, según el test de comparación múltiple de Dunn el punto 1 (Gaspar Sangurima y Luis Cordero) y punto 2 (Sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca) difieren al control negativo, al contrario del punto 3 (Av. de las Américas Sector Coral Centro) que no presenta diferencia con el control negativo. Demostrando que existe daño genotóxico a la dosis $1,63 \text{ m}^3/\text{mL}$ en las calles Gaspar Sangurima y Luis Cordero, así como también en el Sector Basílica de la Universidad de Cuenca.

5.3.4. Daño Celular

Al efectuar las pruebas de Medianas y Kruskal-Wallis de los datos obtenidos de índice de daño genotóxico, respecto a la intensidad y largo de cola se observó que existe diferencia significativa entre los puntos analizados.

Las pruebas de Mann-Whitney de dos variables aplicadas a los datos resultantes del índice de daño genotóxico (intensidad y longitud de cola) y control negativo muestran que existe diferencia con el punto 1 (Gaspar Sangurima y Luis Cordero) y punto 2 (Sector Basílica



de la Universidad Católica de Cuenca); a diferencia del punto 3 (Av. de las Américas Sector Coral Centro) que no presenta diferencia con el mismo.

Los parámetros estudiados: largo de cola, intensidad y momento del cometa, índice de daño genotóxico, mantienen la misma tendencia en todos los análisis estadísticos, en función de ello se aprecia que a una dosis de $1,63 \text{ m}^3/\text{mL}$ existe daño genotóxico en la línea celular con los extractos acuosos pertenecientes a los puntos localizados en la calle Gaspar Sangurima y Luis Cordero, así como también en el Sector Basílica de la Universidad de Cuenca, no registrándose daño genotóxico el extracto recolectado en la Av. Américas Sector Coral Centro.

El porcentaje de daño en el ADN en células CHO-K1 analizadas con material particulado $\text{PM}_{2,5}$ estudiado en dos puntos (Gaspar Sangurima y Luis Cordero; Sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca) de la ciudad de Cuenca presentan similitud entre sí, sin embargo, el tercer punto (Av. de las Américas Sector Coral Centro) difiere de los mismos.

Coincidiendo con la investigación realizada por Astudillo et al., 2015 en donde se concluye que la exposición de las células epiteliales alveolares A549, a diferentes dosis de extracto acuosolubles de PM_{10} obtenido de la ciudad de Cuenca, provocaron genotoxicidad en el ADN en la categoría baja de las células en el ensayo in vitro, los resultados mostraron que los metales presentes en las muestras de PM_{10} pudieron contribuir con la capacidad de daño en el ADN de las células.

Además, se puede observar que el punto 3 (Av. de las Américas sector Coral Centro) presentó las mayores concentraciones de material particulado 2,5 ($\text{PM}_{2,5}$), pero no presenta diferencia significativa con el control negativo de las diferentes variables (longitud, momento e intensidad de la cola, IDG intensidad) por lo tanto no presenta daño genotóxico. A diferencia del punto 2 (Sector Basílica de la Universidad de Cuenca) que presenta las menores concentraciones de material particulado 2,5 ($\text{PM}_{2,5}$), y presenta diferencia significativa con el



control negativo en todas sus variables de análisis (longitud, momento e intensidad de la cola, IDG intensidad), indicando que existe daño genotóxico en este punto de acuerdo con lo citado por Gutiérrez et al., 2006 y Astudillo et al., 2015 que enuncian que en las investigaciones de Material Particulado tiene mayor relevancia la caracterización del material particulado 10 (PM₁₀) que la concentración del mismo, siendo la composición del material particulado un componente decisivo en la estimación sobre los efectos de la salud.

Iván Meléndez Gálvez et al., 2011 indican que el MP_{2,5} presente en las muestras de aire de la ciudad de Pamplona puede provocar mutaciones y alcanzar hasta el núcleo de linfocitos humanos y producir daño genotóxico generando un factor de riesgo para la población expuesta, concordando con la actual investigación.

Además, la investigación realizada por Betancur Sánchez 2016, concluye que se presentan quiebres del ADN inducidas por PM_{2,5} en las tres estaciones de monitoreo evaluadas. Mostrando mayor daño genotóxico (65 %) a la concentración de 30 µg/mL utilizando el ensayo cometa en células CHO-K1. En donde las concentraciones de PM_{2,5} evaluadas mostraron un efecto dosis-respuesta en los tratamientos evaluados en las tres estaciones de monitoreo.

En el estudio realizado por Beleño et al., 2013, se concluye que, a mayor concentración del extracto, existe un aumento en el tipo de daño. Observándose que las concentraciones que indujeron mayor frecuencia de células con daño en el ADN, también mostraron mayor longitud de migración del ADN (cola). Indicando que los genotóxicos que producen más daño en el ADN, también afectan más número de células. La extrapolación de los resultados puede conducir a la hipótesis sobre el riesgo de la exposición a la contaminación del aire, dado que en el presente estudio se mostró que el PM_{2,5} causa mutagenicidad y genotoxicidad. Posiblemente parte de la respuesta mutagénica, se debe a la presencia de metales pesados en el material particulado PM_{2,5} de la ciudad: cadmio, cromo, hierro, potasio, magnesio, níquel, plomo y zinc.



Samet et al., 2000; Quijano Parra, Quijano Vargas y Meléndez Gélvez, 2015, enuncian que el material particulado $PM_{2,5}$ al ser cien por ciento respirable, se convierte en la fracción con mayor peligrosidad a la salud, debido que pueden ingresar al sistema respiratorio, colocarse en los alveolos pulmonares y alcanzar al torrente sanguíneo ocasionando aumento en las enfermedades respiratorias, cardíacas, asma, bronquitis, enfisema, cáncer pulmonar, y disminución del funcionamiento pulmonar.

Es importante recordar que los agentes genotóxicos reaccionan con el ADN y producen lesiones, las que se pueden reparar eficiente o ineficiente, también es importante recordar que los elementos de mezclas complejas pueden actuar unos con otros produciendo efectos antagónicos, aditivos o sinergia.

5.4. Determinación el daño celular producido por las sustancias presentes en los extractos acuosos del $PM_{2,5}$ y comparación con el efecto dañino producido por el extracto acuoso del PM_{10} presente en Cuenca.

Los metales presentes en el PM_{10} y $PM_{2,5}$ de algunas zonas de la ciudad de Cuenca, son: hierro y zinc, en el extracto acuoso del PM_{10} se encontró mayor concentración de los mismo con respecto al extracto acuoso del $PM_{2,5}$. Además, no se detectan metales como el plomo y cadmio. El extracto acuoso del PM_{10} también tiene dentro de su composición cobre, manganeso y níquel.

La prueba de Kruskal-Wallis de los valores obtenidos en la longitud de cola del cometa en los extractos acuosos del $PM_{2,5}$ y PM_{10} al aplicar una dosis de $1,63 \text{ m}^3/\text{mL}$ indica que los datos no presentan diferencia significativa entre ellos, sin embargo en la figura 22 se observa que los valores obtenidos de la longitud de cola del extracto acuoso del $PM_{2,5}$ son mayores al obtenido en el PM_{10} , con lo cual se determinó que el $PM_{2,5}$ presentó mayor daño celular que el PM_{10} .



6. CONCLUSIONES

El punto 3 localizado en la Av. de las Américas sector Coral Centro presenta la mayor concentración de material particulado ($PM_{2,5}$), en donde el 81,81 % de las mismas sobrepasa la normativa estipulada por la OMS, seguido por el punto Gaspar Sangurima y Luis Cordero (punto 1) en donde él 72,77 % de las concentraciones superan la normativa OMS finalmente el punto 2 ubicado en el sector Basílica de Universidad Católica de Cuenca supera la normativa en un 31,8 %.

Existen concentraciones de material particulado $PM_{2,5}$ que sobrepasan la normativa ecuatoriana y la normativa OMS.

El aire ambiente de la ciudad de Cuenca, presenta como parte de su composición metales pesados como zinc y hierro, presentando mayor concentración en el punto 3.

