



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Maestría en Toxicología Industrial y Ambiental II Cohorte

Efecto genotóxico de los compuestos orgánicos Benzo(a)pireno, Benzo(a)antraceno, Benzo(b)fluoranteno y Fenantreno del material particulado PM<sub>2,5</sub> del aire de la ciudad de Cuenca sobre células CHO-K1

Trabajo de titulación previo a la obtención de Magíster en Toxicología Industrial y Ambiental.

Autora:

Ing. Cinthya Pamela Vázquez Guillén

CI: 0104457130

Directora:

Ph.D. Diana Lucía Moscoso Vanegas

CI: 0102339454

**Cuenca Ecuador**

03-junio-2019

## RESUMEN

La industrialización y el aumento del parque automotor, son factores primordiales para la formación de material particulado, el cual es considerado, como uno de los principales responsables de ocasionar afección en la salud de la población humana.

Siendo la mayor fuente de generación de material particulado la combustión incompleta de vehículos con motor a diésel, debido a que favorece a la formación de hidrocarburos aromáticos policíclicos, a los que se les ha catalogado como sustancias carcinogénicas y mutagénicas según la clasificación establecida por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC).

Por esta razón se planteó establecer la existencia de los hidrocarburos: Benzo(a)pireno, Benzo(a)antraceno, Benzo(b)fluoranteno, y el fluoranteno en el material particulado PM 2,5 recolectado en tres puntos monitoreados en la ciudad de Cuenca previamente definidos empleando cromatografía gaseosa acoplada a masas, encontrándose Benzo(a)Antraceno en una concentración de  $0,001893 \text{ ng/m}^3$  determinado en el punto P1 ubicado en la calle Sangurima entre Benigno Malo y Luis Cordero. Siendo éste considerado de bajo riesgo ya que se encuentra por debajo de lo propuesto en diversas regulaciones internacionales como la Comisión Europea ( $1 \text{ ng/m}^3$ ).

Al realizar el análisis estadístico no paramétrico del ensayo cometa previa demostración de viabilidad celular se encontró la existencia de diferencia significativa, al comparar los valores obtenidos en longitud de cola para células sometidas a la fracción orgánica cuya concentración fue de  $0,1 \text{ m}^3/\text{ml}$ , con aquellas medidas obtenidas del blanco. Resultado que acepta la hipótesis determinando así, la posibilidad daño genético en todos los puntos monitoreados.

**Palabras claves:** Genotoxicidad. Material particulado. Ensayo cometa. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Células CHO-K1.

## ABSTRACT

The industrialization and the increase of the automotive park, are fundamental factors for the formation of particulate material, which is considered, as one of the main responsible for the opportunity of human education.

Being the main source of generation of particulate matter the incomplete combustion of vehicles with motor and diesel, because it favors the formation of police aromatic hydrocarbons, and what has been cataloged as carcinogenic and mutagenic substances according to the classification of the International Agency for Cancer Research (IARC).

For this reason, the existence of hydrocarbons is considered: Benzo (a) pyrene, Benzo (a) anthracene Benzo (b) fluoranthene, and fluoranthene in particulate material PM 2,5 collected at monitored points in the city of Cuenca previously defined. Using gas chromatography coupled to masses, finding Benzo (a) Anthracene compound that assesses its potential damage can be transformed to the toxic concentration equivalent to Benzo (a) pyrotechnic value which was 0,001893 ng / m<sup>3</sup> determined at point P1 in the Sangurima street between Benigno Malo and Luis Cordero. Being this considered as of low risk since it is below what has been published in different regions such as the European Commission (1 ng/m<sup>3</sup>).

When performing the nonparametric statistical analysis of the comet assay cell viability deployment using the difference difference, in the direction of the tail of the cells. with those measures. The possibility of genetic damage at all monitored points.

**Keywords:** Genotoxicity. Particulate material. Comet test. Polycyclic aromatic hydrocarbons. CHO-K1 Cells.

**ÍNDICE**

<b>ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>CAPITULO I: INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>16</b>
<b>CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 ATMÓSFERA .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 CONTAMINACIÓN DEL AIRE.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3 MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO .....</b>	<b>22</b>
<b>2.4 COMPOSICIÓN ELEMENTAL DEL MATERIAL PARTICULADO .....</b>	<b>23</b>
<b>2.5 FUENTES DE MATERIAL PARTICULADO .....</b>	<b>25</b>
<b>2.6 MATERIAL PARTICULADO PM 2,5 .....</b>	<b>26</b>
<b>2.7 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS .....</b>	<b>27</b>
<b>2.7.1 Toxicidad de los hidrocarburos aromáticos policíclicos .....</b>	<b>28</b>
<b>2.8 ESTANDARES DE LA CALIDAD DEL AIRE PARA MATERIAL PARTICULADO PM 2,5.....</b>	<b>33</b>
<b>2.9 IMPACTO DE LA CONTAMINACIÓN POR PARTÍCULAS ATMOSFÉRICAS EN LA SALUD HUMANA Y PÚBLICA .....</b>	<b>35</b>
<b>2.10 MECANISMO DE DEPOSICIÓN DE AEROSOLES EN EL SISTEMA RESPIRATORIO.....</b>	<b>37</b>
<b>2.10.1 Deposición por impactación inercial .....</b>	<b>38</b>
<b>2.10.2 Deposición por sedimentación.....</b>	<b>38</b>
<b>2.10.3 Deposición por difusión.....</b>	<b>38</b>
<b>2.11 TOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DEL MATERIAL PARTICULADO .....</b>	<b>39</b>
<b>2.12 ADN Y LA GENOTOXICIDAD .....</b>	<b>42</b>
<b>2.13 BIOMARCADORES: INDICADORES DE DAÑO GENETICO .....</b>	<b>46</b>
<b>2.13.1 BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN .....</b>	<b>47</b>
<b>2.13.2 BIOMARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD:.....</b>	<b>47</b>
<b>2.13.3 BIOMARCADORES DE EFECTO:.....</b>	<b>48</b>
<b>2.14 PRUEBA DE GENOTOXICIDAD: ENSAYO DEL COMETA .....</b>	<b>50</b>
<b>CAPITULO III.....</b>	<b>52</b>
<b>3.1 METODOLOGÍA .....</b>	<b>52</b>
<b>3.2 DISEÑO DEL ESTUDIO .....</b>	<b>52</b>
<b>3.2.1 LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA .....</b>	<b>52</b>
<b>3.2.2 ASPECTOS DEMOGRÁFICOS .....</b>	<b>53</b>
<b>3.2.3 CARACTERÍSTICAS CLIMÁTICAS .....</b>	<b>54</b>
<b>3.3 DISEÑO DE ESTUDIO.....</b>	<b>54</b>



<b>3.4 SELECCIÓN DE LOS SITIOS DE MONITOREO Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS</b> .....	55
<b>3.4.1 ESTABILIZACIÓN DE FILTROS DE LAS CONCENTRACIONES DE PM 2,5</b> .....	58
<b>3.5 ANÁLISIS QUÍMICO</b> .....	58
<b>3.6 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR</b> .....	59
<b>3.6.1 MODELO BIOLÓGICO</b> .....	59
<b>3.6.2 CONDICIONES DE CULTIVO</b> .....	60
<b>3.6.3 PROTOCOLO</b> .....	60
<b>3.7 PRUEBA DE GENOTOXICIDAD ENSAYO DEL COMETA</b> .....	61
<b>CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	62
<b>4.1 CONCENTRACIÓN DEL MATERIAL PARTICULADO</b> .....	62
<b>4.2 RELACIÓN ENTRE EL MATERIAL PARTICULADO PM 2,5 Y LAS CONDICIONES METEREOLÓGICAS</b> .....	65
<b>4.3 CARACTERIZACIÓN QUIMICA DEL MATERIAL PARTICULADO PM 2,5</b> .....	69
<b>4.4 VIABILIDAD DE LA SOLUCIÓN ORGÁNICA DE PM 2,5 EN LA LINEA CELULAR CHO-K1</b> .....	73
<b>4.5 LARGO DE COLA CON EL EXTRACTO ORGÁNICO DEL MATERIAL PARTICULADO 2,5</b> .....	76
<b>4.6 MOMENTO DE COLA CON EL EXTRACTO ORGÁNICO DEL MATERIAL PARTICULADO 2,5</b> .....	79
<b>4.7 INTENSIDAD DE COLA CON EL EXTRACTO ORGÁNICO DEL MATERIAL PARTICULADO 2,5</b> .....	81
<b>CAPITULO V</b> .....	83
<b>5.1 CONCLUSIONES</b> .....	83
<b>5.2 RECOMENDACIONES</b> .....	83
<b>ANEXOS</b> .....	95

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Normativa vigente para el material particulado PM 2,5 .....	35
Tabla 2. Tipo de biomarcadores.....	49
Tabla 3. Localización de los sitios de muestreo.....	55
Tabla 4. Período de monitoreo del PM 2,5 en la ciudad de Cuenca, año 2018 .....	57
Tabla 5. HAPs y tiempos retención .....	69
Tabla 6. Datos del Benzo(a)Antraceno .....	70
Tabla 7. Concentración de Benzo(a)Antraceno en el punto P1.....	71
Tabla 8. Factores de Toxicidad Equivalente (TEF) de los HAPs .....	72
Tabla 9. Resultado del conteo de células vivas .....	73
Tabla 10. Porcentaje de Viabilidad Celular .....	74
Tabla 11. Valor medio del porcentaje de Viabilidad.....	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos agrupados según el número de anillos aromáticos .....	29
Figura 2. Deposición de partículas en la región carina .....	39
Figura 3. Proceso de deposición de las partículas según su diámetro aerodinámico .....	40
Figura 4. Lesiones causadas por la Radiación Ultravioleta .....	43
Figura 5. Vía metabólica en la cual el b(a)p se bioactiva a b(a)pDE .....	45
Figura 6. Estructura química del b(a)p. Formación del metabolito b(a)pDE mediada por CYP450 Y epóxido hidrolasas .....	46
Figura 7. Mapa de ubicación general .....	53
Figura 8. Mapa de ubicación de los puntos de monitoreo .....	56
Figura 9. Equipo empleado en el monitoreo .....	57
Figura 10. Células CHO-K1 .....	59
Figura 11. Concentración del material particulado PM 2,5, Punto 1, (Mayo, Junio y Octubre) ..	62
Figura 12. Concentración del material particulado PM 2,5, Punto 2, (Julio, Septiembre). .....	63
Figura 13. Concentración del material particulado PM 2,5, Punto 3, (Agosto, Septiembre). .....	63
Figura 14. Variación de la concentración del material particulado PM 2,5 del punto P1 en función de las condiciones meteorológicas .....	65
Figura 15. Variación de la concentración del material particulado PM 2,5, del punto P2 en función de las condiciones meteorológicas .....	66
Figura 16. Variación de la concentración del material particulado PM 2,5 del punto P3 en función de las condiciones meteorológicas .....	67
Figura 17. Curva de calibración del Benzo(a)Antraceno .....	70
Figura 18. Porcentaje de Viabilidad Celular en el Punto 1 .....	74
Figura 19. Porcentaje de Viabilidad Celular en el Punto 2 .....	75
Figura 20. Porcentaje de Viabilidad Celular en el Punto 3 .....	75
Figura 21. Efecto genotóxico – largo de cola Punto P1 .....	77
Figura 22. Efecto genotóxico – largo de cola Punto P2 .....	77
Figura 23. Efecto genotóxico – largo de cola Punto P3 .....	77
Figura 24. Efecto genotóxico – momento de cola Punto P1 .....	79
Figura 25. Efecto genotóxico – momento de cola Punto P2 .....	79
Figura 26. Efecto genotóxico – momento de cola Punto P3 .....	80
Figura 27. Efecto genotóxico – intensidad de cola Punto P1 .....	81
Figura 28. Efecto genotóxico – intensidad de cola Punto P2 .....	81
Figura 29. Efecto genotóxico – intensidad de cola Punto P3 .....	82



## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. Análisis preliminar de material particulado .....	95
Anexo B. Condiciones meteorológicas obtenidas durante período de monitoreo .....	97
Anexo C. Captura de pantalla del cromatograma perteneciente al patrón .....	99
Anexo D. Análisis estadístico de viabilidad .....	100
Anexo E. Análisis estadístico de genotoxicidad .....	102
Anexo F. Reporte de análisis en filtro .....	107
Anexo G. Reporte de análisis de cromatografía de la universidad técnica particular de Loja .	110
Anexo H. Fotografías .....	113

### Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Cintha Pamela Vázquez Guillén, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Efecto genotóxico de los compuestos Benzo(a)pireno, Benzo(a)antraceno, Benzo(b)fluoranteno, y Fenantreno del material particulado PM<sub>2,5</sub> del aire de la ciudad de Cuenca sobre células 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.

Asimismo, 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, junio de 2019.



Cintha Pamela Vázquez Guillén

C.I: 0104457130

## Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Cinthy Pamela Vázquez Guillén autora del trabajo de titulación "(Efecto genotóxico de los compuestos Benzo(a)pireno, Benzo(a)antraceno, Benzo(b)fluoranteno, y Fenantreno del material particulado PM<sub>2,5</sub> del aire de la ciudad de Cuenca sobre células CHO-K1)", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, junio de 2019.



---

Cinthy Pamela Vázquez Guillén

C.I: 0104457130

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos quienes de forma directa o indirecta contribuyeron para la culminación de este trabajo.

Al Centro de Estudios Ambientales por brindarme la oportunidad de participar en este proyecto de investigación, a la Ing. Ana Lucía Astudillo y a la PhD. Diana Moscoso por su apoyo y colaboración brindada durante este proceso.

Al Centro de Biología Celular y Molecular de la Universidad Técnica de Loja - Dra. Natalia Bailón y también a las estudiantes Anita y Cristina Cueva por la asesoría y colaboración brindada durante esta investigación.



## DEDICATORIA

La preocupación y el amor recibido con la que cada día mis padres demostraban por el avance de mi tesis, es simplemente único e irremplazable.

Gracias a Dios porque en cada situación difícil siempre me sostuvo, y me dio la fortaleza, sabiduría e inteligencia necesaria para poder cumplir mis metas, gracias por que cada día bendice mi vida con la hermosa oportunidad de estar y disfrutar a lado de los que sé que más me aman y a las que yo sé que más amo, mis padres, hermanos y mis peques.

Gracias a mi familia por siempre desear y anhelar lo mejor para mi vida, gracias por cada consejo y por cada palabra de ánimo, en especial a mi hermano por siempre estar ahí cuando lo necesito y sobre todo por decirme las palabras exactas cuando sentía que no iba a lograrlo.

A todos los que colaboraron en mayor y menor grado en la elaboración del presente trabajo...  
Gracias!!

Pame



## **ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA**

**ADN** Acido Desoxirribonucleico

**AhR** Hidrocarburo de Arilo (por la traducción del inglés)

**BrEt** Bromuro de Etidio

**CEA** Centro de Estudios Ambientales

**COVS** Compuestos orgánicos volátiles

**DMSO** Dimetilsulfóxido

**DSB** Roturas de doble cadena (por la traducción del inglés)

**EH** Epóxido hidrolasa

**EPA** Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos

**FDA** Diacetato de Fluroesceína

**GAD** Gobierno Autónomo Descentralizado

**GST** glutatión S-transferasas

**HPLC** Cromatografía líquida de alta eficacia (por la traducción del inglés)

**IARC** Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer

**IgE** Inmunoglobulina

**INEC** Instituto Nacional de Estadísticas y Censos

**NECAA** Norma Ecuatoriana de Calidad del Aire Ambiente

**OMS** Organización Mundial de la Salud

**PDOT** Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial

**PM** Material Particulado

**PM 2,5** Material Particulado PM2,5



**PBS** Buffer Fosfato Salino (por la traducción del inglés)

**ROS** Especies reactivas de oxígeno (por la traducción del inglés)

**SFB** Suero fetal bovino

**SSB** Roturas de cadena simple (por la traducción del inglés)

**TULSMA** Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente

**USEPA** Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos

## **GLOSARIO**

**CROMATOGRAFÍA:** Es la separación de los componentes de una mezcla sobre la base de su diferente movilidad (fase estacionaria) cuando son arrastrados por un fluido (fase móvil o eluyente).

**CROMATOGRAMA:** Representación gráfica de una propiedad físico química del eluido en función del tiempo o un volumen de elución.

**HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICICLICOS:** Se considera como compuestos orgánicos persistentes, porque pueden permanecer en el medio ambiente durante largos períodos de tiempo sin alterar sus propiedades, contienen dos o más anillos aromáticos de 6 carbonos fusionados, presentan una baja solubilidad en agua y son lipofílicos.

**MATERIAL PARTICULADO 2,5:** Partículas finas cuyo diámetro es menor a  $2,5 \mu$ , es una mezcla que puede incluir sustancias orgánicas, metales, hollín entre otros, estas generalmente provienen de la combustión de vehículos, fábricas, plantas eléctricas etc.

**GENOTOXICIDAD:** Es la capacidad relativa de un agente de ocasionar daño en el material genético el cual puede ser de tipo mutagénico o carcinogénico.

**IN VITRO:** Es un conjunto de fenómenos observados en el laboratorio a partir de productos biológicos vivos.

## CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

Una riqueza medio ambiental indispensable para el ser humano, es el aire, y como sucede con los otros recursos, éste recibe el embate de la contaminación, que puede ser generada por fuentes naturales o por el hombre (Silva, 2010). Sin embargo, estas fuentes no se encuentran equitativamente distribuidas, considerando la más relevante en la actualidad la ocasionada por el hombre, siendo de mayor importancia la industrialización, debido a que lleva consigo factores como: volumen alto y diversificación de la producción industrial, flujo intenso de vehículos automotores, uso de tecnologías obsoletas en la producción, crecimiento urbanístico no planificado, mala calidad de los combustibles, entre otros (Ministerio del Ambiente, 2010), de igual forma los contaminantes que se originan como consecuencia de procesos naturales, van a influir en la calidad del aire.

Estos contaminantes, generalmente son partículas suspendidas, las cuales también originan un riesgo, dependiendo de: su composición química, morfología, parámetros ópticos, facilidad de absorber y adsorber otras sustancias en su superficie, lo que permitirá que las partículas formen parte de los contaminantes que en la actualidad son los que obtienen mayor atención, a consecuencia de que en muchas ciudades se ha demostrado y documentado los efectos nocivos sobre la salud, sobre todo en las zonas urbanas donde la población constantemente se encuentra expuesta a este tipo de contaminantes. En los últimos años en estos lugares, se ha atribuido directamente el incremento del número de hospitalizaciones por enfermedades respiratorias debido a que existe una relación directa entre las emisiones de los vehículos y procesos de combustión (Aldunate, y col, 2006), con el aumento de las concentraciones de material particulado, lo cual influye directamente en el aumento de este tipo de enfermedades (González, 2009).

El material particulado para ingresar y depositarse en el organismo de los seres vivos lo efectúa a través del sistema respiratorio, no obstante su deposición se realiza en diferentes partes del sistema debido a que depende de factores como: tamaño, forma, densidad, y composición química, siendo este último uno de los más importantes, ya que muchos de los compuestos contienen en su estructura Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs), metales pesados, óxidos de azufre, entre otros (Machado, y col, 2007), los cuales son sustancias tóxicas para el ser vivo, debido a que ocasionan un impacto en la actividad genotóxica, mutagénica y/o carcinogénica, además investigadores han identificado que la presencia de esta sustancia en el organismo, origina desestabilización de las cadenas de ADN de manera directa o mediante mecanismos que influyen en la formación de especies reactivas de oxígeno (Brunmark & Cadenas, 1989), (Campos & Palomo, 2009), lo cual ocasiona afecciones en la salud.

De manera que para poder determinar la toxicidad que presentan las partículas del material particulado sobre el ser vivo, es importante identificar las características físicas y químicas que éstas presenten (Gutiérrez, 2014). Algunas investigaciones muestran que el área de superficie puede determinar el potencial de las partículas para provocar efectos biológicos *in vitro* e *in vivo* (Brown, y col, 2001), las partículas más pequeñas por lo general muestran la mayor toxicidad porque poseen una mayor superficie de contacto con las estructuras celulares y de ese modo se pueden liberar una mayor cantidad de moléculas (Gutiérrez, 2014), además se asocia con enfermedades pulmonares, cardiovasculares y cáncer. La actividad genotóxica del material particulado en los pulmones puede ocasionar diversas mutaciones, este es un paso crucial en la carcinogénesis y niveles elevados de lesiones oxidativas del ADN en donde se ha observado muchos tumores, implicando fuertemente tales daños en la etiología del cáncer (Cooke, y col, 2003).

Una amplia gama de estudios realizados *in vitro* en cultivos celulares han demostrado que el material particulado, recolectado, posee una actividad genotóxica y mutagénica (Elassouli, y col, 2007), (Gutiérrez, y col, 2006), (Jun, y col, 2012), ante esta necesidad en los últimos años, se ha desarrollado con éxito nuevos protocolos capaces de evaluar el daño en el ADN, las cuales han permitido establecer técnicas que miden directamente la roturas de cadena simple (SSB) y de doble cadena (DSB) en el ADN (Zuñiga, 2009). En la actualidad pocas técnicas determinan niveles bajos de roturas en el ADN de células individualizadas, siendo una de las más populares el ensayo cometa denominada de esta manera por la morfología que mostraban las células que tenían su ADN dañado (Östling & Johanson, 1984), esta metodología ha tenido un gran impacto en numerosas áreas del conocimiento científico, especialmente en bioquímica, genética y biología molecular (Zuñiga, 2009).

Al material particulado se lo considera como parte de los contaminantes criterio, el cual representa una amenaza a nivel mundial, debido a que producen un impacto negativo en la salud humana (OMS, 2005). En el Ecuador, la gestión de calidad del aire se inició años atrás, con la expedición de normas técnicas ambientales para la prevención y control de la contaminación, la cual tiene como objetivo el poder reducir los riesgos a la salud por inhalación de material particulado, por ello se estableció la Norma de Calidad del Aire Ambiente (NCCA), que está en vigencia desde el 04 de abril de 2011 (Espinoza, 2015), siendo ésta una estrategia para reducir los efectos nocivos (Silva, 2010) y poder cumplir de alguna manera con lo que establece la Organización Mundial de la Salud “que el aire limpio es un requerimiento básico de la salud humana para su bienestar” (OMS, 2005).

Es por eso que el Centro de Estudios Ambientales (CEA) de la Universidad de Cuenca ha determinado mediante diversos estudios realizados por García y Cooman, 2004; Moscoso y Pacheco, 2006, que el aire que respiran los habitantes de las zonas urbanas presentan niveles considerables de contaminación, siendo responsable de esta el material particulado PM, estos

estudios han establecido que sus niveles tiene una tendencia ascendente desde el año 2010, siendo en el año 2014 donde se registró el valor más elevado  $400 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$  el cual excede lo establecido en la normativa ecuatoriana vigente (García y col, 2015).

También la investigación realizada por (Gutiérrez, 2014), determina que existe daño genotóxico en las células expuestas al material particulado PM 10 recolectado en la ciudad de Cuenca, de igual manera en la investigación realizada por (González, 2014) establece que la composición química del material particulado influye en el potencial de la respuesta inflamatoria.

Por lo antes expuesto se ha visto necesario continuar con la investigación es por ello, que gracias al Convenio Específico de Cooperación y al interés común que existe en el Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca y la Universidad Técnica Particular de Loja, donde se desarrolló la investigación de la genotoxicidad del material particulado PM 2,5.

El presente trabajo es experimental e inductivo, se aplicó el método científico, descriptivo y analítico; se consideró como variable independiente los puntos de muestreo y como variables dependientes el % de viabilidad celular y el largo, momento e intensidad del cometa.

Para esta investigación se planteó el siguiente objetivo general:

- Determinar la concentración del Benzo(a)pireno, Benzo(b)fluoranteno, Benzo(a)antraceno y el fluoranteno del material particulado PM 2,5 suspendido en el aire ambiente de tres diferentes zonas de la ciudad de Cuenca-Ecuador, y evaluar su actividad genotóxica en las células CHO-K1

La Hipótesis general planteada fue la siguiente:

- La exposición a (Benzo(a)pireno, Benzo(b)fluoranteno, Benzo(a)antraceno, fluoranteno del material particulado 2,5 causaría genotoxicidad en la población urbana de la ciudad de Cuenca dependiendo de la zona estudiada.

Los objetivos específicos fueron:

- Determinar la concentración de los compuestos orgánicos: Benzo(a)pireno, Benzo(b)fluoranteno, Benzo(a)antraceno, fluoranteno del material particulado PM 2,5 suspendido en el aire ambiente de tres diferentes zonas de la ciudad de Cuenca-Ecuador.



- Identificar mediante prueba “in vitro” en la línea celular CHO-K1, la actividad genotóxica del Benzo(a)pireno, Benzo(b)fluoranteno, Benzo(a)antraceno, fluoranteno del material particulado PM 2,5 recolectado en tres diferentes zonas de la ciudad de Cuenca.

## CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ATMÓSFERA

La atmósfera una capa delgada que envuelve a la tierra, es el lugar en donde se realiza parte del ciclo hidrológico, debido a que se comporta como un gran reservorio de vapor de agua. Ésta se encuentra compuesta por una mezcla de gases (aire) y por elementos como el O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, y vapor de agua los cuales son necesarios para procesos como fotosíntesis.

Por consiguiente, la atmósfera es una mezcla de gases denominada aire, la cual se encuentra compuesta por:

- Mayoritarios: Entre ellos se encuentra, 78 % N<sub>2</sub>; 20,9 % O<sub>2</sub>; 0,93 % Ar y CO<sub>2</sub> con una porción del 0,03 %.
- Minoritarios: presentes en la composición de la atmósfera en un 0,14 %, al ser cantidades pequeñas se expresan en partes por millón, está conformado principalmente por: He, CO, O<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>.
- Variables: Su estructura no es precisa, se ha considerado dentro de este grupo al vapor de agua y los contaminantes atmosféricos

Ésta capa se caracteriza porque regula la radiación y la temperatura procedente del sol actuando como filtro y facilitando a que exista una temperatura compatible para los seres vivos (Medioambientales, 2018). Y a pesar de que esta capa constituye apenas el 1 % del radio de la tierra, es de gran importancia debido a que es fuente de oxígeno para los seres vivos, es decir, es la base para la vida terrestre.

Otro particular relevante que presenta, es que es de carácter dinámico, lo que facilita la realización de numerosos procesos físicos y químicos, y cuando existe interacción entre los seres vivos y el ecosistema presenta repercusiones, los cuales pueden ser los fenómenos atmosféricos que pueden ocurrir a distintas escalas temporales y espaciales: desde la escala molecular, hasta los procesos de transporte a escala global, pasando por la microescala, donde los procesos de difusión turbulenta toman cuerpo, la mesoescala, que es el rango habitual de la problemática en las grandes zonas urbanas e industriales, y la escala continental con los problemas de transporte transfronterizo de contaminantes (Molina, 2013).



Por el dinamismo, los contaminantes son dispersados por la atmósfera en todo el planeta causando efectos globales como, agujero en la capa de ozono y efecto invernadero incrementado. En cambio, en casos puntuales, como ciudades grandes la presencia de diferentes tipos de compuestos en ésta capa va a presentar efectos tóxicos sobre los seres vivos.

Por ello, es importante realizar un análisis de la contaminación atmosférica, siendo la capa de mayor interés la más próxima a la superficie terrestre, denominada tropósfera, que es en donde se concentra el 90 % del peso de la atmósfera, el cual actúa como elemento receptor de los contaminantes y es donde se producirán las transformaciones químicas de los contaminantes y los fenómenos de transporte (Molina, 2013).

## 2.2 CONTAMINACIÓN DEL AIRE

Se define como “la emisión al aire de sustancias peligrosas a una tasa que excede la capacidad de los procesos naturales de la atmósfera para transformarlos, precipitarlos, depositarlos o diluirlos por medio del viento y el movimiento del aire” (Yassi, 2002).

De modo que, uno de los problemas ambientales más severos a nivel mundial es la contaminación del aire. En la actualidad el crecimiento económico y la urbanización, asociados al desarrollo de diversas actividades como la industria petrolera, agroindustria y el incremento del tráfico vehicular, traen como resultado un consumo intenso de combustibles fósiles (Romero & col, 2006), facilitando de esta manera la exposición de la población humana a agentes potencialmente genotóxicos (Mendoza y col, 2013). Es por ello que en diferentes partes del mundo se ha visto la necesidad de realizar distintos tipos de evaluaciones para determinar y cuantificar los posibles elementos que pueden ser considerados como factores de riesgo para los seres vivos.

Debido a su complejidad y a la diversidad de fuentes que generan su formación, se puede determinar que la contaminación puede ser clasificada según su origen: en primario y secundario. Origen primario se caracteriza porque la emisión es directa a atmósfera por actividades naturales y antropogénicas, éste último, hace referencia a la contaminación producida por actividades humanas (Yassi, y col, 2002), (Gutiérrez, y col, 1997), como por ejemplo actividades agrícolas, tecnológicas, procesos industriales los cuales no han realizado una combustión completa, consumo industrial y doméstico de combustibles fósiles, vehículos de motor, etc., (Romero, y col, 2006), éstos son capaces de fusionar para generar nuevas partículas o interaccionar sobre las ya existentes.

En cambio la contaminación de origen secundario, es aquella que se forma durante el proceso de conversión gas-partícula en la atmósfera, es decir, es obtenida como producto de la reacción oxidativa de compuestos orgánicos como cicloalquenos, hidrocarburos aromáticos y terpenos,

que son destacados precursores que se oxidan generando productos constituyentes de uno de los principales causantes de la contaminación del aire que es el material particulado, de manera especial los hidrocarburos aromáticos como el benceno, tolueno, xileno, se estima que contribuyen a la formación del material particulado entre 1,4 - 8,6 Tg año<sup>-1</sup> (Borrás, 2013), por lo tanto se puede concluir que en cualquiera de las fuentes de origen éstas se presentan por procesos relacionados con la emisión (Martínez, 2005).