Al analizar el daño celular se pudo identificar que el punto que presentó mayor concentración de material particulado $PM_{2,5}$ (Av. Américas sector Coral Centro) no presenta diferencia significativa con el control negativo en el ensayo cometa con células ováricas de hámster chino CHO-K1, por ende, no existe daño genotóxico en el mismo. Al contrario, el punto de monitoreo que registra menor concentración de material particulado $PM_{2,5}$ (Sector Basílica de la Universidad Católica de Cuenca) presente mayor diferencia significativa con el control negativo, indicando daño celular.

El daño celular ocasionado por los extractos recolectados en los sectores: Basílica de la Universidad Católica de Cuenca (punto2) y Gaspar Sangurima y Luis Cordero (punto1) se podría atribuir a la presencia de otros componentes tóxicos que pudieran estar contenidos en las muestras pero que no fueron analizados en este estudio.

Con la presente investigación se puede establecer que el aire ambiente de la ciudad de Cuenca, presenta contaminantes como el material particulado $PM_{2,5}$, afectando a la salud de las



personas expuestas e inclusive pueden causar o inducir un daño genotóxico en las células, concordando con otras investigaciones realizadas.

El material particulado 2,5 ocasiona mayor daño celular que el material particulado 10, debido a que el $PM_{2,5}$ por ser más pequeño ingresa a los alveolos pulmonares a diferencia del PM_{10} que por su tamaño se queda retenido en las vías respiratorias.



7. RECOMENDACIONES

- Realizar monitoreos por períodos más largos de material particulado $PM_{2,5}$; para tener una mayor cantidad de muestra.
- Determinar una caracterización más amplia de metales pesados y aniones (Sulfatos, cloruros, nitratos) en el extracto acuoso del material particulado $PM_{2,5}$.
- Realizar réplicas del ensayo Cometa para tener mayor evidencia del daño ocasionado por el material particulado $PM_{2,5}$.



8. BIBLIOGRAFÍA

- Angulo, R., & Patiño, M. (2008). Medición y Evaluación de la calidad del aire en los sectores de Fertisa y Trinitaria de la ciudad de Guayaquil debido a la presencia de material particulado menor a 10 y 2.5 um. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, EC.
- Astete, J., Gastañaga, M. D. C., & Pérez, D. (2014). Niveles de metales pesados en el ambiente y su exposición en la población luego de cinco años de exploración minera en Las Bambas, Perú 2010. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31, 695-701.
- Astudillo, A. A., Orellana, M. R., Alvear, N. G., Arévalo, G. G., Valle, I. G., & Moscoso, N. B. (2015). Caracterización química del material particulado PM10 de la zona urbana de Cuenca-Ecuador e investigación de su genotoxicidad e inducción de estrés oxidativo en células epiteliales alveolares A549. *Revista de toxicología*, 32(2), 121-126.
- Balcarce, E. (2009). Manual de procedimientos para determinación de material particulado. Gobierno de Chile, Ministerio de Salud.
- Batalha Jrf, Guimaraes Et, Lobo Dja, Lichtenfels Ajfc, Deur T, Carvalho Ha, Alves Es, Domingos M, Y Rodrigues Gs (1999), Exploring the clastogenic effects of air pollution in Sao Paulo (Brazil) using the Tradescantia micronuclei assay. *Mutation Research* 426:229–232.
- Beleño, R., Quijano, A., & Meléndez, I. (2013). Actividad mutagénica y genotóxica del material particulado PM2. 5 en Cúcuta, Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 18.
- Bell, M., Samet, J., y Dominici, F., (2004). Time-series studies of particulate matter. *Annual Review of Public Health Palo Alto.*, Vol. 25; p. 247-280.
- Betancur Sánchez (2016), A. Evaluación de la citotoxicidad y genotoxicidad del material químico en filtros PM2. 5 de las estaciones de monitoreo de la red de calidad del aire del Valle de Aburrá (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín).
- Bhatia,R.; Lopipero, P. and Smith, A. (1998). Diesel Exhaust Exposure and Lung Cancer. *Epidemiology*, 9(1), pp. 84–91.
- Billet, S., Garçon, G., Dagher, Z., Verdin, A., Ledoux, F., Cazier, F., ... & Shirali, P. (2007). Ambient particulate matter (PM 2.5): physicochemical characterization and metabolic activation of the organic fraction in human lung epithelial cells (A549)metales pesados en Drosophila melanogaster mediante los ensayos SMART de alas y Cometa. Universitat Autònoma de Barcelona,
- Brits E, Schoeters G and Verschaeve. 2004. Genotoxicity of PM10 and extracted organics collected in an industrial, urban and rural area in Flanders, Belgium. *Environ Res* 96: 109-118.
- Brunekreef, B., & Holgate, S. T. (2002). Air pollution and health. *The lancet*, 360(9341), 1233-1242.
- Buschini, A., Cassoni, F., Anceschi, E., Pasini, L., Poli, P., & Rossi, C. (2001). Urban airborne particulate: genotoxicity evaluation of different size fractions by mutagenesis tests on microorganisms and comet assay. *Chemosphere*, 44(8), 1723-1736.
- Campas, M. E. C., Álvarez, A. G., Leal, R. R., Villalba, A. G. V., Amaya, O. M., Salazar, J. V., ... & Tagles, H. F. D. (2017). CALIDAD DEL AIRE RESPECTO DE METALES (Pb, Cd, Ni, Cu, Cr) Y RELACIÓN CON SALUD RESPIRATORIA: CASO SONORA, MÉXICO. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 23-34.



- CAPÓ, M. (2002). Principios de ecotoxicología. Diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente. Ed.
- Carballo, M., Cortada, C., Gadano, A. (2005). Riesgos y Beneficios en el Consumo de Plantas Medicinales, *Theoria*, Vol. 14 (2): 95-108.
- Carmona Ortiz, E. R., Dauder, M., & Creus Capdevila, A. (2009). Evaluación genotóxica de algunos an Conference of Governmental Industrial Hygienists. Cincinnati, Ohio, 8th ed. (1995).
- Center for Environmental Assessment, Washington, DC, 2002 (EPA/600/8-90/057F). U.S.EPA. (2004). Air Quality Criteria for.
- Claeys, M.; Graham, B.; Vas, G.; Wang, W.; Vermeylen, R.; Pashynska, V.; Cafmeyer, J.; Guyon, P.; Andreae, M.O.; Artaxo, P. and Maenhaut, W. (2004). Formation of Secondary Organic Aerosol through Photooxidation of Isoprene. *Science*, 303(5661), pp. 1173–1176.
- Claxton, L. D.; Woodall, G. M.Jr. (2007). A Review of the Mutagenicity and Rodent Carcinogenicity of Ambient Air. *Mutation Research*, 636(1-3), pp. 36-94
- Cohen, B. y Hering, S., Air Sampling Instrument for Evaluation of Atmospheric Contaminants. *American Environmental Research*, 105(2), 212-223.
- Crebelli R, Fuselli S, Balda Ssarrri LT, Ziemacki G, Carere A, y Benignir R (1995), Genotoxicity of urban air particulate matter: correlations between mutagenicity data, airborne micropollutants and meteorological parameters. *International Journal of Environmental Health* 5:19–34
- Danielsen PH, Loft S and Møller P (2008) DNA damage and cytotoxicity in type II lung epithelial (A549) cell cultures after exposure to diesel exhaust and urban street particles. *Part and Fibre Toxicol* 5:6.
- Dellinger B, Pryor WA, Cueto R, Squadrito GL, Hegde V and Deutch WA. 2001. Role of free radicals in the toxicity of airborne fine particulate matter. *Chem Res Toxicol* 14: 1371-1377.
- Ding, L. C., Ke, F., Wang, D. K., Dann, T., & Austin, C. C. (2009). A new direct thermal desorption-GC/MS method: Organic speciation of ambient particulate matter collected in Golden, BC. *Atmospheric Environment*, 43(32), 4894-4902.
- Dockery, D. W., Pope, C. A., Xu, X., Spengler, J. D., Ware, J. H., Fay, M. E., ... & Speizer, F. E. (1993). An association between air pollution and mortality in six US cities. *New England journal of medicine*, 329(24), 1753-1759.
- Dockery, D., & Pope, A. (1996). Epidemiology of acute health effects: summary of time-series studies. *Particles in our air: Concentrations and health effects*, 123-147.
- Donaldson K, Brown DM, Mitchell C, Dineva M, Beswick PH, Gilmour P and MacNee W. 1997. Free radical activity of PM10: iron-mediated generation of hydroxyl radicals. *Environ Health Perspect* 105 (5): 1285-1289.
- EMOV EP (2018). Informe de calidad del aire Cuenca 2017. Cuenca: Alcaldía de Cuenca, Red de Monitoreo
- Enya, T.; Suzuki, H.; Watanabe, T.; Hirayama, T.; Hisamatsu, Y. (1997). 3-Nitrobenzanthrone, a Powerful Bacterial Mutagen and Suspected Human Carcinogen Found in Diesel Exhaust and Airborne Particles. *Environmental Science and Technology Letters*, 31(10), pp. 2772–2776.
- EPA (2004). Air Quality Criteria for Particulate Matter. Office of Air Quality Planning and Standards Emissions, Monitoring, and Analysis Division. Volume I of II. EPA/600/P-99/002Af.