Debido a la diversidad de los contaminantes, que se originan de distintas fuentes, no es fácil realizar una clasificación idónea que abarque a todos los contaminantes que se encuentran presentes en el aire, por ello a continuación se detalla los componentes que son de mayor interés debido al impacto que ocasionan en la salud de seres vivos (Meléndez y col, 2012) los cuales son:

- Compuestos orgánicos, especialmente hidrocarburos aromáticos policíclicos
- Monóxido de Carbono (CO)
- Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>)
- Sulfatos (SO<sub>4</sub>)<sup>=</sup>
- Nitratos (NO<sub>3</sub>)<sup>-</sup>
- Metales Pesados como Cd, Fe, Pb, Ni

## 2.3 MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO

Una amplia variedad de componentes sólidos y líquidos abarca el material particulado, productos de procedencia diversa como procesos naturales, reacción de trazas de gases y numerosos elementos biológicos, a todo esto hay que sumar las introducidas por el hombre incluyendo polvo, cenizas, metales pesados, diésel, gasolina parcial y totalmente quemada y un sinnúmero de productos químicos que se producen como resultado de actividades como combustión, incineración, transporte, construcción, industria, entre otros, sin embargo la mayoría de autores coinciden que la combustión de los vehículos es la principal causa de la contaminación atmosférica, ya que su contribución se ubica entre un 25 % y un 75 % del total de las emisiones antropogénicas (Quality of Urban Air Review Group, 1993), siendo un factor importante el tráfico de vehículos, debido a que su volumen aumenta cada año (EEA-European Environment Agency, 2004).

En efecto, al material se lo define como un material sólido o líquido en forma de partículas con excepción del agua no combinada, presente en la atmósfera, definición establecida en el Anexo 4 del Libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente (TULSMA) Nivel de Inmisión.

También la EPA, determina que el PM es una mezcla compleja de partículas de pequeño tamaño y líquidas, las que como parte de su composición presentan, ácidos, productos químicos orgánicos, metales y polvo.

(Adonis & Gil), establece al material particulado como un término genérico para una amplia gama de sustancias químicas y físicas que existen como partículas sólidas o líquidas suspendidas en la atmósfera y que tienen un amplio rango de tamaño, siendo este factor el que tienen influencia directa sobre las afecciones a la salud, debido a que, de acuerdo al tamaño que presente la partícula permite una absorción de cientos de compuestos químicos, los cuales al encontrarse en el medio ambiente y al ser inhalado por los seres vivos, ingresan al tracto respiratorio, pudiendo alcanzar depositarse en los alveolos pulmonares (Caballero & Alvarado, 2006).

En cuanto a la exposición al material particulado, éste se ha asociado con efectos adversos sobre la salud humana, especialmente enfermedades respiratorias con muertes prematuras (Pope & Dockery, 2006), por consiguiente, este factor es el de mayor preocupación, debido a que las personas pasan cerca del 20 % del tiempo al aire libre (Mannino & Orecchio, 2008).

La toxicidad de una partícula depende del tamaño, de la cantidad inhalada, del tejido en el cual se depositan, de la solubilidad en los fluidos corporales, y lo más importante de su composición química (Caballero & Alvarado, 2006). Una vez inhaladas, éstas alteran los mecanismos de defensa propios del sistema respiratorio, afectando a las vías aéreas superiores y a las vías aéreas más pequeñas y alvéolos (Ubilla & Yohannssen, 2017).

El material particulado atmosférico tiene un gran impacto en el clima, en la biosfera y en la química atmosférica debido a que se produce una reacción de oxidación de compuestos precursores y consecuentemente esto afecta la salud humana. Es un sistema complejo debido a la gran cantidad de especies y a su continua evolución (Borrás, 2013).

Las partículas atmosféricas presentan diferentes diámetros, por ello se ha clasificado en PST Partículas en Suspensión Totales, PM 10, PM 2,5 y PM 1, las cuales se expresan en unidades de concentración de masa, volumen, superficie o número de partículas por unidad de volumen aire, por lo que, para la medición y análisis de las partículas, se utiliza las unidades microgramos por metro cúbico ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) (Minguillón, 2007).

## 2.4 COMPOSICIÓN ELEMENTAL DEL MATERIAL PARTICULADO

El conocimiento de la composición química de las partículas que se encuentran en el aire es importante desde el punto de vista epidemiológico y técnico, ya que permite determinar el potencial efecto en la salud humana por la presencia de sustancias tóxicas y cancerígenas que se encuentran adheridas a este material (Astudillo, 2014).

La composición mayoritaria del material particulado corresponde a la fracción inorgánica con especies como sulfato y nitrato amónico. Sin embargo, la fracción orgánica incluye miles de

compuestos desde moléculas de pequeño tamaño a sustancias poliméricas de gran masa molecular, ya sea en estado sólido o líquido (Borrás, 2013). Se ha considerado a la fracción orgánica como un factor importante, ya que puede representar más de la mitad de la masa total de las partículas, esto se evidenció, según lo registrado en zonas continentales de latitudes medias (Kanakidou, y col, 2005).

De hecho, los vehículos a diésel emiten alrededor de 45 a 80 veces la masa de partículas que emite un vehículo a gasolina. Del mismo modo la concentración en número de partículas de un vehículo a diésel es entre 3 y varios miles de veces el número de partículas que el emitido por un vehículo a gasolina, sin embargo es necesario enfatizar que en ambos casos se han considerado que los factores como la potencia y condiciones de operación en los vehículos sean los mismos (Rojas, 2004), sin embargo existen ciertas dudas acerca de esta teoría, debido a que los aportes producidos por motores de gasolina antiguos en conjunto con las emisiones producidas en el arranque en frío pueden llegar a superar las emisiones producidas por los vehículos a diésel (Watson, y col, 2002), así también (Marchand, y col, 2004) y (Marr, y col, 2006) determinaron que los motores a gasolina producen la mayor parte de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) de alto peso molecular como son el benzo(a)pireno y dibenzo(a,h)antraceno, mientras que los motores a diésel producen HAPs de bajo peso molecular.

Otro factor importante a considerar son los componentes de los combustibles, los cuales poseen en su estructura azufre e hidrocarburos aromáticos policíclicos los cuales son los responsables directos de la producción de partículas finas (Westerholm & Li, 1994). Es así que en menos de dos décadas los vehículos de combustión interna se han convertido en los principales emisores de contaminación por lo que hoy es un problema crítico de las emisiones globales terrestres, pues no es sólo fruto de su funcionamiento, sino también de su proliferación, calidad de combustibles utilizados, tipo y antigüedad de los vehículos, entre otros (Aldunate, y col, 2006), por ello (Minguillón, 2007) establece que los compuestos carbonosos representan aproximadamente el 2 al 5 % de las emisiones globales terrestres.

También al material particulado se lo ha caracterizado porque está compuesto de partículas sólidas y líquidas suspendidas, las cuales presentan diferentes tamaños y formas, y según su diámetro aerodinámico se les clasifica en finas y gruesas (Sbarato, 1999). Por ello el comportamiento que presentan en la atmósfera está determinado por su tamaño, siendo las menores (finas) afectadas por movimiento de tipo browniano y las mayores (gruesas) afectadas por fuerzas gravitacionales e inerciales (Lazar, y col, 1999), los tiempos de residencia en la atmósfera, también dependen de esta característica. Partículas menores a 2,5  $\mu\text{m}$  pueden tener

tiempos de residencia de días o incluso de semanas y podrían ser transportadas miles de kilómetros (Vana, y col, 1999), (Negral, 2010).

Así pues, autores como (Sun, y col, 2005), (Gutiérrez, y col, 2006), (Yeatts, y col, 2007), (Middleton, y col, 2008), (Rosales-Castillo, y col, 2001) han encontrado correlación significativa entre la exposición al material particulado y los diversos efectos sobre la salud, ya sea por enfermedades respiratorias y cardiovasculares, siendo éstas las principales causas de los incrementos en la mortalidad (Schwartz, 1994), (Dockery & Pope, 1996), debido a que los mismos contienen la presencia de aditivos tanto en combustibles líquidos como gasolina, petróleo y en los diferentes tipos de aceite que usan los motores de combustión interna (CORPAIRE, 2006).

## 2.5 FUENTES DE MATERIAL PARTICULADO

Las partículas se origina de dos fuentes, la primera corresponde a las fuentes naturales éstas son propias de la naturaleza como emisiones fugitivas de los suelos, emisiones volcánica, entre otros, y la segunda corresponde a las fuentes antrópicas que son aquellas que se encuentran en la atmósfera por procesos morfológicos, químicos y físicos, encontrándose en mayor cantidad en las zonas urbanas e industriales (Minguillón, 2007), asociadas a procesos de combustión por tráfico vehicular, procesos fotoquímicos, partículas de tierra resuspendidas, entre otros, (Gillies, y col, 1999).

Por ello al hablar de contaminación por partículas se utiliza con frecuencia algunos términos, que se definen a continuación:

- **Polvo:** Aerosol sólido compuesto de partículas inferiores a  $200 \cdot 10^{-3}$  mm, que después de mantenerse en suspensión en el aire durante un cierto tiempo, acaba depositándose. En razón del tamaño de las partículas que lo compone se habla de polvo finísimo, fino y polvo grueso (Sánchez & Guiza, 1989).

En la contaminación atmosférica el polvo es un factor muy importante, especialmente el proveniente de las actividades humanas al emplear hornos industriales, estufas o calefacciones, sin embargo, es necesario aclarar que el polvo proveniente por las actividades humanas representa solamente una décima parte con respecto a los producidos de modo natural (erupciones volcánicas, tempestades de arena, humos de incendios de maleza y de bosques que inician los rayos (Sánchez & Guiza, 1989).

- **Aerosol:** Mezcla de partículas de diámetro inferior a  $10^{-3}$  mm que se encuentran en suspensión en el aire, son sustancias dispersas cuya fase exterior está formada por aire

u otro gas, y la interior consiste en pequeñas partículas suspendidas en forma sólida o líquida (Sánchez & Guiza, 1989).

Los vientos son capaces de formar aerosoles o polvo, rico en bioelementos minerales, es un factor importante para el control de la contaminación por metales pesados, partículas, aerosoles y óxidos de nitrógeno, en particular los emitidos por los medios de transporte, las centrales eléctricas y otras instalaciones industriales (Sánchez & Guiza, 1989).

- **Smog:** Se usa para designar la contaminación atmosférica que está generalmente asociada con oxidantes (EPA, 2017). Se lo define como una mezcla de dióxido de azufre, con gotitas de ácido sulfúrico (la cual es originada por la quema de grandes cantidades de carbón y petróleo pesado con azufre), formando una espesa niebla, afectando a la salud y al medio ambiente (Fenger, 1999).
- **Niebla:** es una nube que está en contacto con el suelo, la niebla es una forma visible del vapor de agua en la que no alcanza a presentarse precipitación; está conformada por gotas de agua con diámetros demasiado finos (menores a 0,1 mm) que se forman por la condensación del vapor de agua y son tan pequeñas que se mantienen suspendidas en el aire (Soriano, 2015).
- **Humo:** Partículas suspendidas en el aire luego de una combustión incompleta (EPA, 2017).
- **Humo Industrial:** Es la suspensión de partículas sólidas o líquidas debidas a la condensación de vapores, producidas por procesos industriales (Astudillo, 2014).
- **Bruma:** Producida por condensación, son gotas visibles que se encuentran en un rango entre 2 y 60  $\mu$  (Construmática, 2017).
- **Vapor:** El gas emitido por sustancias las cuales son sólidas o líquidas a temperatura y presiones atmosféricas regulares (EPA, 2017).

## 2.6 MATERIAL PARTICULADO PM 2,5

El Anexo 4 del Libro VI del TULSMA Nivel de Inmisión, define al material particulado PM 2,5 como aquel que posee un diámetro aerodinámico menor o igual a 2,5 micrones el cual se puede representar de manera abreviada con las iniciales PM 2,5.

De igual forma la (Comisión Nacional del Medio Ambiente República de Chile, 2009) precisa que el PM 2,5, es producido por emisiones directas de la quema de combustibles fósiles, siendo la principal fuente del PM 2,5 la combustión producida por automóviles, buses, camiones, tanto a diésel como a gasolina, plantas termoeléctricas, calderas, procesos industriales, hornos, fundiciones, procesos metalúrgicos, combustión de biomasa, el cual tiene precursores como: dióxido de azufre, óxidos de nitrógeno, compuestos orgánicos volátiles, amoníaco, y otros compuestos, y también a través de procesos de nucleación y coagulación de partículas ultra finas, así también otras fuentes de emisión para el PM 2,5 son la calefacción residencial a leña, quemas agrícolas y forestales, y emisiones de amonio de las operaciones agrícolas.

El PM 2,5 también posee como característica especial el tiempo de residencia en la atmósfera, el cual es mucho más largo, comparado con el PM 10 fracción gruesa, lo que permite a las partículas de PM 2,5 mayor movilidad y mayor facilidad de ser transportadas por los vientos a través de largas distancias, por ello, algunos autores detallan que pueden generar impactos a escala regional (Chen & Lippmann, 2009).

Debido a que el ser humano está expuesto todo el tiempo a estos contaminantes, se han realizado estudios epidemiológicos para afirmar que existe una correlación significativa entre la exposición al material particulado atmosférico y diversos efectos adversos sobre la salud, ocasionada por concentraciones cada vez más bajas. De igual forma (World Health Organization, 2005), realizó un estudio experimental, en donde determinó la función de los contaminantes del aire específicamente de las partículas de escape de diésel y se identificó un incremento considerable de los niveles de inmunoglobulina IgE, además se estableció que durante el proceso de exposición se activa directamente a los mastocitos y basófilos a través de mediadores inflamatorios independientes de la inmunoglobulina.

Por eso al material particulado PM 2,5 se caracteriza por la capacidad de penetración en el organismo y su reactividad química, la cual es ocasionada por las elevadas áreas superficiales (Monarca y col, 1997), por ello se puede asociar que al estar expuestos a PM 2,5; los seres vivos pueden desarrollar cáncer de pulmón.

## **2.7 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS**

De la combustión desarrollada en condiciones ideales se obtiene  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{O}_2$  y  $\text{N}_2$ , aunque ésta no se da de manera ordinaria, debido a que el  $\text{O}_2$  atmosférico no se encuentra en la cantidad necesaria, se origina entonces la combustión incompleta de material orgánico (ATSDR, 1995) el cual al ser sometido a elevadas temperaturas producen fragmentos orgánicos (Díaz, y col, 2013) los cuales reaccionarán con otros cercanos favoreciendo de esta manera a la formación de una gran variedad de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs). El número de HAPs producidos



dependerán de las condiciones y de las características de la materia orgánica combustionada (García, 2005).

Los (HAPs), constituyen una familia de compuestos ampliamente distribuida en el medio ambiente (Albers, 1995), existen más de 100 clases diferentes, generalmente se presentan como mezclas complejas no como compuestos simples (ATSDR, 1995). Se las define como moléculas que contienen dos o más anillos aromáticos fusionados (Kuljukka, 1996). Son un grupo de compuestos formados por Carbono (C) e Hidrógeno (H<sub>2</sub>), cuya estructura base es un ciclo aromático tipo bencénico, esta característica les proporciona propiedades que facilitan su transporte en el ambiente y su absorción en organismos vivos (Martínez, 2011). La condensación de estos anillos ya sea por aristas (ej. Antraceno, Fenantreno, Criseno) o por puentes de átomos de carbono (Fluoreno, B(b)fluoranteno), les confiere el carácter de policíclicos (Morgan & Boyd, 1998). La mayoría contienen solamente carbono e hidrógeno y son siempre estructuras polinucleares de tipo aromático (también se los conoce por Hidrocarburos Polinucleares). Los HAPs son sustancias lipofílicas, factor que se incrementa con el aumento de su masa molecular, además son inestables fotoquímicamente, por lo que se degradan con la luz (proceso de fotooxidación) (Vives y col, 2001). En la atmósfera los HAPs suelen presentarse en dos formas: la primera corresponde a la fase gaseosa cuando poseen de 1 a 3 anillos, como por ejemplo, el naftaleno, de igual manera los que poseen cuatro anillos de benceno, como por ejemplo el benzo(a)pireno, todos estos pueden ser adsorbidos, y la segunda forma es cuando está asociado a partículas.

### 2.7.1 Toxicidad de los hidrocarburos aromáticos policíclicos

Existen centenares de compuestos del tipo HAPs que se encuentran distribuidos en la atmósfera, que tienen como principal característica su actividad carcinogénica, mutagénica o inmunosupresora (Koss & Tesseraux, 1999). Entre los más peligrosos, destacan los derivados de antraceno, molécula que es llamativa, debido a que ella misma no es carcinogénica, sin embargo, si a su estructura básica se le añade algún anillo bencénico, y algunos sustituyentes como por ejemplo los grupos metilo, está molécula se transforma en un compuesto carcinogénico (Vives, y col, 2001).

Para entender el grado de la exposición humana a los (HAPs) se han analizado y aplicado métodos analíticos propuestos por la (US EPA, 1999), lo cual indica que las partículas ligadas a los (HAPs) son consideradas sustancias significativamente peligrosas a la salud humana ya que son componentes altamente carcinogénicos y/o mutagénicos.

En 1976 la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA, 1999), incluye un grupo de 16 (HAPs) en la lista de compuestos orgánicos que debe ser monitoreados y limitados, además los incorpora en la categoría de contaminantes prioritarios (Sbarato, 1999). La



clasificación establecida para los HAPs que se ha aplicado para la presente investigación son los más relevantes según la (IARC, 1983):

- Benzo(a)antraceno-B(a)a
- Criseno
- Benzo(a)pireno-B(a)p
- Benzo(b)fluoranteno-B(b)f
- Benzo(j)fluoranteno-B(j)f
- Benzo(k)fluoranteno-B(k)F
- Dibenzo(a,h) antraceno
- Indeno (1,2,3-c,d) pireno

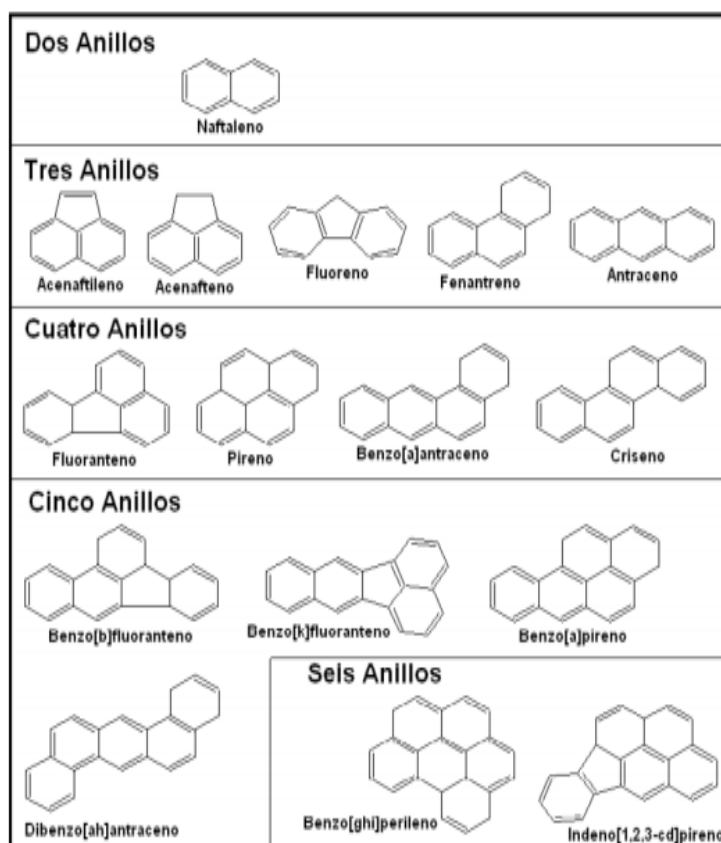


Figura 1. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos agrupados según el número de anillos aromáticos

Fuente: (Ibedaca, 2014)

Por consiguiente, para dar cumplimiento con los objetivos de esta investigación que establece la posible presencia de estas sustancias en el medio ambiente, a continuación, se resume la toxicidad de los (HAPs) más comunes y peligrosos debido a los efectos carcinogénicos, mutagénicos y genotóxicos que repercuten en el ser humano.

### 2.7.1.1 Benzo(a)pireno

El benzo(a)pireno es un compuesto formado por cinco anillos de benceno fundidos cuya fórmula química es  $C_{20}H_{12}$ , presenta un punto de fusión de 179 °C y de ebullición de 495 °C, es altamente volátil y soluble con los compuestos orgánicos lipofílicos. Se forma por la combustión incompleta a temperaturas entre 300 y 600 °C de la materia orgánica (incendios forestales, carbón, petróleo), emisión de gases vehiculares, humo de cigarrillo y como derivado de varios procesos en la industria alimentaria. Es soluble en solventes apolares como benceno, tolueno, xileno, ciclohexano, acetona, éter, dimetil sulfóxido, dimetilformamida. Es poco soluble en etanol, metanol y es casi insoluble en agua. El benzo(a)pireno es un solvente orgánico que puede opacarse y oxidarse progresivamente bajo la presencia de la luz y el oxígeno ambiental (De la Cruz & Huaman, 2002).

Este compuesto produce en el ser humano inflamación e irritación pulmonar, debido a que tiene la capacidad de desarrollar efectos carcinogénicos, genotóxicos y mutagénicos según la clasificación establecida por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) por lo que se le ha clasificado como categoría 1 que agrupa a las sustancias que poseen probada acción cancerígena en animales (TOXNET, 2002), mismo que se encuentra en las plantas productoras de este tipo de compuestos, esto sumando el tiempo de permanencia en el medio ambiente (vida media en el suelo de 162 días), sirve como base para posteriores investigaciones (Stellman & McCan, 1998).

La Agencia de Protección Ambiental y el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos lo catalogan dentro de las 10 sustancias más importantes con riesgo para la salud pública (TOXNET, 2002), además estudios bioquímicos han demostrado que el benzo(a)pireno, puede ser absorbido por la vía digestiva y pulmonar; sin embargo es metabolizado principalmente por el hígado por las enzimas Citocromo P450 Microsomal NADPH – dependiente, formando una gama de varios óxidos de arenos los que sufren luego de procesos de hidrogenación, hidratación, epoxidación y otros más formando numerosos compuestos. Se cree que el principal metabolito reactivo del benzo(a)pireno es el Benzo(a)pireno-7,8-dihidrodiol-9,10 epóxido responsable de su acción cancerígena y mutagénica, la formación de diol-epóxidos de su acción cancerígena y mutagénica. La formación de diol-epóxidos del benzo(a)pireno también puede ser realizado por enzimas sintetizadoras de prostaglandinas, presentes en muchos tejidos del organismo (TOXNET, 2002).

El benzo (a) pireno diol epóxido se intercala con en el ADN, produciendo una mutación en el gen p53, por lo que se le atribuye la intervencion en la aparición de diversos tipos de tumores (TOXNET, 2002), además por su capacidad de unirse por enlace covalente a la base nitrogenada púrica Guanina en la posición (N2), ocasiona una alteración en la estructura del ADN (Volk, y col,

2003). Esto origina errores en la replicación de la estructura helicoidal, induciendo a la formación de mutaciones, explicando entonces el desarrollo de cáncer en organismos expuestos. El b(a)pDE induce transversiones Guanina a Timina en los sitios calientes en p53 disminuyendo su habilidad supresora tumoral y por lo tanto aumenta el riesgo de generar cáncer (Volk, y col, 2003).

### 2.7.1.2 Benzo(a)Antraceno

El Benzo(a)antraceno es producto de una combustión incompleta, se encuentra en el negro de humo, aceites lubricantes, hollines procedentes de diferentes combustiones (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo). Se presenta como escamas, su punto de fusión es de 160 °C y su punto de ebullición es de 437,6 °C (a una presión de 760 mm/Hg). Este compuesto es soluble en etanol, tolueno, acetona, benceno y éter etílico, es muy poco soluble en agua y etanol caliente. Está catalogado por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC), ente de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en la categoría 2 A probable carcinógeno humano, por lo que presenta una débil carcinogenicidad (Caballero & Alvarado, 2006), sin embargo, su potencia tóxica es mucho menor a la del benzo(a)pireno, Este HAPs se encuentra en mayor porcentaje que los demás. La exposición crónica a este compuesto condiciona la formación de tumores a nivel pulmonar, dérmico y renal almacenándose principalmente en el tejido lipídico (De la Cruz & Huaman, 2002).

### 2.7.1.3 Benzo(b)fluoranteno

El Benzo(b)fluoranteno es insoluble en agua, al igual que los otros HAPs se producen como resultado de la combustión incompleta, está presente en el carbón, gasolina, gas, humo de cigarrillo, aceites vegetales. Se puede estar en contacto con la sustancia cuando se ingiere alimentos preparados a la parrilla y productos ahumados especialmente en carne y pescado. La IARC determinó que el benzo(b)fluoranteno es 2 B, posiblemente cancerígeno para los seres humanos, en experimentos realizados en animales de laboratorio se observó que la exposición directa a esta sustancia produce tumores en la piel, pulmón e hígado, por lo que se determinó que esta sustancia es un carcinógeno humano (TOXNET, 2002).

### 2.7.1.4 Fenantreno

El fenantreno es uno de los hidrocarburos más frecuentes en el ambiente, es un HAPs pequeño ya que está formado por tres anillos (Irwin, y col, 1998), sin embargo, es considerado como uno de los principales contaminantes atmosféricos (Oteropaternina, y col, 2013).



Se encuentra en el ambiente, debido a que generalmente es producido por actividades realizadas por el hombre como es el uso del transporte, humo de tabacos entre otros (Villalba, 2016), y también por la ingesta de alimentos cultivados en suelos contaminados con hidrocarburos.

### 2.7.1.5 Compuestos Orgánicos Volátiles (COV's)

Son compuestos orgánicos constituidos fundamentalmente por carbono, que se convierten fácilmente en vapor o gas, agrupa una gran cantidad de compuestos químicos, entre los que se incluyen los hidrocarburos alifáticos y aromáticos y otros compuestos como aldehídos, cetonas, ácidos y alcoholes. Los heteroátomos más habituales que forman parte de los COV's suelen ser el O<sub>2</sub>, F<sub>2</sub>, Cl<sub>2</sub>, Br, S o N<sub>2</sub>.

Los COV's se liberan en la ignición de combustibles fósiles derivados del petróleo. Además, se difunden al medio por disolventes, pinturas pegamentos y otros productos empleados y almacenados en los hogares y centros de trabajo.

Muchos compuestos orgánicos volátiles son peligrosos contaminantes del aire. Cuando se mezclan con óxido de nitrógeno, reaccionan para formar ozono, en el nivel del suelo o smog (Sanchez & Alcantara).

## 2.8 ESTANDARES DE LA CALIDAD DEL AIRE PARA MATERIAL PARTICULADO PM 2,5

La Norma Ecuatoriana de Calidad del Aire Ambiente (NECAA), tiene como objetivo proteger la salud de los seres vivos y proteger el medio ambiente, y para dar cumplimiento con lo establecido esta norma establece los límites máximos permisibles de los contaminantes en el aire ambiente (CUENCAIRE, 2009).

Según NECAA del anexo 4 del libro VI del TULSMA, rige a partir del 31 de marzo de 2003 por Decreto No. 3516 publicado en la Ed. Esp. No. 2 del R.O. (CUENCAIRE, 2009), en el cual establece que:

Numeral 2.17 Material Particulado. - Está constituido por material sólido o líquido en forma de partículas, con excepción del agua no combinada, presente en la atmósfera. Se designa como PM 2,5 al material particulado cuyo diámetro aerodinámico es menor a 2,5 micrones.

Numeral 4.1.2 Normas generales para concentraciones de contaminantes criterio en el aire ambiente.

Material Particulado menor a 2,5 micrones (PM 2,5). - cuyo valor medio matemáticamente calculado de la concentración de PM 2,5 y para todas las muestras en un año no excederá a 15 µg/m<sup>3</sup>.

El promedio de monitoreo continuo durante 24 horas, no deberá exceder  $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ .

Sin embargo, el A. M. N° 50, emite un pronunciamiento favorable al proyecto en el cual se reforma la Norma de Calidad del Aire Ambiente o Nivel de Inmisión, presente en el Anexo 4 del libro Sexto del TULSMA, y que forma parte del conjunto de normas técnicas ambientales para la prevención y control de la contaminación, la cual se encuentra en vigencia desde el 04 de abril de 2011 estableciendo lo siguiente:

**Material particulado menor a 2,5 micrones (PM 2,5).** - Se propone que el valor medio aritmético de la concentración de PM 2,5 de todas las muestras en un año no excederá a  $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . La concentración máxima en 24 h, de todas las muestras colectadas, no excederá a  $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , valor que no podrá ser excedido más de 2 veces en un año

Estudios realizados por (Sun, y col, 2005), (Gutiérrez, y col, 2006), (Yeatts, y col, 2007), (Middleton, y col, 2008), (Rosales-Castillo, y col, 2001) aconsejan que se estudie con mayor detalle el límite mínimo de exposición en el cual no ocasione daños a la salud, puesto que se ha identificado que al estar en contacto con el PM en un pequeño lapso de tiempo en diferentes ocasiones producen alteraciones en la salud.

Debido a esto la Environmental Protection Agency (EPA) ha establecido como límite de concentración para PM 2,5 un promedio anual de  $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , y para una media de 24 h,  $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Con el propósito de disminuir daños a la salud, tales como afección a las vías respiratorias, problemas cardiovasculares, causas de muerte prematura, ocasionados por la exposición al PM (Introducción al monitoreo atmosférico, 2017).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), establece que las normas deben encaminarse a fijar la concentración del PM en sus niveles bajos, considerando características propias en materia de salud pública de cada país, que permitan una evaluación cuantitativa de riesgo, por lo que los valores que ha establecido la OMS para el material particulado PM 2,5 es de  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  media anual, y  $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$  media de 24 horas.

En la tabla 1 se puede apreciar los valores establecidos en diferentes normativas de acuerdo a las diferentes condiciones de muestreo.

Tabla 1. Normativa vigente para el material particulado PM 2,5

CONTAMINANTE	NORMATIVA VIGENTE	CONCENTRACIÓN PROMEDIO ANUAL	CONCENTRACIÓN EN 24 HORAS
<b>Material Particulado PM 2,5</b>	Norma de Calidad del Aire ambiente (NCCA)	15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
	Enviromental Protection Agency (EPA)	15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
	Organización Mundial de la Salud (OMS)	10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$

Fuente: Autora

## 2.9 IMPACTO DE LA CONTAMINACIÓN POR PARTÍCULAS ATMOSFÉRICAS EN LA SALUD HUMANA Y PÚBLICA

La preocupación sobre los efectos que la contaminación del aire tiene sobre la salud no es un tema nuevo; por el contrario, se ha debatido durante varias décadas (Gaviria, y col, 2011).