- Espinoza , E. P., & Molina, C. E. (2014). Contaminación del aire exterior Cuenca-Ecuador, 2009-2013. Posibles efectos en la salud. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas*, 32(2).
- Espinoza, E. P., & Molina, C. E. (2014). Contaminación del aire exterior Cuenca-Ecuador, 2009-2013. Posibles efectos en la salud. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas*, 32(2).
- ESQUIVEL, E. M., ZAYAS, G. P., MARTÍNEZ, M., UGALDE, F. A., & MALDONADO, J. F. Comportamiento de las fracciones fina y gruesa de PM10 en la estación de monitoreo de calidad del aire en Centro Habana. Campaña 2006-2007.
- Fang, G. C., Chang, C. N., Chu, C. C., Wu, Y. S., Fu, P. P. C., Yang, I. L., & Chen, M. H. (2003). Characterization of particulate, metallic elements of TSP, PM 2.5 and PM 2.5-10 aerosols at a farm sampling site in Taiwan, Taichung. *Science of the Total Environment*, 308(1), 157-166.
- Ferré-Huguet, N., Schuhmacher, M., Llobet, J., & Domingo, J. (2007). Metales pesados y salud. *Mapfre seguridad*, 108(4), 50-58.
- Ferreyra, M. F. G., & Arancibia, H. A. C. (2008). Análisis de la genotoxicidad de material particulado recolectado en dos ciudades de la Provincia de Córdoba, Argentina, mediante el ensayo de micronúcleos. *Theoria*, 17(1), 33-40.
- Fernández A., Ternero M., Barragán F. y Jiménez J. (2000). An approach to characterization of sources of urban airborne particles through heavy metal speciation. *Chemosphere - Global Change Science* 2, 123-136
- Fonfría, R. S., & de Pablo Ribas, J. (1989). *Ingeniería ambiental: contaminación y tratamientos* (Vol. 28). Marcombo.
- Galvis, B., & Rojas, N. (2006). Relación entre PM2. 5 y PM10 en la Ciudad de Bogotá. *Acta Nova*, 3(2), 336-353.
- García Alvear, N. B., & Abad Terán, M. E. (2015). Análisis preliminar de la fitotoxicidad del material particulado sedimentable de la zona urbana de Cuenca.
- Garcia, F.F. (2002). Determinación de la Concentración de Fondo y Distribución Espacial de PST en Santa Marta. Grupo de Control de la Contaminación Ambiental. Universidad del Magdalena, Colombia.
- García, G. M., Pinzón, G. M., & Cueto, J. L. (2005). Composición y Concentración de Material Particulado en el aire de un sector del área urbana de Santa Marta (Magdalena, Colombia). *Intropica*, 2, 23.
- García Alvear Nancy, Astudillo Alemán Ana, Espinoza Pineda Carlos, Vázquez Freire Verónica. (2015). Cuantificación de material particulado en el ambiente laboral del sector productivo de Cuenca-Ecuador
- Gaviria, C. F., Benavides, C., & Arroyave, C. (2012). Contaminación por material particulado (PM2, 5 y PM10) y consultas por enfermedades respiratorias en Medellín (2008-2009). *Facultad Nacional de Salud Pública*, 29(3).
- Guilherme S, Gaivão I, Santos MA, Pacheco M. European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup- a glyphosatebased herbicide. *Mutagenesis*. 2010;25:523-30. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq038>
- Goldberg , M. S., Burnett, R. T., Bailar, J. C., Brook, J., Bonvalot, Y., Tamblyn, R., ... & Valois, M. F. (2001). The association between daily mortality and ambient air particle pollution in Montreal, Quebec: 1. nonaccidental mortality. *Environmental Research*, 86(1), 12-25.
- Gonzalez Reimers, E., Martinez-Riera, A., Santolaria-Fernandez, F., Mas-Pascual, A., Rodriguez-Moreno, F., Galindo-Martin, L., & Barros-Lopez, N. (1998). Relative and



- combined effects of ethanol and protein deficiency on zinc, iron, copper, and manganese contents in different organs and urinary and fecal excretion. *Alcohol*, 16(1), 7-12.
- Gordon, T., Amdur MO. Chapter 12. Responses of the respiratory system to toxic agents. In Cassarett and Doull's *Toxicology. The basic science of poisons*. Amdur, MO., Doull, J., Klaassen, edit. Fourth edition. Pergamon Press. pp 383-406. 1991.
 - Goyer, R., Nutrition and Metal Toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.*, 61, 646S-650S. (1995).
 - Gunnar, N. Metales: propiedades químicas y toxicidad. [En línea] En: *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*. 4ª Edición. Organización Internacional del Trabajo. Capítulo 63. pp. 63.39-63.44 (2001).
 - Gutierrez-Castillo ME, Cebrian-Garcia ME, de Vizcaya-Ruiz A, Roubicek DA, Sordo-Cedeño M, P. Ostrosky-Wegman (2006) Induced DNA damage and chemical composition of airborne particulates from Mexico City Metropolitan Area. *Environ. Mol Mutagen* 47: 199–211.
 - Gutierrez Jaimes, J. H., Quijano Vargas, M. J., & Quijano Parra, A. (2012). Monitoreo y caracterización fisicoquímica del material particulado PM2.5 en Cúcuta-Norte de Santander-Colombia. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 10(1).
 - Hałatek, T.; Zinczuk-Walczak, H.; Szymczak, M.; Rydzynski, K. (2005). Neurological and Respiratory Symptoms in Shipyard Welders Exposed to Manganese. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 18(3), pp. 265-274.
 - Hoek, G., Brunekreef, B., Goldbohm, S., Fischer, P., & van den Brandt, P. A. (2002). Association between mortality and indicators of traffic-related air pollution in the Netherlands: a cohort study. *The Lancet*, 360(9341), 1203-1209.
 - Hoffman, D., rattner, B., burton, A., & cairns, J. (2002). *Handbook of Ecotoxicology*
 - Howson CP, Hernández-Avila M, Rall DP, Ed. *Lead in the Americas: A call for action*. Toluca, México: Institute of Medicine of USA/National Institute of Public Health, 1996.
 - Isidori M, Ferrara M, Lavorgna M, Nardelli A, Y Parrella A (2003), In situ monitoring of urban air in Southern Italy with the Tradescantia micronucleus bioassay and semipermeable membrane devices (SPMDs). *Chemosphere* 52:121–126.
 - Jachero, L., & Moscoso, D. (2009). Evaluación del riesgo de exposición a sustancias tóxicas procedentes de la contaminación atmosférica en la Ciudad de Cuenca. Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca. Cuenca, Ecuador (<http://www.ceaucuenca.ec/index.php>).
 - Karlsson HL, Nygren J and Möller L. 2004. Genotoxicity of airborne particulate matter: the role of cells-particle interaction and of substances with adduct-forming and oxidizing capacity. *Mutat Res* 565: 1-10.
 - Kleinman, M. T., Hamade, A., Meacher, D., Oldham, M., Sioutas, C., Chakrabarti, B., ... & Cho, A. K. (2005). Inhalation of concentrated ambient particulate matter near a heavily trafficked road stimulates antigen-induced airway responses in mice. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 55(9), 1277-1288.
 - Knaapen AM, Borm PJA, Albrecth C and Shins RPF. 2004. Inhaled particles and lung cancer. Part A. Mechanisms. *Int J Cancer* 109: 799-809.
 - Knaapen AM, Schins PF, Steinfartz Y and Höhr D. 2000. Ambient particulate matter induces oxidative DNA damage in lung epithelial cells. *Inhal Toxicol* 12 (Suppl 3): 125-132.
 - Lewtas, J.; Huisingh, R.; Bradow, R.; Jungers, L.; Claxton L.; Zweidinger, R. (1979). Application of Bioassay to the Characterization of Diesel Particle Emissions, in: M.D. Waters, S. Nesnow, J. Lewtas Huisingh, et al. (Eds.), *Application of Short-term*