La contaminación del aire por material particulado es un problema mundial y, en los últimos años se ha convertido en un tema importante de investigación porque afecta a procesos climáticos (Pio, y col, 2007) siendo uno de los más comunes la disminución de la visibilidad, pero también interviene en los seres vivos, debido a que presenta un impacto negativo significativo en la salud (Harri, y col, 2005), (Billet, y col, 2007), (Oliveira, y col, 2007), tales como, asma, aumento de enfermedades respiratorias, cardiovasculares y cáncer (Brunekreef & Holgate, 2002), (Pope III, y col, 2002), (Nemmar & Inuwa, 2008), (Walker & Mouton, 2008) así lo evidencia varios estudios epidemiológicos (Valavanidis, y col, 2006).

También se ha comprobado que el material particulado aerotransportado, contiene un gran número de sustancias genotóxicas, así demuestran estudios que proporcionan evidencia del potencial mutagénico – genotóxico especialmente cuando las emisiones son producidas por el uso de la gasolina y/o diésel cuyas emisiones liberan mutacarcinogénicos con efectos en animales de laboratorio y posiblemente en humanos (Zhaoa y col, 2004), (Klumpp, y col, 2002), (Volker, 2005).

Además, es necesario mencionar que existen diferentes factores que influyen en la distribución del material particulado y por consiguiente en la afección a la salud de la población como son: diferencias geológicas, climatológicas, atmosféricas y las fuentes de contaminación que existen aún dentro de un mismo país (Rodríguez, 2003).

Se puede decir que existe una evidencia epidemiológica muy consistente entre la exposición a material particulado con efectos agudos y crónicos, siendo el tamaño y la cantidad de partículas muy relevantes cuando se está hablando de daño a la salud, especialmente a nivel respiratorio de los niños, ya que tienen una mayor tasa metabólica, lo que significa que respiran una mayor cantidad de aire en relación a su peso corporal, haciéndoles más susceptibles a los efectos anteriormente mencionados (Cáceres, 2015).

El impacto del material particulado en la salud, se debe a que las partículas finas tienen la capacidad de inducir estrés oxidativo en las células a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (Senlin, y col, 2008), (Li, y col, 2003), así como también podría inducir mutación en los seres vivos (Kanawaka, y col, 2008).

Investigaciones realizadas por (Wante, y col, 1996), (Csavina, y col, 2012), (Ellis, y col, 2012) reportan el impacto agudo del material particulado sobre el sistema pulmonar de los seres vivos, como:

- Efecto reversible sobre la función respiratoria, e incremento en la reactividad bronquial.
- Muerte prematura en personas con enfermedades respiratorias o cardíacas.
- Frecuencia cardíaca irregular, ataques cardíacos no fatales.
- Agravamiento del asma y enfermedades alérgicas.
- Disminución de la función pulmonar y aumento de los síntomas respiratorios.
- Efectos sobre la piel, asociados con dermatitis aguda y crónica con síntomas de quemazón, picor y edema (Caballero & Alvarado, 2006)
- Efectos en los ojos como lagrimeo, fotofobia, edema de párpados e hiperemia conjuntival (Caballero & Alvarado, 2006)
- Marcada reducción en la expectativa de vida de las poblaciones urbanas particularmente en subgrupos susceptibles de la población (Sahagún, 2009).
- Daño oxidativo del ADN los cuales conducen a efectos cardiovasculares y reproductivos (Lewtas, y col, 1979).

(Oyarzún, 2010) concluye que los efectos más importantes a corto plazo por la exposición a material particulado son: disminución en la función pulmonar, interferencia en fagocitosis y depuración mucociliar, así también se puede citar los efectos a largo plazo los cuales serían: bronquitis crónica, genotoxicidad y aumento de la frecuencia de cáncer pulmonar.



La contaminación del aire indudablemente produce un impacto en la salud, siendo importante determinarla, para ello es necesario considerar los siguientes componentes (Sahagún, 2009):

**Relación dosis-respuesta:** Se basa en estimar la magnitud de los efectos de la contaminación del aire sobre la salud, las funciones dosis-respuesta determinadas en estudios epidemiológicos.

**Población susceptible:** Puede incluir a toda la población expuesta; o también por otros factores se pueden incluir población vulnerable: niños, ancianos o individuos asmáticos.

**Cambio en la calidad del aire:** Mediante la estimación de la diferencia entre los valores actuales de contaminación ambiental y los recomendados para eliminar los efectos en la salud.

En la ciudad de Cuenca no se cuenta con suficiente información sobre la exposición de PM 2,5 a pesar que se realizó un Informe de la Calidad del Aire de Cuenca 2015 en donde se estableció que el valor medio de las concentraciones de PM 2,5 de los puntos monitoreados no supera el valor límite máximo permitido establecido por el NCCA ( $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) y OMS ( $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ), (Espinoza, 2015), sin embargo por la limitada información, es necesario realizar estudios que permitan obtener resultados cuantitativos los cuales pueden ser tomados como guía para la estimación de los efectos asociados a la exposición.

Se ha denominado como parte de los contaminantes al material particulado, debido a que ocasionan un gran daño a la salud humana, por ello se busca emitir una norma donde se establezcan restricciones en la concentración para un período determinado, el cual intervendrá en la reducción del daño (Astudillo, 2014).

## 2.10 MECANISMO DE DEPOSICIÓN DE AEROSOL EN EL SISTEMA RESPIRATORIO

La deposición del aerosol se establece según las propiedades aerodinámicas y de acuerdo a la fisiología de la respiración. Por lo que ésta varía en las regiones del aparato respiratorio, de acuerdo con esto, se presentan tres mecanismos: impactación inercial, sedimentación y difusión (Talegón, 2011).

La deposición de las partículas en la actualidad es un factor de gran interés, en virtud de los numerosos aspectos que pueden influir en este proceso, entre los más importantes se puede destacar la aerodinámica de la partícula, las condiciones respiratorias tales como la frecuencia de respiración o la estructura de las propias vías respiratorias (Jara, 2009).

### 2.10.1 Deposición por impactación inercial

Abarca partículas de tamaño  $\geq 5$  micras, por su proporcionalidad respecto al flujo volumétrico, así como a la sección aerodinámica. Se presenta en situaciones con elevado flujo y cambios bruscos de trayectoria, en nariz y garganta y con menor frecuencia en tráquea y bronquios (Talegón, 2011). Esta deposición se encuentra en función de la velocidad el aire y disminuye con la profundidad de las vías respiratorias (Repetto, 1978).

### 2.10.2 Deposición por sedimentación

Se presenta por la proporcionalidad respecto del peso de la partícula, localizándose en la tráquea y bronquios. Partículas ingresadas al sistema respiratorio con un tamaño referencial de 1 a 5 micras se retendrán con mayor eficiencia por este mecanismo (Talegón, 2011), además ésta se ve favorecida por la quietud del aire y el tiempo de residencia, y se incrementa con la profundidad del sistema respiratorio (Repetto, 1978).

### 2.10.3 Deposición por difusión

Resulta del movimiento al azar, vibración de las partículas pequeñas por ejemplo difusión browniana a consecuencia del bombardeo por las moléculas gaseosas. La deposición por difusión se realiza en los últimos espacios respiratorios, siendo el más común la región alveolar en donde se realiza la deposición de partículas menores de  $0,5 \mu\text{m}$  de diámetro (Talegón, 2011).

Uno de los mecanismos de deposición de partículas más importantes es la sedimentación, y uno de los principales factores que pueden favorecer a este mecanismo es la gravedad y la velocidad de la partícula (Jara, 2009).

La fuerza de gravedad, es uno de los factores más relevantes, a razón de que tiene la capacidad de desviar a las partículas de su línea de corriente, lo cual puede precipitar sobre las paredes de las vías respiratorias, y según la estructura de los conductos éstos pueden estar más o menos inclinados en virtud de que el ángulo descrito por éstos con la horizontal es determinante (Jara, 2009). Estos presentan ángulos de hasta  $45^\circ$  y su inclinación respecto a la vertical varía desde  $0^\circ$  en la tráquea, hasta  $60^\circ$ , los diámetros de los mismos van disminuyendo con cada bifurcación, mientras su número va creciendo geoméricamente en este proceso (Astudillo, 2014).

El impacto por inercia ha sido observado en el árbol bronquial, las principales zonas de deposición se encuentran en la región que separa el conducto madre y los conductos hijos conocida como “**carina**”, según (Comer, y col, 2001), en la primera generación, esta zona es

simétrica, pero como el flujo no tiene el tiempo suficiente como para reestablecerse, la deposición en la siguiente “**carina**” es asimétrica (Jara, 2009), así como se demuestra en la figura 2.

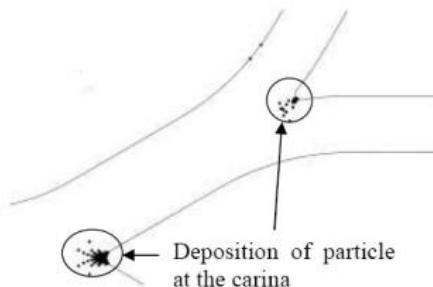


Figura 2. Deposición de partículas en la región carina

Fuente: (Jara, 2009)

Cuando las partículas han alcanzado penetrar en la región pulmonar, la cual está constituida por los bronquios respiratorios, los conductos alveolares y los sacos alveolares, su función es disminuir el aire inspirado uniforme y rápidamente hacia el interior de los pulmones (Astudillo, 2014).

## 2.11 TOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DEL MATERIAL PARTICULADO

La capacidad de ingreso se determina por el diámetro aerodinámico del material particulado, como se puede observar en la figura 3 según el tamaño de la partícula, ésta puede ingresar en diferentes partes de sistema respiratorio, por lo que a un mayor tamaño este se mantendrá en las vías aéreas superiores debido a que existe una primera línea de defensa del sistema respiratorio (Li, y col, 1996), el cual presenta defensas mecánicas como estornudo, tos y depuración mucociliar. Sin embargo, cuanto más pequeña es, mayor es su capacidad de penetración en el árbol respiratorio (Oyarzún, 2010).

Las partículas finas cuyo diámetro aerodinámico es  $\leq 2,5 \mu\text{m}$  alcanzan fácilmente los bronquiolos terminales y los alvéolos, desde donde pueden ser fagocitadas por los macrófagos alveolares y atravesar la barrera alvéolo-capilar para ser transportadas hacia otros órganos por circulación sanguínea (Morales, 2006). Además, existe una tercera línea de defensa que está mediada por células de respuesta inmune y células de respuesta humoral específica, en esta línea de defensa es más difícil que se puedan eliminar y es donde más daño pueden ocasionar en el ser vivo (Nemmar, y col, 2013).

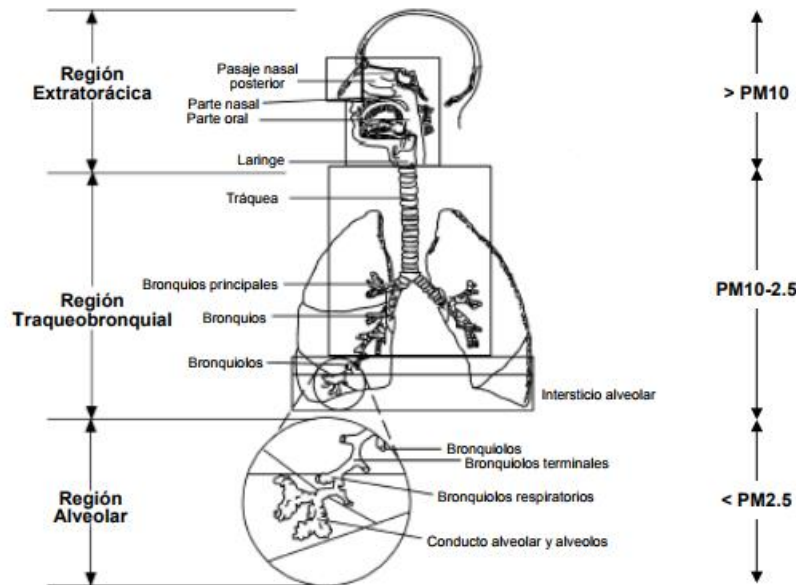


Figura 3. Proceso de deposición de las partículas según su diámetro aerodinámico

Fuente: EPA, 2002

Cuando el material particulado haya logrado evitar los distintos mecanismos de defensa del sistema respiratorio este se distribuye en los tejidos y células del pulmón donde podrían sufrir transformaciones metabólicas y ser activados para producir distintos efectos biológicos (Sánchez, 2015).

Para determinar la toxicidad que presentan las partículas del material particulado sobre las células del pulmón, es importante identificar las características físicas y químicas que estas presenten (Gutiérrez, 2014). Algunas investigaciones muestran que el área de superficie puede determinar el potencial de las partículas para provocar efectos biológicos *in vitro* e *in vivo* (Brown, y col, 2001), las partículas más pequeñas por lo general muestran la mayor toxicidad porque poseen una mayor superficie de contacto con las estructuras celulares y de ese modo se pueden liberar una mayor cantidad de moléculas (Gutiérrez, 2014), además se asocia con enfermedades pulmonares, cardiovasculares y cáncer.

Varios investigadores han llegado a la conclusión que uno de los factores fundamentales que contribuyen en el efecto tóxico del material particulado, es sin duda la composición química de la partícula, a razón que al comparar los efectos biológicos que producen diferentes partículas de similar tamaño, varía enormemente los resultados, ya que poseen una composición química diferente (Schwarze, y col, 2007).

El pulmón, debido a su función y gran área de superficie, es claramente un órgano diana principal de la lesión oxidativa. Por tanto, es lógico que el pulmón tenga un sistema de defensa extracelular

antioxidante para protegerse contra la oxidación excesiva de sus delicadas células epiteliales pulmonares (Kelly, 2003).

Los productos de oxidación secundarios derivados de los contaminantes oxidantes, inicia una serie de respuestas celulares al llegar a la superficie del pulmón, incluyendo la generación de citoquinas, expresión de moléculas de adhesión, y la modificación de las uniones estrechas, estas respuestas conducen a la afluencia de células inflamatorias en este órgano, como consecuencia de ello la permeabilidad pulmonar aumenta pudiendo desarrollarse un edema (Kelly, 2003). Sin embargo, las partículas tienen mayor posibilidad de establecer contacto con la superficie alveolar y atravesar la barrera alveolo capilar por translocación, produciendo efectos a nivel sistémico, y debido a su contenido rico en compuestos químicos oxirreductores y su habilidad para dañar a la mitocondria, estas partículas producen una gran respuesta inflamatoria en tejidos pulmonares y extrapulmonares, como el endotelio vascular incluyendo el de los vasos coronarios (Torres, 2011).

Además, la inestabilidad de los compuestos químicos que forman la cadena de ADN y los nucleótidos en condiciones de temperatura y pH determinado producen reacciones de hidrólisis espontáneas que crean sitios básicos (Nemmar, y col, 2013). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno producidas en el metabolismo celular también provocan diversas mutaciones debido a que son moléculas electrofílicas altamente reactivas que cuando llegan al núcleo de la célula interactúan con los grupos nucleofílicos de la desoxirribosa y de las bases nitrogenadas del ADN, lo cual ocasiona daños oxidativos (Moller & Loft, 2010), entre las más importantes se encuentran las roturas de cadena simple (SSB) y roturas de cadena doble (DSB). Los mecanismos por lo que los ROS producen roturas de cadena en el ADN incluye la adición de OH en las uniones C=C y modificaciones químicas de las bases o el azúcar (Mordechai, 1988). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la inflamación pueden generar daño en el material genético de las células expuestas (Schwarze, y col, 2007). Una amplia gama de estos estudios realizado *in vitro* en cultivos celulares ha demostrado que el material particulado, recolectado, posee una actividad genotóxica y mutagénica (Elassouli, y col, 2007), (Gutiérrez, y col, 2006), (Jun, y col, 2012), (Lepers, y col, 2014).