- Bioassays in the Fractionation and Analysis of Complex Environmental Mixtures, Plenum Press, New York, pp. 383–418.
- Li N, Hao M, Phalen RF, Hinds WC, Nel AE (2003) Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clin Immunol* 109:250–265
 - Lipsett, M. and Campleman, S. (1999). Occupational Exposure to Diesel Exhaust and Lung Cancer: A Meta-analysis. *American Journal Public Health*, 89(7),pp. 1009–1017.
 - Lipsett, M. and Campleman, S. (1999). Occupational Exposure to Diesel Exhaust and Lung Cancer: A Meta-analysis. *American Journal Public Health*, 89(7),pp. 1009–1017.
 - Lodhi, A., Ghauri, B., Khan, M. R., Rahman, S., & Shafique, S. (2009). Particulate matter (PM_{2.5}) concentration and source apportionment in Lahore. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(10), 1811-1820.
 - Mejía, C. A. Z., Chitiva, L. G. R., & Cabrera, Y. A. T. (2013). Metales pesados asociados con las partículas atmosféricas y sedimentadas de superficies viales: Soacha (Colombia). *Revista Científica*, (17), 113-124.
 - Meléndez Gélvez, I., Martínez Montañez, M. L., & Quijano Parra, A. (2012). Actividad mutagénica y genotóxica en el material particulado fracción respirable MP_{2.5} en Pamplona, Norte de Santander, Colombia. *Iatreia*, 25(4).
 - Melgarejo Pomar, I. G., Soria Sánchez, R., Spielvogel, H., Orozco, D., Villanueva, W., & Cajas, N. (2010). Salud pulmonar y contaminación ambiental en comerciantes de las ciudades de La Paz y El Alto. *Biofarbo*, 18, 42.
 - Ministerio del Ambiente. 2015. Libro VI Anexo 4.
 - Molina, M. J., & Molina, L. T. (2004). Megacities and atmospheric pollution. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 54(6), 644-680.
 - Monarca S, Feretti D, Zanardini A, Falistocco E, Y Nardi G (1999), Monitoring of mutagens in urban air samples. *Mutation Research* 426:189–192.
 - Morawska, L., Thomas, S., Jamriskja, M. y Johnson, G., Modality of Particle Size Distribution of Environmental Aerosols. *Atmospheric Environment*. 33(27), 4401-4411. (1999).
 - Moreno, M.D. (2003). *Toxicología Ambiental Evaluación de riesgo para la salud humana*. España: Editorial McGraw-Hill
 - Moyad, M. A. (2004). Zinc for prostate disease and other conditions: a little evidence, a lot of hype, and a significant potential problem. *Urologic nursing*, 24(1), 49.
 - Needleman, H. L., Gunnoe, C., Leviton, A., Reed, R., Peresie, H., Maher, C., & Barrett, P. (1979). Deficits in psychologic and classroom performance of children with elevated dentine lead levels. *New England journal of medicine*, 300(13), 689-695.
 - Nguyen TH, Byeong-Kyu L. Characteristics of particulate matter and metals in the ambient air from a residential area in the largest industrial city in Korea. *Atmos Res* 2010; 98(2- 4):526–537.
 - Nicod, LP. Lung defences: an overview. *Eur Respir Rev* 14:45-50;2005.
 - Ondoy, J.M. y Wexler, A.S., Where Do Particulate Toxins Reside? An Improved Paradigm for the Structure and Dynamics of the Urban Mid-Atlantic Aerosol. *Environ. Sci. Technol.*, 32, 2547-2555. (1998).
 - Ortiz Q.M.O, Las, macromoleculares acuosolubles en de la ZMVM, partículas atmosféricas; coordinación general de posgrado e investigación. de la ZMVM, 2004.
 - Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Common* 1984; 123: 291- 298.



- Pachón, J. E., & Sarmiento Vela, H. (2008). Análisis espacio-temporal de la concentración de metales pesados en la localidad de Puente Aranda de Bogotá-Colombia. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*.
- Parra, A. Q., Gélvez, I. M. (2014). Identificación de hidrocarburos aromáticos Policíclicos (HaPs) en el aire de cúcuta-colombia: efecto gentóxico. *Revista EIA*, 11(21), 79-87.
- Parra, A. Q., Vargas, M. J. Q., & Martínez, J. A. H. (2010). Caracterización fisicoquímica del material particulado-fracción respirable PM_{2.5} en Pamplona-Norte de Santander-Colombia. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 8(1), 53-66.
- Parra, R. (2017). Efecto Fin de Semana en la calidad del aire de la ciudad de Cuenca, Ecuador. *ACI Avances en Ciencias e Ingenierías*, 9(15).
- Piñeiro, M., López, P., Muniategui, S., Prada, D., Querol, X. & Alastuey, A. (2003). A new method for the simultaneous determination of PAH and metals in samples of atmospheric particulate matter. *Atmospheric Environment*, 37, 4171-4175
- Pope III, C. A., Burnett, R. T., Thun, M. J., Calle, E. E., Krewski, D., Ito, K., & Thurston, G. D. (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *Jama*, 287(9), 1132-1141.
- Prahalad AK, Inmon J, Dailey LA, Madden MC, Ghio AJ, Gallagher JE. 2001. Air pollution particles mediated oxidative DNA base damage in a cell free system and in human airway epithelial cells in relation to particulate metal content and bioreactivity. *Chem Res Toxicol* 14 (7): 879-887.
- Préndez y P. Ulriksen, pp.111-186. Cabo de Hornos, Santiago, Chile. (1993).
- Préndez, M., Corvalán, R. M., & Cisternas, M. (2007). Estudio preliminar del material particulado de fuentes estacionarias: aplicación al sistema de compensación de emisiones en la región Metropolitana, Chile. *Información tecnológica*, 18(2), 93-103
- Préndez; M., Ortiz, J., Zolezzi, S., Campos, C. y Apablaza, N., Aerosoles Atmosféricos de Naturaleza Inorgánica. Contaminación en Santiago de Chile. *Revista Chilena Enferm. Respir.*, 7(4), 224-237. (1991).
- Querol, X., Alastuey, A., Rodriguez, S., Plana, F., Mantilla, E., & Ruiz, C. R. (2001). Monitoring of PM₁₀ and PM_{2.5} around primary particulate anthropogenic emission sources. *Atmospheric Environment*, 35(5), 845-858.
- Quijano Parra, A., Quijano Vargas, M. J., & Henao Martínez, J. A. (2010). Caracterización fisicoquímica del material particuladofracción respirable PM_{2.5} en Pamplona-Norte de Santander-Colombia. *Bistua:Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 8(1).
- Quijano Parra, A., Quijano Vargas, M. J., & Meléndez Gélvez, I. (2015). Cuantificación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (hap) en el material particulado pm_{2.5} de una zona residencial de pamplona, Colombia. *Luna Azul*, (40), 85-101.
- Raabe, O. Deposition and clearance of inhaled aerosols. In: *Mechanisms in Respiratory Toxicology*. Volume I. Witschi, H. and Nettesheim, P. Edit. CRC Press Inc. pp. 223;1982.
- Robert, M., RERAT, A., FOURNIER, E., DELAVEAU, P., LESTRADET, P., NORDMANN, R., ... & MERCADIER, M. (1997). Dégradation de la qualité des sols: risques pour la santé et l'environnement. Discussion: Pollution des sols et santé de l'homme. *Bulletin de l'Académie nationale de médecine*, 181(1), 21-42.
- Rojano, R. E., Angulo, L. C., & Restrepo, G. (2013). Niveles de Partículas Suspendidas Totales (PST), PM₁₀ y PM_{2.5} y su Relación en Lugares Públicos de la Ciudad Riohacha, Caribe Colombiano. *Información tecnológica*, 24(2), 37-46.



- Romero Placeres, M., Diego Olite, F., & Álvarez Toste, M. (2006). La contaminación del aire: su repercusión como problema de salud. *Revista cubana de higiene y epidemiología*, 44(2), 0-0.
- Sahagún, M., 2009. “Efecto genotóxico de la partículas Atmosféricas Urbanas”. Tesis de Pregrado. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigaciones y Estudios sobre Medio Ambiente y Desarrollo (CIEMAD).
- Samara, C., & Voutsas, D. (2005). Size distribution of airborne particulate matter and associated heavy metals in the roadside environment. *Chemosphere*, 59(8), 1197-1206.
- Samet, J. M., Zeger, S. L., Dominici, F., Curriero, F., Coursac, I., Dockery, D. W., ... & Zanobetti, A. (2000). The national morbidity, mortality, and air pollution study. Part II: morbidity and mortality from air pollution in the United States *Res Rep Health Eff Inst*, 94(pt 2), 5-79.
- Schwartz, J., Dockery, D. W., & Neas, L. M. (1996). Is daily mortality associated specifically with fine particles?. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 46(10), 927-939.
- Seaward M (1995), Use and abuse of heavy metals bioassay in environmental monitoring. *Science of the Total Environment* 176:129-134
- Shah, A. S., Langrish, J. P., Nair, H., McAllister, D. A., Hunter, A. L., Donaldson, K., ... & Mills, N. L. (2013). Global association of air pollution and heart failure: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, 382(9897), 1039-1048.
- Shi T, Duffin R, Borm PJA, Li H, Weishaupt and Schins RPF (2006) Hydroxyl-radical-dependent DNA damage by ambient particulate matter from contrasting sampling locations *Environ Res* 101:18–24
- Sienna, M. R., Rosazza, N.G. y Préndez, M. M. Polycyclic aromatic hydrocarbons and their molecular diagnostic ratios in urban atmospheric respirable particulate matter. *Atmospheric Research* 75, 267-281. (2005).
- Sierra Vargas M. P. (2012). Efecto invitro de las pm2. 5 contaminantes del aire de la zona metropolitana valle de mexico, sobre la generacion de especies reactivas del oxigeno por leucocitos polimorfonucleares humanos (Doctoral dissertation).
- Singh NP, Mccoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Expl Cell Res* 1988; 175:184-191.
- Sorensen M, Schins RPF, Hertel O and Loft S. 2005. Transition metals in personal samples of PM2.5 and oxidative stress in human volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(5): 1340-1343.
- Sosaky, K., Kurita, H., Carmichael, G., Chang, G. y Muran, K., Behavior of Sulfates, Nitrates and other Pollutants in the Long-range Transport of Air Pollution. *Atmospheric Environment*, 22(7), 1301-1308. (1988).
- Stayner L, Dankovic D, Smith R, Steenland K. Predicted lung cancer risk among miners exposed to diesel exhaust particles. *Am J Ind Med*. 1998 Sep;34(3):207–19.
- Suárez, A., & Augusto, C. (2012). Diagnóstico y control de material particulado: partículas suspendidas totales y fracción respirable PM10. *Revista Luna Azul*, (34).
- Suárez, V. D., & Pérez, C. P. (2006). Contaminación por material particulado en Quito y caracterización química de las muestras. *ACTA NOVA*, 3(2), 308.
- Suárez-Salas, L., Álvarez Tolentino, D., Bendezú, Y., & Pomalaya, J. (2017). Caracterización química del material particulado atmosférico del centro urbano de Huancayo, Perú. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 83(2), 187-199.
- TAMAYO, S. S., ESQUIVEL, E. M., CANTILLO, G. M., LUNA, L. C., & ROMERO, M. Mortalidad potencialmente relacionada con la explotación minero metalúrgica del níquel.



- Toro, M. V., Ramírez, J. J., Quiceno, R. A., & Zuluaga, C. A. (2001). Cálculo de la emisión vehicular de contaminantes atmosféricos en la ciudad de Medellín mediante factores de emisión Corinair. *Revista Acodal*, 191, 42-49.
- Secundaria, T. U. D. L. A. del Ministerio del Ambiente (TULSMA), en el Libro VI. Anexo 1-2-3-4-5-6-7.
- U.S. EPA. (2002). Health Assessment Document for Diesel Engine Exhaust, US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, National
- Vana, M., Tamm, E. y Vill, M., Experimental Study of the Air Pollution Transport by Synchronized Monitoring of Atmospheric Aerosols. *Atmospheric Environment*, 33(28), 4615-4628. (1999).
- Varona, M. S. M. M., Vila, M. G., Cabrera, T. A. P., & Arocha, T. A. F. Presencia de metales pesados en material particulado en aire. Estación de monitoreo INHEM, Centro Habana.
- Viana Rodríguez, M. D. M. (2003). Niveles, composición y origen del material particulado atmosférico en los sectores Norte y Este de la Península Ibérica y Canarias. *Universitat de Barcelona*.
- Viras, L.G., Siskos P.A., Samara C., Kouimtzis T., Athanasiou K., Y Vavatzandis A., 1991. Polycyclic aromatic hydrocarbons and mutagens in ambient air particles sampled in Thessaloniki, Greece. *Atmospheric Environment* 10: 999–1007.
- Westerholm R, Li H. A multivariate statistical analysis of fuel-related polycyclic aromatic hydrocarbon emissions from heavy-duty diesel vehicles. *Environ Sci Technol*. 1994 May 1;28(5):965–72.
- WHO Air Quality Guidelines for Europe 2nd ed. WHO Regional Publication European Series, N°91, Copenhagen (2000).
- Yeh, H.C. Phalen, T.R.F. and Raabe, O.G. Factors Influencing the Deposition of Inhaled Particles. *Environ Health Perspect* 15:147-156; 1976.
- Zamarréño, R. A., & Díaz, C. E. (2010). Cuantificación de elementos metálicos presentes en el material particulado pm 2.5 en la atmósfera de la ciudad de La Serena, Chile. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 1(1).
- Zhang, W. and Cui, J., Qi Q. (2001). Advances on the Biological Effect Indices for Fine Particles (PM_{2,5}) in Air. *Wei Sheng Yan Jiu*, 30(6), pp. 379-382.
- Zuluaga Quintero, M., Valencia Ruiz, A. M., & Ortiz Trujillo, I. C. (2009). Efecto genotóxico y mutagénico de contaminantes atmosféricos. *Medicina UPB*, 28(1).
- Hartwig A (2000) Recent advances in metal carcinogenicity. *Pure Appl Chem* 72(6):1007–1014.
- Gutiérrez-Castillo ME, Cebrián-García ME, de Vizcaya-Ruíz A, Roubicek DA, Sordo-Cedeño M, Ostrosky-Wegman P. 2006. Induced DNA damage and chemical composition of airborne particulates from Mexico city metropolitan area. *Environ Mol Mutagen* 47: 199-211.
- SAHAGUN VICTORINO, M. A. (2009). Efecto genotóxico de las partículas atmosféricas urbanas (Doctoral dissertation).