El estrés oxidativo se produce cuando existe un desequilibrio entre la velocidad de producción y la destrucción de moléculas de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Dentro de los compuestos que forman el grupo de especies reactivas de oxígeno se incluye los radicales libres; iones de oxígeno ( $O_2 \bullet$ ), hidróxidos ( $OH \bullet$ ), peróxidos ( $RO_2 \bullet$ ), e hidroperóxidos ( $HO_2 \bullet$ ) algunos compuestos que fácilmente pueden convertirse en radicales como peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), del ácido hipocloroso (HClO) y el ozono ( $O_3$ ). Entre los ROS se encuentran también iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto inorgánicos como orgánicos (Gutiérrez, 2014).

Para poder identificar los daños que produce el material particulado, generalmente los estudios comienzan por la caracterización física y química de las partículas, luego se investiga los efectos sobre la salud y los mecanismos que intervienen mediante estudios *in vivo* e *in vitro* (Oberdöster, y col, 2005). Los estudios *in vivo* evalúan los efectos en conjunto, pero requieren de un mayor tiempo, así como de mayor presupuesto y equipo. Las pruebas *in vitro* evalúan rápidamente los daños que producen, los niveles de toxicidad efectivos y también pueden proporcionar ideas y confirmaciones de mecanismos de los efectos *in vivo* importantes, pero no muestran el efecto real que se produce en los organismos, debido a que no intervienen todos los factores que podrían cambiar el resultado en los organismos vivos. Por lo que se debe tener precaución al interpretar los datos obtenidos en los ensayos *in vitro* (Oberdöster, y col, 2005).

La actividad genotóxica del material particulado en los pulmones, puede ocasionar diversas mutaciones, este es un paso crucial en la carcinogénesis y niveles elevados de lesiones oxidativas del ADN, implicando fuertemente estos daños en la etiología del cáncer (Cooke, y col, 2003).

Para estudiar la genotoxicidad del material particulado es muy utilizado el ensayo cometa, debido a las ventajas que ofrece sobre otros ensayos del mismo tipo. En los estudios realizados con el ensayo cometa se suele utilizar diferentes vehículos para disolver las partículas y poder aplicarlos sobre los cultivos. Las partículas se pueden disolver en disolventes orgánicos (fracción orgánica) (Nemmar, y col, 2013).

## 2.12 ADN Y LA GENOTOXICIDAD

A los ácidos nucleicos constituyentes del ADN, se los define como biomoléculas que portan información genética, constituidas por subunidades de conformación estructural conocidos como nucleótidos, enlazados por uniones de éster de fosfato, sin periodicidad aparente. Esta periodicidad es responsable de la existencia de información de todas las series de aminoácidos de las proteínas de la célula, en donde los ácidos nucleicos constituyen el depósito de información de estas secuencias. Por lo tanto, los ácidos nucleicos y las proteínas son colineares, definiéndose de esta manera que existe una correlación entre ambas secuencias, a esta correlación se la define como Código Genético siendo una molécula que contiene toda la información de los organismos, misma que es requerida para la transmisión hereditaria (Burriel, 2017).

El ADN se encuentra en el núcleo celular, mitocondrias y algunos organelos, está constituido por largas cadenas dobles de nucleótidos enlazados entre sí por el grupo fosfato para formar los cromosomas, la secuencia aperiódica de nucleótidos posee la información y el material genético que controla el metabolismo de los seres vivos (Burriel, 2017).

El ADN puede estar expuesto al ataque de diferentes agentes sean estos físicos o químicos, debido a que se somete a procesos de replicación y transcripción del código base, además que al ser una molécula pueden interaccionar alterando su estructura química básica (Sahagún, 2009), también está expuesta a un sinnúmero de cambios dinámicos los cuales posibilitan el funcionamiento celular, razón por la cual se establece que el ADN no se encuentra en estado estático (Astudillo, 2014).

Por ello, es importante determinar con exactitud o predecir de manera confiable los efectos genotóxicos que afecten la molécula del ADN en el ser humano por la presencia de agentes químicos, es necesario realizar varias pruebas para su identificación (Jena & Bhunya, 1995). Además, es importante mencionar que los análisis de contaminantes de manera directa requieren de gran precisión y de un conocimiento amplio del agente químico que se va a verificar, debido a que su evaluación es limitada (Rodríguez, y col, 1995) por causa de su sensibilidad. De acuerdo al criterio de los investigadores (Han, y col, 1995) (Hayasi, y col, 1992) se establece que se realice pruebas *in vivo* o *in vitro* con micro o macro organismos.

Las modificaciones que presenta el ADN cuando interactúa con un genotóxico se pueden presentar en dos clases generales, una de ellas es la identificación de la especie genotóxica responsable de la modificación estructural, un ejemplo de este tipo de modificación es la irradiación UV, debido a que es una fuente de estrés genotóxico continuo, y una fuente pura de lesiones a barreras, (Mansilla, 2013), lo cual implica nucleótidos anormales produciendo (modificación, fragmentación, interacción) (Barrera, 2017), como se puede observar en la figura 4, el cual interfiere con las actividades normales de procesamiento de ADN como es la metilación, que es un proceso imprescindible que ocurre en todos los organismos, desde bacterias, plantas y animales, éste desempeña funciones de coordinación transcripcional, replicación y reparación del ADN, tanto en organismos adultos como en desarrollo (Carmona, 2013). La segunda modificación hace referencia a la presencia de bases normales en un sitio incorrecto de la secuencia de lectura, lo que va a producir errores (Barrera, 2017).

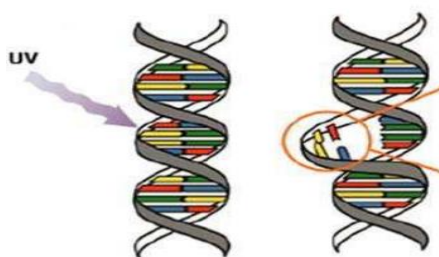


Figura 4. Lesiones causadas por la Radiación Ultravioleta

Fuente: (Mansilla, 2013)



Por lo tanto, por las funciones que cumple el ADN, este debe interactuar con otras moléculas, las interacciones más habituales suelen ser reversibles y no covalentes (León, 2013), de acuerdo a los siguientes patrones: interacciones electrostáticas que inducen ruptura de hélice (de una sola o de las dos hélices), intercalación (compuestos aromáticos pequeños interactúan con el ADN) y pérdida de sensibilidad.

Además es necesario mencionar que estas funciones pueden verse afectadas, debido a que en la actualidad, existe un alto desarrollo científico y tecnológico, lo cual ha favorecido al incremento de la contaminación ambiental, encontrándose el ser humano expuesto a diferentes tipos de sustancias que pueden ocasionar daño al ADN (Khaidakov, y col, 2001), sin embargo las células cuentan con mecanismos complejos que vigilan la integridad del ADN, activando mecanismos de reparación cuando hay deficiencias o errores durante la replicación, teniendo como finalidad el mantener la integridad genética, no obstante cuando las alteraciones son permanentes en la estructura del ADN, pueden generar mutaciones, transformación carcinogénica y muerte celular (Tafur & Marín, 2014).

La estructura química de ADN, puede sufrir alteraciones como: oxidativas (alteraciones en las bases o en los azúcares), o alteración de bases (eliminación de bases) o rupturas de una cadena (rupturas entre la unión de un azúcar y el grupo fosfato) (Astudillo, 2014).

Estudios realizados en las últimas décadas han establecido que el material particulado PM 2,5 contiene hidrocarburos aromáticos policíclicos que son mutagénicos y carcinogénicos, los cuales son los responsables de producir daño oxidativo del ADN, ocasionando afecciones cardiovasculares y reproductivos (Quijano, y col, 2013), además los HAPs pueden ejercer sus efectos negativos sobre el organismo por la inducción de estrés oxidativo. Estos compuestos tienen la capacidad de entrar en ciclos redox, aumentar la formación de Especies Reactivas del Oxígeno (ROS) y, por lo tanto, causar estrés oxidativo. Las partículas sólidas en el material particulado son otra fuente de ROS, producido fundamentalmente como resultado de los procesos inflamatorios (Li, y col, 1997). El estrés oxidativo resulta de un desequilibrio entre prooxidantes, incluyendo ROS y antioxidantes en el organismo que pueden afectar al ADN, a los lípidos, y a las proteínas (Klauning & Kamendulis, 2004).

El metabolismo del Benzo(a)pireno es de mucha importancia debido a que, aunque no es tóxico por sí solo su efecto carcinogénico reside en la formación de metabolitos primarios y secundarios potencialmente tóxicos, los cuales son capaces de interactuar con constituyentes celulares e inducir un daño celular. Esto mediante la vía de señalización del Hidrocarburo de Aro, según sus siglas en inglés (AhR) (Gu, y col, 2000), que involucra la inducción de genes que codifican enzimas de las fases I y II del metabolismo de xenobióticos (Vázquez, y col, 2016).



Como se observa en la figura 5 (Vázquez, y col, 2016), en la primera fase, el b(a)p es oxidado por (CYP1A1) enzimas del citocromo correspondientes a la familia CYP. Posteriormente, la epóxido hidrolasa (EH) hidroliza estos óxidos.

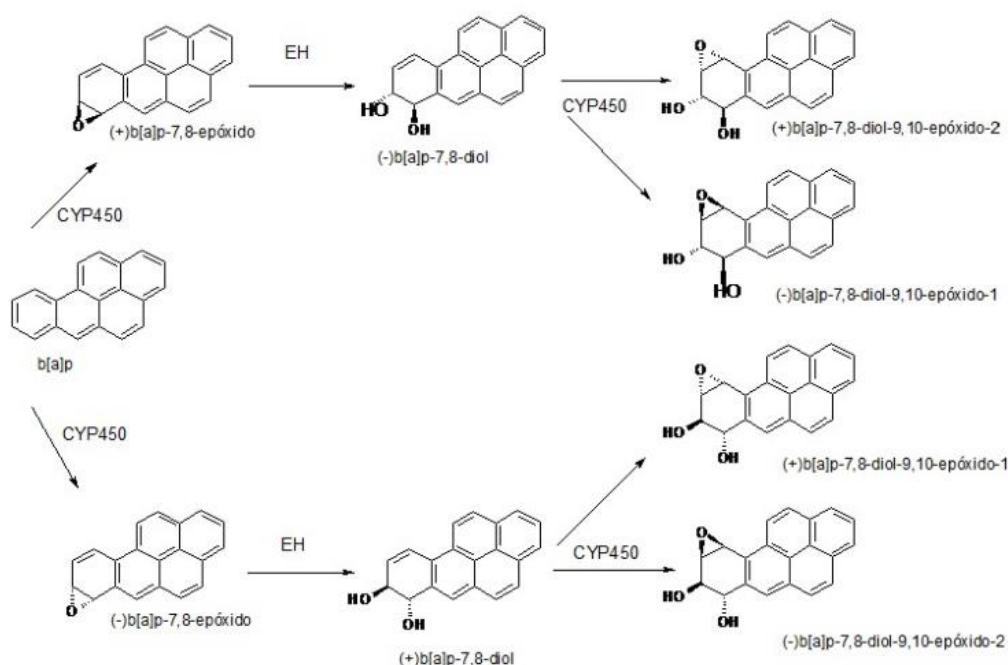


Figura 5. Vía metabólica en la cual el b(a)p se bioactiva a b(a)pDE

Fuente: (Vázquez, y col, 2016)

En la primera fase, el b(a)p es oxidado por (CYP1A1) enzimas del citocromo correspondientes a la familia CYP. Posteriormente, el epóxido hidrolasa (EH) hidroliza estos óxidos, como se muestra en la figura 5.

La fase II consiste en la conjugación de los Benzo(a)pireno Diol Epóxido b(a)pDE generados en la fase I con moléculas polares, y de esta manera evitar su interacción y un posible daño a constituyentes celulares como el ADN. Las enzimas de la fase II que catalizan la conjugación tienen diferente especificidad por sus sustratos. El nivel de expresión depende del tipo de tejido y estado de desarrollo del organismo (Vázquez, y col, 2016). En la fase II participan varias enzimas, sin embargo, glutatión S-transferasas (GST) son las principales enzimas en esta fase (Weng, 2005). El patrón de expresión y distribución es complejo, incluso los diferentes tipos celulares presentes en un mismo tejido presenta diferentes patrones de expresión.

Los b(a)pDE son considerados metabolitos carcinogénicos y mutagénicos debido a la presencia del epóxido en la posición C-10, llamada región bahía, además debido a su capacidad para unirse covalentemente al ADN favorece a la formación de aductos en los grupos amino de la posición

C6 de la adenina o C2 de la guanina, si estos aductos no son reparados pueden causar mutaciones en genes capaces de conducir a una transformación celular, de acuerdo a como se ve en la figura 6.

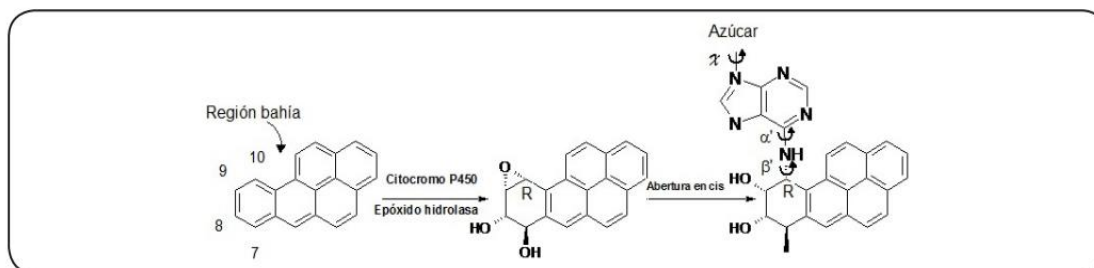


Figura 6. Estructura química del b(a)p. Formación del metabolito b(a)pDE mediada por CYP450 y epóxido hidrolasas

Fuente: (Vázquez, y col, 2016)

Tras su absorción por el organismo se distribuye ampliamente en todos los tejidos, especialmente en los que tienen mayor contenido graso por lo que los principales órganos afectados generalmente son los pulmones y la piel. Los HAPs no tienden a acumularse en el organismo y la mayoría de ellos son eliminados a los pocos días de su absorción, principalmente por la orina y las heces (Agudo, 2010).

## 2.13 BIOMARCADORES: INDICADORES DE DAÑO GENÉTICO

En la actualidad el ser vivo, es un blanco fácil para diferentes tipos de enfermedades, debido a que está expuesto a diversos agentes como los genotóxicos, los cuales tienen afinidad de interactuar con el ADN, produciendo alteraciones estructurales o funcionales tanto en células germinales como somáticas (Aiasa, y col, 2012), lo que constituye un elemento determinante en la aparición y desarrollo de alteraciones en la salud como: carcinogénesis, teratogénesis, genotoxicidad, nefrotoxicidad, neurotoxicidad o inmunotoxicidad entre otros (Arango, 2011).

Sin embargo para comprobar que una sustancia causa daño genético se debe definir las siguientes variables como: nivel de exposición del organismo a la sustancia, distribución, retención de la sustancia una vez que ha penetrado en el cuerpo, eficiencia de los sistemas de activación metabólica y/o detoxificación en los tejidos diana y la reactividad de la sustancia (Arias, 2015) una vez establecida las variables se podrá detectar el daño genotóxico de los compuestos químicos, siendo necesario el empleo de una amplia variedad de métodos de prueba, conocidos como biomarcadores que comúnmente utilizan microorganismos, células in vitro de humanos y de otros mamíferos, modelo de plantas y animales de laboratorio (Misra & Waalkes, 2001).

Los biomarcadores determinan la magnitud de la respuesta del organismo al contaminante, son controlados a nivel molecular y bioquímico, se aplica tanto a poblaciones naturales provenientes

de hábitats contaminados, como en organismos exhibidos experimentalmente a contaminantes (McCarthy & Shugart, 1990).

El término biomarcador se utiliza para medir una interacción entre un sistema biológico y un agente que puede ser de tipo químico, físico o biológico el cual es evaluado como una respuesta funcional o fisiológica que ocurre a nivel celular o molecular, y además está asociada con la probabilidad del desarrollo de una enfermedad (Arango, 2011). La interacción que desarrolla el agente depende de aspectos como, características heredadas o adquiridas del individuo (o del sistema biológico), y de las circunstancias de la exposición siendo posible o no el encontrar el efecto adverso (Arango, 2011), además es necesario mencionar que el agente una vez que se encuentra dentro de la célula, puede reaccionar por sí mismo (acción directa), o bien puede ser activado por las enzimas metabólicas (acción indirecta) (Astudillo, 2014).

Dentro de las circunstancias de la exposición se debe considerar para una evaluación adecuada las siguientes variables: dosis, vía de contacto, duración y frecuencia de exposición con el agente (Arango, 2011) (Cajaraville, 2017).

La selección de los biomarcadores a utilizar dependerá del conocimiento científico y la influencia de factores sociales, éticos y económicos (Lock & Bonventre, 2008), (Atkinson, y col, 2000), (Tambor, y col, 2010).

Los biomarcadores se encuentran diferenciados en tres tipos:

### 2.13.1 BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN

Evalúa la presencia de una sustancia exógena, un metabolito o el producto de la interacción entre el agente xenobiótico (compuestos naturales o sintéticos del ambiente que el organismo metaboliza y acumula) y una molécula o célula diana (Arango, 2011).

Los biomarcadores de exposición se clasifican en:

**Selectivos:** Medida directa del tóxico o sus metabolitos. Ej: B(a)p en la sangre.

**No selectivos:** Biomarcadores inespecíficos de exposición. Ej: Tioéteres en orina.

### 2.13.2 BIOMARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD:

Es un indicador de la capacidad heredada o adquirida de un organismo para responder a la exposición a una sustancia xenobiótica.

Los Biomarcadores de susceptibilidad se clasifican en:

**Marcadores de polimorfismos de sistemas activadores:** Permiten la medida de la actividad de las enzimas del citocromo P450.

**Marcadores de polimorfismos de sistemas detoxificadores:** Son medidas de actividad de enzimas tales como la glutatión-S- transferasa, la acetiltransferasa, a glucoroniltransferasa o la paraoxonasa.

### 2.13.3 BIOMARCADORES DE EFECTO:

Evalúa la alteración bioquímica, fisiológica o de comportamiento producida en el organismo que puede estar asociada con una enfermedad (Arango, 2011), es decir este factor indicará cambios a nivel celular, tales como expresiones alteradas de enzimas, mutaciones y lesiones preneoplásicas.

Los biomarcadores de efecto se clasifican en:

**Citotóxicos:** Se refiere al daño y la muerte celular.

**Citostáticos:** Se demuestran en los incrementos o retrasos en la síntesis del DNA, pudiendo ocasionar muerte celular, mutaciones y cáncer.

Se concluye entonces que estos biomarcadores combinados con otros análisis bioquímicos son estratégicos para identificar el impacto de polución sobre el ambiente en un largo plazo (Cajaraville, 2017).

En la tabla 2 se detalla los biomarcadores que se emplea de forma frecuente según el tipo de exposición.

Tabla 2. Tipo de biomarcadores

TIPO	BIOMARCADOR
EXPOSICIÓN	Excreción de metabolitos en orina
	Aductos en ADN
	Aductos en albúmina
	Aductos en hemoglobina
EFECTO	Recuento de eritrocitos, leucocitos y trombocitos
	Inhibición de enzimas del grupo HEMO
	Niveles de proteínas en la orina
	Marcadores de citotoxicidad
	Niveles de células necróticas
	Niveles de anticuerpos
SUSCEPTIBILIDAD	Polimorfismos de enzimas
	Polimorfismos de la glutatión-transferasa
	Polimorfismo genético

**Fuente:** (Arango, 2011)

En la actualidad existe varios procedimientos para la detección de modificaciones del ADN, uno de ellos, es el ensayo 32-post-marcado (Gupta, y col, 1982), éste posee la capacidad de determinar de manera cualitativa y cuantitativa los ductos, esto es un factor importante debido a que permite obtener datos experimentales en donde se corrobora su función en el inicio de la carcinogénesis química (Miller & Miller, 1981), sin embargo, éste presenta factores negativos debido al costo y al tiempo que requiere.

Otro de los procedimientos que se emplea para identificar estas causas desde un enfoque general es la detección de rupturas de la cadena de ADN, ya sea directamente por el producto químico tóxico (o su metabolito) o por el procesamiento del daño estructural (Shugart, y col, 1992). La rotura de la hebra de ADN ha sido considerada como indicador sensible de genotoxicidad (Mithchelmores & Chipma, 1998). La medición de este daño como un parámetro genético representa un medio para detectar el efecto de una amplia gama de agentes genotóxicos (Martínez, 2017).

Hasta la fecha, los más utilizados para la determinación del daño al ADN son aquellos que implican elución y el desenrollado alcalino, aunque en la última década el uso del ensayo de

miconúcleos y la electroforesis en gen de células individuales en su versión alcalina o ensayo cometa se ha impuesto ante otros marcadores (Large, y col, 2002), (Hamoutene, y col, 2002). Para poder determinar el daño que puede ocasionar el estar expuesto a un tóxico se debe considerar, su naturaleza, dosis, la cantidad de tóxico que llegue en estado activo al sitio de acción, la función que desempeñe en los tejidos afectados, y el tiempo que se le permita permanecer allí (Cajaraville, 2017).

## 2.14 PRUEBA DE GENOTOXICIDAD: ENSAYO DEL COMETA

Un hecho primordial para la salud, así como el normal funcionamiento del organismo, es la integridad del ADN, mismo que está predispuesto a sufrir afecciones por diversos factores (Collins, 1999), (Halliwell, 2000), (Moeller & Loft, 2002).

El daño al que puede estar expuesto el ADN es perjudicial, la prevención del mismo o en su efecto, el incremento en la eficiencia de reparación, se considera como beneficioso; es por ello que en la actualidad se cuenta con herramientas sensibles y fiables que nos permiten profundizar en los aspectos relacionados con la detección del daño en el ADN, así como con su protección y reparación (Zuñiga, 2009).

Hasta la presente fecha, se ha pretendido trabajar con métodos sensibles, rápidos y económicos que estimen confiablemente la afección en el ADN, lo que ha permitido implementar técnicas que miden directamente las roturas de cadena simple (SSB) y de doble cadena (DSB) (Zuñiga, 2009). Existen pocas técnicas que determinen niveles bajos de roturas en el ADN de células individualizadas, de las que existen en la actualidad una de las más populares es el ensayo cometa denominada de esta manera por la morfología que mostraban las células que tenían su ADN dañado (Östling & Johanson, 1984), esta metodología ha tenido un gran impacto en numerosas áreas del conocimiento científico, especialmente en bioquímica, genética y biología molecular (Zuñiga, 2009).

El ensayo cometa comprende la siguiente metodología la cual se presenta en la versión estándar: (1) células embebidas en agarosa de bajo punto de fusión; (2) para eliminar membranas, citoplasmas y nucleoplasmas se basó en la lisis de las células usando sales y detergentes con una alta concentración, (3) se somete a una exposición alcalina (pH 13) para el desenrollamiento y relajación del ADN, (4) se realiza una electroforesis en condiciones alcalina, esto permite la expresión de sitios de ADN de doble y simple cadena y sitios lábiles, los fragmentos de ADN con carga negativa son atraídos hacia el ánodo dando al núcleo la característica de una cola de cometa (5) se procede a neutralizar la alcalinidad de las preparaciones mediante lavado, con un pH 7.5 (6) procesos de tinción y visualización depende principalmente de las necesidades, lo cual presentará un pequeño efecto en la sensibilidad y en el poder de resolución (7) obtención

de los resultado, para ellos se dispone de una gran variedad de sistemas de análisis de imágenes de células individuales.

Esta metodología se basa en que el ADN no dañado mantiene una asociación altamente organizada con una matriz de proteínas en el núcleo (Astudillo, 2014).

Este ensayo tiene por objetivo detectar el daño al ADN, sobre todo por las rupturas de cadena, formación de sitios lábiles al álcali, entrecruzamientos ADN-ADN y ADN-proteínas (Rodríguez, y col, 2016). Además es necesario mencionar que este ensayo es uno de los más empleados debido a que presentan ventajas como: rapidez, detecta bajos niveles de daño, simplicidad en el análisis de los datos a nivel de células individuales, requiere un pequeño tamaño de muestra, flexibilidad, bajo costo y su aplicabilidad a cualquier población de células (Tice, y col, 2000), (Colling, 2004). Por todo lo expuesto, se justifica su amplio uso *in vitro* e *in vivo* en la evaluación genotóxica de sustancias químicas, así como el biomonitoreo ambiental y humano.

## CAPITULO III

### 3.1 METODOLOGÍA

### 3.2 DISEÑO DEL ESTUDIO

#### 3.2.1 LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA

El cantón Cuenca es uno de los 15 cantones que pertenece a la provincia del Azuay y se ubica en la región centro sur, se encuentra situada a una altura entre 2 350 y 2 550 msnm.

Según el estudio desarrollado en el PDOT del cantón Cuenca 2011, se divide al territorio de acuerdo a las siguientes áreas (Quezada, 2015):

- Área urbana que comprende una superficie de 6 771 Ha:
  - Límite de área urbana legal;
  - Cabeceras de las parroquias rurales;
  - A las urbanizaciones exteriores.
  
- Áreas de influencia inmediata constituida por el territorio rural fijado como “Zona de expansión urbana”, está área consta con una superficie de 12 013 Ha
  
- Área rural, cuenta con una superficie de 312 880 Ha.

El cantón Cuenca se encuentra ubicado geográficamente entre las coordenadas latitud sur de 2°54' 1.98" y 79°0' 16.31" de longitud oeste. Cuyos límites son: al norte con la provincia del Cañar, al sur con, San Fernando, Girón, Santa Isabel y Camilo Ponce Enríquez, al oeste con Guayas y al este con Gualaceo, Paute y Sígsig (Bermeo,2013).

A continuación, en la figura 7 se puede visualizar la ubicación del cantón, límites, y los puntos de estudio.



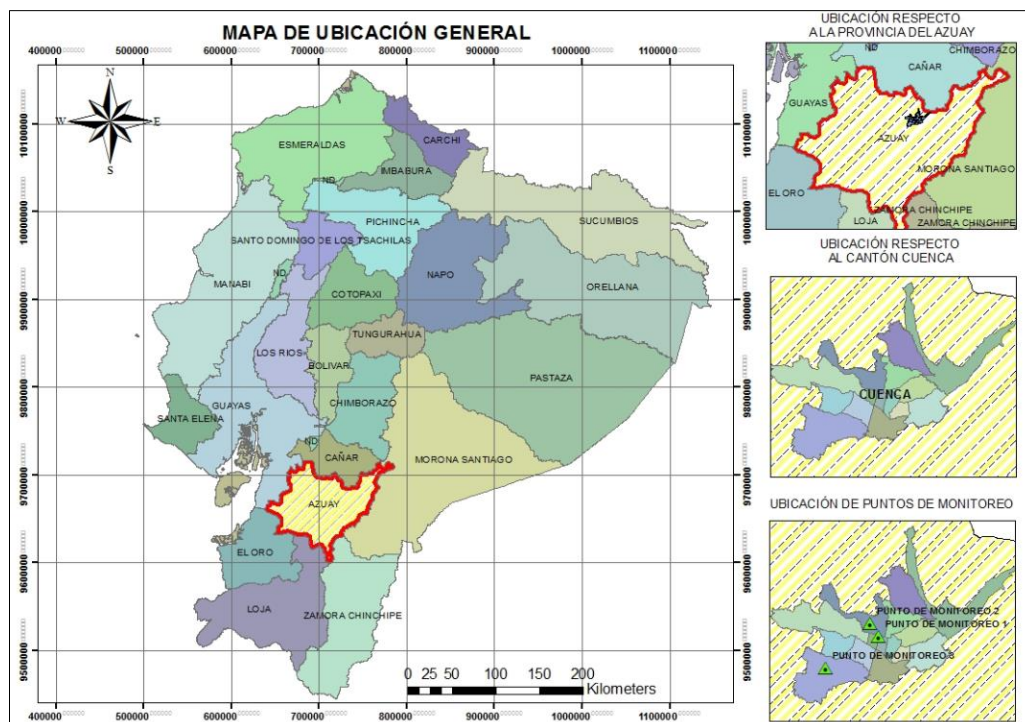


Figura 7. Mapa de ubicación general

Elaborado por: Autora

### 3.2.2 ASPECTOS DEMOGRÁFICOS

Por los datos que se dispone sobre el cantón Cuenca para hacer referencia a la población, se ha recurrido a la información sobre las proyecciones anuales de la cantidad de habitantes que proporciona el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) para el año 2018, en donde se establece que la población en Cuenca será de 614 539 habitantes el cual representa el 72,04 % del total de toda la provincia de los cuales en el área urbana se concentra 417 886 habitantes representando el 68 % con una densidad poblacional aproximada de 47 hab/ha, mientras que en el área rural se concentra una población 196 652 habitantes lo que representa un 32 % de la población.

La población azuaya se distingue porque está compuesta por un mayor número de mujeres que hombres, esto ocurrió debido a que surgió un feriado bancario en la década de los años 80 y a inicios del nuevo milenio, lo que ocasionó la migración de la población, siendo éste un fenómeno social que se sintió tanto a nivel urbano y rural en donde la movilidad se dio de manera interna (capital de la provincia) y externa (fuera del país) teniendo como objetivo principal mejorar la economía familiar.

### 3.2.3 CARACTERISTICAS CLIMÁTICAS

Según la ubicación geográfica espacial la provincia del Azuay se encuentra situada en un enclave, lo que facilita que el clima se vea afectado por factores como: ubicación, altitud, influencia del régimen amazónico o del Pacífico. Por ello existe una variación de los climas que están perfectamente diferenciados dentro de la provincia, como es el caso de los páramos, los desiertos, bosques secos, bosques húmedos, dando como resultado la presencia de siete tipos de clima dentro de la provincia, siendo el predominante el Ecuatorial mesotérmico semi húmedo (11 °C y 15 °C) con más 50 % de la superficie provincial.