9. ANEXOS

Anexo 1. Cronograma de monitoreo ambiental

CRONOGRAMA DE MONITOREO AMBIENTAL PARA EL ANÁLISIS PRELIMINAR DE MATERIAL PARTICULADO PROYECTO DE GENOTOXICIDAD DEL MATERIAL PARTICULADO PM _{2,5} / UNIVERSIDAD DE CUENCA/CEA/DIUC				
	Ubicación	Responsables	FECHA	HORA
1	Av. De los Cerezos y calle de las Gladiolas	Anita/Mónica	23/03/2017	11:00-12:00
2	Abelardo j. Andrade	Anita/Mónica	23/03/2017	12:30-13:30
3	Felix Roggia y Yaupi	Anita/Mónica	24/03/2017	11:00-12:00
4	Av. De las América y Huacas	Anita/Mónica	24/03/2017	12:30-13:30
5	Panamericana Norte (sector la Llantera)	Anita/Dianita	27/03/2017	11:00-12:00
6	Calle Roma entre Sofía y Varsovia	Anita/Dianita	27/03/2017	12:30-13:30
7	Mariscal Lamar y A. Ortega (sector el Punto)	Anita /Mónica	28/03/2017	11:00-12:00
8	Quinta de Balzaín	Anita	28/03/2017	12:30-13:30
9	Avenida España y Elia Liut	Anita/Mónica	29/03/2017	11:00-12:00
10	Padrea Aguirre y Rafael María Arízaga	Anita/Pamela	29/03/2017	12:30-13:30
11	Del Antiplano y Duquilema (Sector Totoracocha)	Anita/Mónica	30/03/2017	11:00-12:00
12	Hospital del Río	Anita/Mónica	30/03/2017	12:30-13:30
13	El Tequila Sector Cristo del Consuelo)	Danilo/Mónica	31/03/2017	11:00-12:00
14	Av. Remigio Crespo Toral y Guayana	Danilo/Mónica	31/03/2017	12:30-13:30
15	Luis Cordero y Mariscal Sucre	Anita/Dianita	03/04/2017	11:00-12:00
16	Av. Yana Urco entre Rio Cutucú y Rio Upano	Anita/Dianita	03/04/2017	12:30-13:30
17	Popayan (Sector IESS)	Anita /Pamela	04/04/2017	11:00-12:00
18	C. Tamariz (sector Misticata) próxima a las Américas	Anita/Pamela	04/04/2017	12:30-13:30
19	Av. 10 de Agosto y V. Cordero (sector Iglesia del verbo)	Anita/Mónica	05/04/2017	11:00-12:00
20	José Peralta y Alfonso Cordero	Anita/Pamela	05/04/2017	12:30-13:30
21	Numa Pompilio Llona	Anita/Mónica	06/04/2017	11:00-12:00
22	Santa Marianita del Arenal	Anita/Pamela	06/04/2017	12:30-13:30
23	12 de Octubre y Cristóbal Colón (sector Parque Iberia)	Danilo/Mónica	07/04/2017	11:00-12:00
24	Roberto Crespo Toral y Miguel Moreno	Danilo/Mónica	07/04/2017	12:30-13:30
25	Macas y Tena Ciudadela Chaguarchimbana	Anita/Dianita	10/04/2017	11:00-12:00
26	Av. De las Américas y Av. Loja	Anita/Dianita	10/04/2017	12:30-13:30
27	Circunvalación Sur y Diego de Tapia	Anita /Mónica	11/04/2017	11:00-12:00
28	Av. Circunvalación Sur (Sector UDA)	Anita /Mónica	11/04/2017	12:30-13:30



Anexo 2. Registro de las concentraciones de Material Particulado PM₁₀ y PM_{2,5} del área urbana de la ciudad de Cuenca.

CRONOGRAMA DE MONITOREO AMBIENTAL PARA EL ANÁLISIS PRELIMINAR DE MATERIAL PARTICULADO									
PROYECTO DE GENOTOXICIDAD DEL MATERIAL PARTICULADO PM _{2,5} / UNIVERSIDAD DE CUENCA/CEA/DIUC									
	Ubicación	Responsables	FECHA	HOR A	Filtro	Conc. Prom.(µg/m ³)	Conc. Mínima (µg/m ³)	Conc. Máxima(µg/m ³)	Temperatura (°C)
1	Av. De los Cerezos y calle de las Gladiolas	Anita/Mónica	23/03/2017	11:00-12:00	PM10	4,29	3,97	4,76	22,3
					PM2,5	2,06	1,98	2,06	22,3
2	Abelardo J. Andrade	Anita/Mónica	23/03/2017	12:30-13:30	PM10	1,72	1,67	1,86	22,0
					PM2,5	1,22	1,20	1,30	22,0
3	Felix Roggia y Yaupi	Anita/Mónica	23/03/2017	11:00-12:00	PM10	3,43	3,38	3,51	23,4
					PM2,5	2,91	2,71	3,41	23,4
4	Mariscal Lamar y A. Ortega (sector el Punto)	Anita/Dianita	27/03/2017	11:00-12:00	PM10	2,81	2,81	2,87	20,0
					PM2,5	2,03	2,02	2,04	20,0
5	Quinta de Balzaín	Anita/Dianita	27/03/2017	12:30-13:30	PM10	2,19	2,07	2,24	18,0
					PM2,5	1,95	1,93	2,01	18,0
6	Panamericana Norte (sector la Llantera)	Anita /Mónica	28/03/2017	11:00-12:00	PM10	1,75	1,68	1,80	26,2
					PM2,5	1,54	1,49	1,63	26,2
7	Calle Roma entre Sofía y Varsovia	Anita/Mónica	28/03/2017	12:30-13:30	PM10	2,24	2,22	2,30	22,7
					PM2,5	1,64	1,55	1,90	22,7
8	Max Uhle y Gil Ramiro Dávalos	Anita/Mónica	29/03/2017	11:00-12:00	PM10	2,18	2,14	2,26	23,2
					PM2,5	1,12	1,57	1,74	23,2
9	Padrea Aguirre y Rafael María Arízaga	Anita/Pamela	29/03/2017	12:30-13:30	PM10	2,76	2,67	2,96	26,5
					PM2,5	1,95	1,90	2,15	26,5
10	C. Tamariz (sector Misticata) próxima a las Américas	Anita/Mónica	30/03/2017	11:00-12:00	PM10	2,02	1,99	2,06	21,3
					PM2,5	1,01	0,96	1,11	21,3
11	Santa Marianita del Arenal	Anita/Mónica	30/03/2017	12:30-13:30	PM10	2,29	2,20	2,39	26,2
					PM2,5	4,34	4,04	5,41	26,2
12	El Tequila Sector Cristo del Consuelo)	Danilo/Mónica	31/03/2017	11:00-12:00	PM10	1,55	1,52	1,58	16,4
					PM2,5	2,64	2,64	2,64	16,4
13	Av. Remigio Crespo Toral y Guayana	Danilo/Mónica	31/03/2017	12:30-13:30	PM10	5,93	5,78	6,23	16,0
					PM2,5	1,03	1,03	1,07	30,0
14	Luís Cordero y Mariscal Sucre	Anita/Dianita	03/04/2017	11:00-12:00	PM10	2,59	2,48	2,81	25,2
					PM2,5	3,44	3,42	3,48	25,2
15	Av. Yana Urco entre Río Cutucú y Río Upano	Anita/Dianita	07/04/2017	12:30-13:30	PM10	1,73	1,63	1,73	25,6
					PM2,5	1,37	1,37	1,37	25,6
16	Popayan (Sector IESS)	Anita /Pamela	04/04/2017	11:00-12:00	PM10	4,03	3,65	4,23	22,8
					PM2,5	1,71	1,65	1,81	22,8
17	Hospital del Río	Anita/Pamela	04/04/2017		PM10	2,04	2,01	2,10	25,1



				12:30-13:30	PM2,5	1,74	1,74	1,80	25,1
18	Av. 10 de Agosto y V. Cordero (sector Iglesia del verbo)	Pamela/Mónica	05/04/2017	11:00-12:00	PM10	1,47	1,43	1,50	22,3
					PM2,5	3,02	2,96	3,14	22,3
19	José Peralta y Alfonso Cordero	Pamela/Mónica	05/04/2017	12:30-13:30	PM10	1,72	1,67	1,77	25,1
					PM2,5	1,30	1,30	1,33	25,1
20	Av. De las Américas y Av. Loja	Anita/Mónica	06/04/2017	11:00-12:00	PM10	1,99	1,98	2,02	18,0
					PM2,5	2,67	2,66	2,68	18,0
21	Circunvalación Sur y Diego de Tapia	Anita/Pamela	11/04/2017	12:30-13:30	PM10	1,88	1,85	1,92	21,2
					PM2,5	3,35	3,27	3,4	21,2
22	12 de Octubre y Cristóbal Colón (sector Parque Iberia)	Danilo/Mónica	07/04/2017	11:00-12:00	PM10	4,01	3,75	4,69	22,4
					PM2,5	2,73	2,69	2,79	22,4
23	Roberto Crespo Toral y Miguel Moreno	Danilo/Mónica	06/04/2017	12:30-13:30	PM10	1,56	1,54	1,72	24,0
					PM2,5	1,82	1,75	1,83	24,0
24	Macas y Tena Ciudadela Chaguarchimbanana	Anita/Dianita	07/04/2017	11:00-12:00	PM10	2,59	2,53	2,60	26,1
					PM2,5	2,22	2,22	2,24	26,1
25	Del Antiplano y Duquilema (Sector Totoracocha)	Anita/Dianita	07/04/2017	12:30-13:30	PM10	0,33	0,32	0,33	28,0
					PM2,5	1,69	1,58	1,70	28,0
26	Numa Pompilio Llona	Anita /Mónica	11/04/2017	11:00-12:00	PM10	1,60	1,6	1,67	29,3
					PM2,5	2,16	2,16	2,17	29,3
27	Av. Circunvalación Sur (Sector UDA)	Anita /Mónica	11/04/2017	12:30-13:30	PM10	3,52	3,47	3,55	24,6
					PM2,5	2,16	2,07	2,16	24,6



Anexo 3. Concentraciones de Material Sedimentable en el área urbana de Cuenca

(Del 17/05/2017 hasta el 18/06/2017)

No	Sitios de Monitoreo			Concentración de Material Sedimentable mg/cm ² x 30 días
		x	y	
Punto P1	Av. De los Cerezos y calle de las Gladiolas	717898,230	9681176,220	0,25
Punto P2	Abelardo J. Andrade	719844,400	9681265,020	0,23
Punto P3	Félix Roggia y Yaupi	721821,220	9681200,130	0,99
Punto P4	Mariscal Lamar y A. Ortega (sector el Punto)	720006,000	9680370,000	0,51
Punto P5	Quinta de Balzaín	718338,000	9680312,000	0,40
Punto P7	Calle Roma entre Sofía y Varsovia	727690,290	9681158,980	0,36
Punto P8	Max Uhle y Gil Ramiro Dávalos	723642,520	9680521,020	1,56
Punto P10	C. Tamariz (sector Misicata) próxima a las Américas	717986,540	9678656,890	1,34
Punto P11	Santa Marianita del Arenal	717984,940	9677735,240	0,98
Punto P12	El Tequila Sector Cristo del Consuelo)	718050,290	9679793,480	2,95
Punto P14	Luís Cordero y Mariscal Lamar	721921,330	9679815,620	0,79
Punto P15	Av. Yana Urco entre Rio Cutucú y Rio Upano	723918,890	9679598,850	0,82
Punto P18	Av. 10 de Agosto y V. Cordero (sector Iglesia del verbo)	719530,960	9678654,200	1,38
Punto P19	José Peralta y Alfonso Cordero	721909,240	9678557,850	2,00
Punto P21	Circunvalación Sur y Diego de Tapia	719775,160	9676994,780	3,57
Punto P22	12 de Octubre y Cristóbal Colón (sector Parque Iberia)	720146,840	9677547,130	0,68
Punto P23	Roberto Crespo Toral y Miguel Moreno	721753,110	9677605,730	0,61
Punto P24	Macas y Tena Ciudadela Chaguarchimbana	723792,110	9677786,440	2,83
Punto P25	Del Antiplano y Duquilema (Sector Totoracocha)	725711,770	9680302,280	0,56
Punto P26	Benigno Vela y J. Bustamante.	723669,870	9678524,000	0,16
Punto P27	Av. Circunvalación Sur (Sector UDA)	722184,350	9676929,080	5,11



Anexo 4. Concentraciones de PM_{2,5}

	CODIGO	Extracto	Flujo m ³ / 24h	Presión mmHg	Temperatura OC	concentración ug/m ³	concentración corrugada ug/m ³
1	P6268199	Hidrocarburos	24,0058	563,679	15,60766551	20,82834	27,19742
2	P6268200	acuoso	24,0082	563,906	15,76968641	12,49572	16,31938
3	P6268196	orgánicos	24,0090	564,111	14,60731707	24,99067	32,49452
4	P6268197	acuoso	24,0050	564,895	15,26794425	24,99479	32,52933
5	P6268198	orgánicos	24,0060	564,902	14,89303136	45,82187	59,55632
6	P6268174	Acuoso	24,0080	525,334	15,52369338	24,99166	35,00563
7	P6268173	acuoso	24,0086	563,909	17,40592334	24,99108	32,82302
8	P6268171	orgánicos	24,0072	564,024	15,73135889	12,49627	16,31450
9	P6268172	acuoso	24,0065	564,850	17,13623693	20,82769	27,28394
10	P6268168	orgánicos	24,0082	564,763	16,55261324	24,99150	32,67765
11	P6268169	Metales pesados	24,0075	564,930	16,57421603	24,99218	32,67130
12	P6268167	acuoso	24,0062	566,530	13,07560976	12,49680	16,09364
13	P6268170	acuoso	24,0097	565,125	15,07770035	45,81478	59,56179
14	P6268166	acuoso	24,0059	563,909	16,65679443	24,99390	32,74205
15	P6404108	orgánicos	24,0092	562,547	17,35017422	20,82534	27,41275
16	P6404109	orgánicos	24,0076	562,615	17,04652778	12,49607	16,42962
17	P6404110	Hidrocarburos	24,0084	562,425	16,39581882	20,82603	27,32949
18	P6404111	orgánicos	24,0061	562,268	17,11881533	24,99364	32,88965
19	P6404112	Orgánicos	24,0082	562,923	16,59860627	16,66100	21,85977
20	P6404113	acuoso	24,0057	562,289	17,78013937	20,82843	27,47001
21	P6404114	acuoso	24,0079	561,268	16,36445993	16,66117	21,90673
22	P6404115	Metales pesados	24,0075	561,236	15,84965278	20,82682	27,33673
1	P6268165	Orgánicos	24,0085	560,059	14,52369338	12,49559	16,36040
2	P6268164	acuoso	24,0076	559,676	14,9554007	20,82673	27,32795
3	P6268163	acuoso	24,0060	560,645	15,39338	4,16562	5,46481
4	P6268162	Hidrocarburos	24,0064	560,328	15,87805	12,49669	16,43104
5	P6268161	acuoso	24,0061	560,436	14,39791	12,49685	16,34390
6	P6268160	Metales pesados	23,4752	560,395	14,1884	12,77946	16,70253
7	P6268159	Orgánicos	24,0083	560,785	14,82257	12,49570	16,35636
8	P6268158	acuoso	24,0069	559,307	15,90767	4,16548	5,48746
9	P6268157	acuoso	24,0079	559,181	15,55261	16,66121	21,92685
10	P6268156	Orgánicos	24,0075	559,587	14,67188	20,82682	27,30551
11	P6268155	acuoso	24,0052	561,206	14,52578	4,16576	5,44311
12	P6268154	Hidrocarburos	24,0063	560,700	15,02474	8,33116	10,91445



13	P6268153	Orgánicos	24,0046	560,317	15,42300	4,16586	5,46887
14	P6268152	acuoso	24,0065	559,692	15,35385	16,66214	21,89296
15	P6404124	Orgánicos	24,0081	561,087	16,88293	29,15687	38,41763
16	P6404118	Orgánicos	24,0068	560,937	18,54599	16,66194	22,08593
17	P6404119	acuoso	24,0068	560,683	17,90836	20,82743	27,55953
18	P6404120	Orgánicos	24,0082	561,017	17,09792	24,99146	32,95773
19	P6404121	Orgánicos	24,0062	560,798	17,48537	29,15919	38,52039
20	P6404122	acuoso	24,0062	561,129	15,92369	12,49680	16,41030
21	P6404123	Metales pesados	24,0079	561,268	16,36446	24,99176	32,86010
22	P6404142	acuoso	24,0075	561,236	15,84965	12,49609	16,40204
1	P6404117	Hidrocarburos	24,0080	562,118	15,69024	16,66111	21,82254
2	P6268151	acuoso	24,0058	563,101	12,86063	24,99396	32,35939
3	P6268195	orgánico	24,0087	562,620	14,32195	16,66062	21,69911
4	P6268194	acuoso	24,0082	562,052	14,52857	20,82625	27,17144
5	P6268193	orgánico	24,0070	562,568	14,31324	24,99275	32,55308
6	P6268192	acuoso	24,0057	562,662	14,06899	41,65685	54,20290
7	P6268191	acuoso	24,0060	561,993	13,23194	20,82813	27,05420
8	P6268190	acuoso	24,0065	562,404	12,44682	29,15880	37,74361
9	P6268189	acuoso	24,0053	562,467	13,41115	20,82878	27,04917
10	P6268188	orgánico	24,0060	561,843	13,97596	20,82812	27,13175
11	P6268187	acuoso	24,0059	561,021	15,73206	37,49086	49,20833
12	P6268185	Hidrocarburos	24,0057	561,861	14,36411	45,82244	59,76948
13	P6268184	orgánico	24,0042	562,014	12,657143	12,49781	16,20054
14	P6404116	Metales pesados	24,0078	562,216	14,840070	37,48788	48,94814
15	P6268183	acuoso	24,0076	562,066	13,896	45,81881	59,64552
16	P6268182	orgánico	24,0067	562,300	14,859	12,49651	16,31540
17	P6268181	Metales pesados	24,0075	561,063	15,091	24,99223	32,72804
18	P6268180	orgánico	24,0078	560,889	15,848	37,48788	49,23582
19	P6268179	acuoso	24,0067	561,090	15,755	45,82064	60,13876
20	P6268178	orgánico	24,0072	561,132	16,319	33,32332	43,81850
21	P6268177	acuoso	24,0043	561,516	14,179	29,16144	38,03617
22	P6268176	orgánico	24,0085	561,160	15,027	29,15634	38,16605



Anexo 5. Análisis Químico del PM_{2,5}

 CESEM Agencia de Servicios y Análisis de Inorgánicos, Metales y No Metales	 UCUENCA-EP ADMINISTRACIÓN DE SERVICIOS, GESTIÓN TECNOLÓGICA Y CONSULTORÍA ESPECIALIZADA ENTIDAD PÚBLICA DEL PA. UNIVERSIDAD DE CUENCA	Nº RMG 1781-83 Hoja 1 de 1
REPORTE DE RESULTADOS		


CLIENTE: Dra. Nancy García
MUESTRA: LÍQUIDO CON PRESENCIA DE PRECIPITADO (6) PROYECTO GENOTOXICIDAD DEL MATERIAL PARTICULADO (PM 2.5) SUSPENDIDO EN EL AIRE AMBIENTE DE LA ZONA URBANA DE CUENCA
FECHA: 2018-11-27

ANÁLISIS QUÍMICO

MUESTRA	Fe mg/l	Zn mg/l	Ni mg/l	Pb mg/l	Cd mg/l
Punto 1 – Centro Histórico	1,42	0,11	N.C	N.C	N.C
Punto 2 – Basílica	1,46	0,10	N.C	N.C	N.C
Punto 3 – Coral Centro	2,25	0,19	N.C	N.C	N.C

OBSERVACIONES:

- Método: Digestión ácida y lectura por Espectrometría Absorción Atómica. Equipo: PERKIN ELMER AANALYST 400
- N.C. No cuantificado
- Límite de detección del Cadmio: 0,038 mg/l
- Límite de detección del Plomo: 0,15 mg/l
- Límite de detección del Níquel: 0,10 mg/l
- Fecha de recepción de muestra: 2018-11-08


 Responsable Área Metales
 Marcela Idrovo G.


 Director CESEM
 Marcela Idrovo G.

cc. archivo
mig

Notas: Este informe sólo afecta a los objetos sometidos a ensayo.
 Este el informe no deberá reproducirse más que en su totalidad, previa autorización escrita del CESEM.
 El laboratorio no se responsabiliza del muestreo, los análisis se efectúan sobre la muestra entregada por el cliente.
 Los datos sobre la muestra, incluido el nombre, son proporcionados por el cliente v son de su entera responsabilidad.

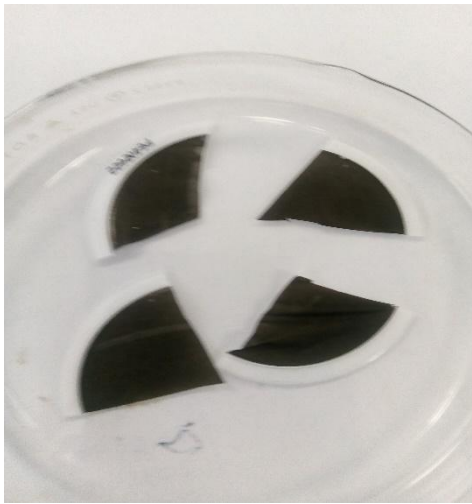
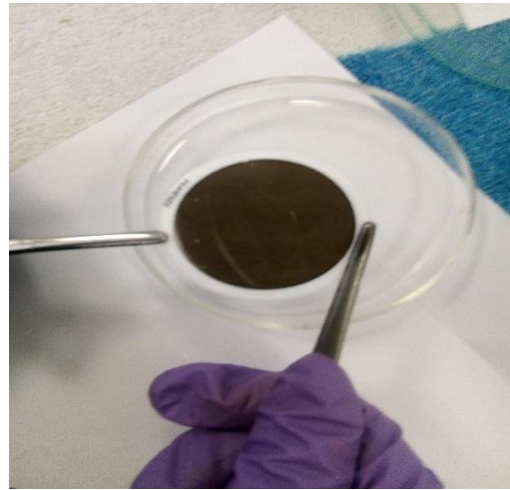
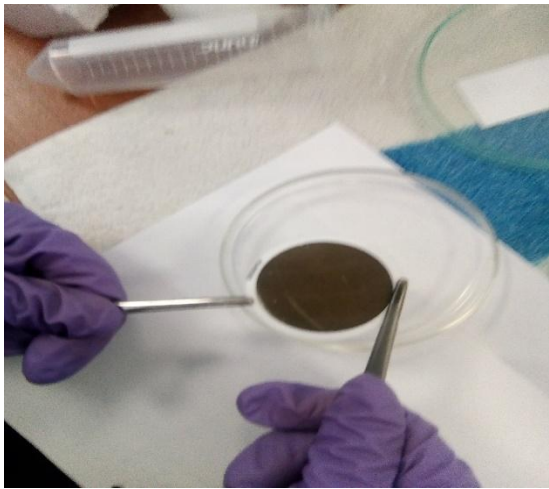
FMC2302-01

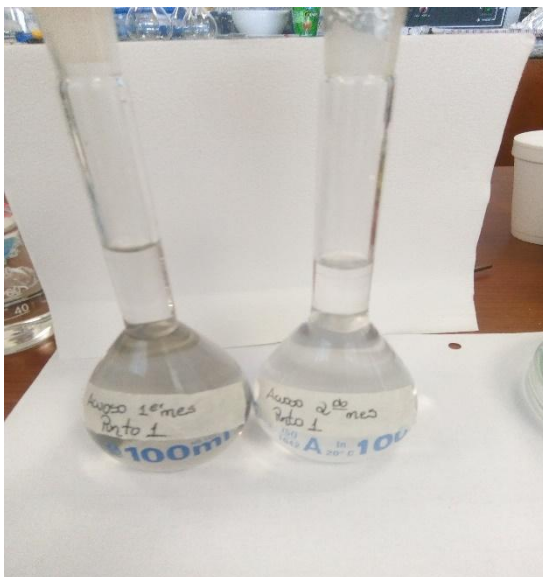
Universidad de Cuenca, sector Balzay- Teléfono: (07) 4089561
 Email: cesemin@ucuencaep.com.ec
 Cuenca - Ecuador

Anexo 6: Imágenes del proceso de toma de muestra y preparación del extracto acuoso.









Anexo 7: Imágenes del Ensayo Cometa