Cuenta con una temperatura variable, que de acuerdo a las condiciones climáticas del cantón se ha establecido que en época invernal posee una temperatura que oscila entre 7 °C a 15 °C, y para la época de verano se ha establecido un rango entre 12 °C a 25 °C (Bernal, 2014), por lo que de acuerdo a las condiciones antes mencionadas el clima para el cantón Cuenca generalmente oscila entre los 10 °C a 21 °C, por lo que se lo considera privilegiado, esto por la ubicación geográfica de la ciudad (valle de la Cordillera de los Andes), teniendo como temperatura promedio 15,6 °C (Pesántez, 2012).

### 3.3 DISEÑO DE ESTUDIO

Para la determinación de la genotoxicidad de los extractos de la fracción orgánica, se utilizó un indicador de daño genético como es la electroforesis de células individuales más conocido con Ensayo Cometa.

Para ello, se llevó a cabo los ensayos de genotoxicidad y citotoxicidad sobre un modelo biológico, ejecutando lo siguiente:

- Tratamiento previo de los filtros.
- Monitoreo y recolección de los filtros para PM 2,5.
- Obtención del extracto de la fracción orgánica de PM 2,5
- Mantenimiento y siembra de la línea celular.
- Tratamiento mediante la aplicación de PM 2,5 en extracto orgánico a una concentración de 0,1 m<sup>3</sup>/ml por un período de exposición de 24 horas.
- Obtención de una suspensión celular adecuada de cada tratamiento empleado mediante cosecha.
- Determinación de la viabilidad celular por medio de fluorescencia empleando los fluorocromos diacetato de fluoresceína (FDA) y bromuro de Etidio.
- Evaluación de la genotoxicidad por medio del ensayo del Cometa.
- Análisis estadístico de los parámetros momento, longitud e intensidad de cola, usando el software Graphpad Prism 6.

### 3.4 SELECCIÓN DE LOS SITIOS DE MONITOREO Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Para el presente estudio, se monitoreó 27 puntos del área urbana de la ciudad de Cuenca (Anexo A), de éstos se identificó tres puntos en donde la concentración fue mayor. El muestreo se ejecutó por un período total de 6 meses, 2 meses por cada punto.

Los puntos en donde se realizaron los monitoreos se detalla en la tabla 3:

Tabla 3. Localización de los sitios de muestreo

PUNTOS	UBICACIÓN	COORDENADAS	
		Latitud	Longitud
P1	Calle Sangurima entre Benigno Malo y Luis Cordero	2°53'37.6516	79°0'13.8967"
P3	Av. De las Américas (Sector Basílica)	2°53'6.243	79°0'32.037"
P2	Av.de las Américas sector Coralcentro	2°54'48.1807	79°2'14.0012"

**Elaborado por:** Autora

- Punto 1: Calle Gaspar Sangurima entre Benigno Malo y Luis Cordero es un área céntrica en donde existe un flujo vehicular considerable. Punto estratégico, especialmente por la gran afluencia de buses urbanos, es una zona comercial y residencial, también es un sitio de gran afluencia de estudiantes debido a la presencia de una institución educativa cerca de este punto.
- Punto 2: Av. De las Américas - Sector basílica de Cuenca sector norte de la ciudad de Cuenca, siendo la extensión de la vía (Norte –Sur) de la ciudad, se observa los mismos inconvenientes que en el punto 3, es decir un aumento en la movilidad de todo tipo de transporte.
- Punto 3: Avenida de las Américas - Sector Coralcentro, sector sur de la ciudad de Cuenca, esta una de las principales avenidas que permite el ingreso hacia el centro histórico de la ciudad, por lo tanto, es una de las vías en donde diariamente se receipta





Figura 9. Equipo empleado en el monitoreo

El equipo fue ubicado en lugares de fácil acceso ya que esto permitía realizar inspecciones, mantenimiento y cambio de filtro con facilidad, se colocó en los balcones los cuales se encontraban en una altura aproximada de tres metros, debido a que a esa altura no existen obstáculos que afecten el movimiento del aire y además brindaba seguridad contra el robo del equipo.

La periodicidad de los filtros en el equipo para el monitoreo fue de tres filtros por semana, en la cual se alternó los días para el monitoreo debido a que las concentraciones podían variar en función del día de la semana, además las condiciones meteorológicas y patrones de emisión pueden producir variaciones en la concentración de los contaminantes. Las mediciones por mes fueron de 11 filtros, obteniéndose 22 filtros por los sesenta días de monitoreo que se realizó en cada punto, el tiempo de la toma de muestra fue de un día completo (ver Anexo B), obteniéndose un promedio de 24h como establece la normativa.

A continuación, en la tabla 4 se detalla el período de recolección de las muestras en los tres puntos monitoreados en el área urbana de la ciudad de Cuenca.

Tabla 4. Período de monitoreo del PM 2,5 en la ciudad de Cuenca, año 2018

<b>Puntos</b>	<b>Localización</b>	<b>Período de monitoreo</b>
<b>P1</b>	Sangurima entre Benigno Malo y Luis Cordero	Mayo, Junio y Octubre
<b>P2</b>	Av. De las Américas (Sector Basílica)	Julio y Septiembre
<b>P3</b>	Av. de las Américas sector Coralcentro	Agosto y Septiembre

**Elaborador por:** Autora

### 3.4.1 ESTABILIZACIÓN DE FILTROS DE LAS CONCENTRACIONES DE PM<sub>2,5</sub>

Para la realización del monitoreo, los filtros deben ser acondicionados antes y después del proceso de recolección, éste consiste en someter al filtro a un tratamiento de temperatura y humedad controladas durante un mínimo de 24 h logrando así una estabilidad en el peso lo que permite una mayor certeza de cuantificación del PM<sub>2,5</sub>.

Para la cuantificación de la concentración de partículas se empleó el análisis gravimétrico, se realizó un tratamiento de acondicionamiento tanto a los filtros limpios como a los utilizados, las condiciones que se emplearon fue para la humedad relativa 40 % a 45 %, con una temperatura de entre 15 °C y 30 °C (Astudillo, 2014).

Se registraron datos atmosféricos durante el monitoreo en los tres puntos, generándose una base de datos que se utilizó para determinar la corrección de la concentración del material particulado según lo estipula la norma ecuatoriana en el Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria, en el numeral 4.1.2.3 en donde menciona que: Las mediciones observadas de concentraciones de contaminantes criterio del aire deberán corregirse de acuerdo a las condiciones de la localidad en que se efectúen dichas mediciones, para lo cual se utilizará la ecuación 1.

$$C_c = C_o * \frac{760 \text{ mmHg}}{P_b \text{ mmHg}} + \frac{(273 + t^{\circ}\text{C})^{\circ}\text{C}}{298^{\circ}\text{K}} \quad (1)$$

Donde:

$C_c$  = concentración corregida

$C_o$  = Concentración observada

$P_b$  = Presión atmosférica en milímetros de mercurio

$t^{\circ}\text{C}$  = Temperatura local, en grados centígrados.

### 3.5 ANÁLISIS QUÍMICO

Para la extracción de la fracción orgánica se utilizó acetona y diclorometano, se trabajó con 8 de los 22 filtros muestreados, que fueron seleccionados de manera aleatoria. Cabe mencionar que paralelamente se procesó un filtro sin material particulado en las mismas condiciones.

Los 8 filtros fueron tomados por punto de monitoreo, con el fin de analizar la presencia del Benzo(a)pireno, Benzo(a)antraceno, Benzo(b)fluoranteno y fenantreno, para ello se tomó como referencia el método de extracción establecido por (Quijano & Meléndez, 2014), aplicado en ultrasonido.

El procedimiento se llevó a cabo en el laboratorio del Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca, para la extracción se colocó los filtros previamente pesados en frascos ámbar esterilizados, a esto se adicionó la mezcla de solventes Diclorometano y Acetona (1:1), iniciando con un volumen de 2 ml y sonicando a una temperatura entre 23 °C – 24 °C, durante 15 minutos, nuevamente se colocó 2 ml, realizándose éste proceso hasta completar un volumen de 10 ml. Posterior a esto los extractos fueron centrifugados, indicando que cada uno de los frascos estuvieron codificados con los puntos en donde fueron monitoreados.

Del material resuspendido se extrajo 5 ml para el ensayo genotóxico y 5 ml para la cuantificación de la concentración de Benzo(a)pireno, Benzo(a)antraceno, Benzo(b)fluoranteno y fenantreno por cromatografía de gases, almacenándolos en los frascos ámbar a una temperatura de 4 °C. En cambio, para el extracto que fue empleado para el ensayo cometa se lo llevó a sequedad durante un día y medio y posterior a esto se disolvió en 100µl de dimetilsulfóxido (DMSO).

La determinación de los HAPs se llevó a cabo por cromatografía de gases, en el laboratorio de la Universidad Técnica Particular de Loja, siguiendo la técnica descrita (Quijano & Meléndez, 2014).

### 3.6 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

#### 3.6.1 MODELO BIOLÓGICO

Para la investigación se utilizó la línea celular de Hámster Chino CHO-K1.

En la figura 10 se muestra las células de Hámster Chino CHO-K1 en cultivo.

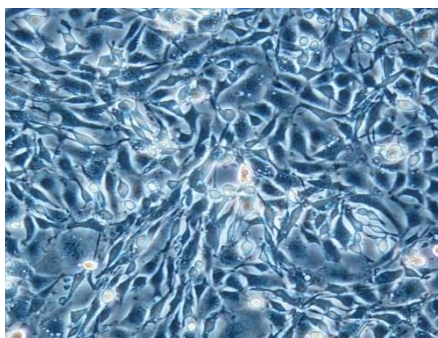


Figura 10. Células CHO-K1

Fuente: [https://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%A9lulas\\_CHO](https://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%A9lulas_CHO)



### 3.6.2 CONDICIONES DE CULTIVO

Para el desarrollo del medio de cultivo de células, se empleó el método establecido en el Laboratorio de Biología Celular y Genotoxicidad de la Universidad Técnica Particular de Loja el cual consiste en emplear HAM F – 12 (GIBCO) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO), 1 % de L-glutamina (2 mM) (GIBCO), y 1 % de Antibiótico – Antimicótico (100 Unidades/mL de Penicilina G, 100 µg/mL de Anfotericina B) (GIBCO). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> y atmosfera húmeda, el tiempo de adaptación de las células fue 24 h.

### 3.6.3 PROTOCOLO

Las células fueron sembradas en cajas multiplato de 96 pocillos, en cada uno de éstos se colocó 8 000 células en condiciones adecuadas, éstas fueron incubadas por 24 h, una vez sembradas las células fueron expuestas al extracto orgánico de PM 2,5 a concentración de 0,1 m<sup>3</sup>/ml junto con el medio de cultivo. Se empleó como control positivo Doxorrubicina a 2 µmol y como blanco del extracto orgánico dimetilsulfóxido (DMSO) al 0,5 %. El tiempo de exposición consistió en la incubación en condiciones adecuadas por 24 horas.

Para la cosecha celular las células son lavadas con PBS (buffer fosfato salino) y despegadas del sustrato mediante disgregación enzimática empleando tripsina al 0,25 %, la misma que después del tiempo de incubación es inhibida por SFB (suero fetal bovino) presente en el medio de cultivo suplementado. Después de centrifugación se resuspendió nuevamente con medio de cultivo y luego una nueva centrifugación para la obtención el botón celular. Del mismo se separó una pequeña cantidad para la determinación de la viabilidad celular, dejando el resto para la determinación de la genotoxicidad.

Para determinar el porcentaje de viabilidad celular, se realizó el ensayo de doble tinción por Diacetato de fluoresceína (FDA)- Bromuro de Etidio (EtBr). Este procedimiento consiste en tomar 20 µl del botón celular con otros 20 µl de una solución de FDA (5 mg/ml) – EtBr (1 mg/ 5 ml). Esto da como resultado la visualización por fluorescencia de dos coloraciones en las células analizadas, donde las células rojas indican células muertas debido a que las células han sufrido una pérdida irreversible en la integridad de la membrana, mientras que la coloración verde en las células es indicativo de metabolización del FDA por células vivas.

La viabilidad celular se determinó a partir de la ecuación 2:

$$\% Viabilidad = \frac{\text{Número de células vivas}}{\text{Número de células totales}} * 100 \quad (2)$$



### 3.7 PRUEBA DE GENOTOXICIDAD ENSAYO DEL COMETA

El protocolo establecido para determinar el daño en el ADN, fue el ensayo cometa. El procedimiento a seguir para el mismo consistió en colocar sobre una placa portaobjetos una primera capa de agarosa de punto de fusión normal (NMP) (Invitrogen). Una vez seca, ésta es embebida con una segunda capa, esta vez de agarosa de bajo punto de fusión (LMP), misma que contiene las células expuestas al extracto orgánico de PM 2,5 de concentración de 0,1 m<sup>3</sup>/ml. Se finaliza con una última capa que contiene solamente (LMP), y una vez seco se coloca sobre la placa una lámina cubreobjetos, éste procedimiento fue realizado por cuadruplicado por cada proceso de siembra. Luego se sometió a lisis de membrana mediante buffer de alta concentración de sales y detergentes, por el tiempo mínimo de una hora para luego, en oscuridad y en frío, ser incubadas en un buffer de electroforesis a pH 13 por tiempo de 20 minutos.

Continuamente fueron sometidas a electroforesis horizontal (ánodo-cátodo) en condiciones de 25 Voltios, 300 mili Amperios por 20 minutos. Finalmente, las placas que contienen a las células son neutralizadas a pH 7,5 y después fueron deshidratadas para el análisis posterior, empleando como tinción por fluorescencia Bromuro de Etidio (1,5 g/ml). Se analizan 100 células por lámina junto con los diferentes parámetros del cometa mediante el software Comet Assay IV.

Se estableció que el daño celular se haría en base a lo establecido por (Carballo, y col, 2005), en el cual se consideran de 4 a 5 categorías de acuerdo a un rango establecido para el largo de cola del cometa clasificándolo en categorías, como se muestra a continuación:

- Rango (<20 micras) Daño Bajo Categoría 1
- Rango ( $\geq$ 20 <40 micras) Daño Medio Categoría 2
- Rango ( $\geq$ 40 <80 micras) Daño alto Categoría 3
- Rango (>80 micras) Totalmente dañadas Categoría 4

Para el análisis de resultados de genotoxicidad que abarca momento, intensidad y longitud de cola se empleó los programas Graphpad Prism 6.

## CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 CONCENTRACIÓN DEL MATERIAL PARTICULADO

Una vez culminado el monitoreo se procedió al análisis de la información recopilada, presentando en primer lugar un análisis gráfico donde se detallan las concentraciones media, máxima y mínima del PM 2,5 y su respectiva comparación con los valores de referencia establecidos en la NECAA, así como la estipulada por la OMS en el punto P1 ubicado en la calle Sangurima entre Benigno Malo y Luis Cordero, en el punto P2 ubicado en la Avenida de las Américas a la altura de la Basílica y el punto P3 ubicado de igual manera en la Avenida de las Américas pero a la altura del Edificio de Coralcentro.

La figura 11 presenta las concentraciones del PM 2,5 registradas en el punto P1, se observó que la concentración promedio fue de  $29,81 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , además se identificó una mínima de  $16,09 \mu\text{g}/\text{m}^3$  y una máxima de  $59,56 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , registradas en los meses de mayo, junio, octubre de 2018.

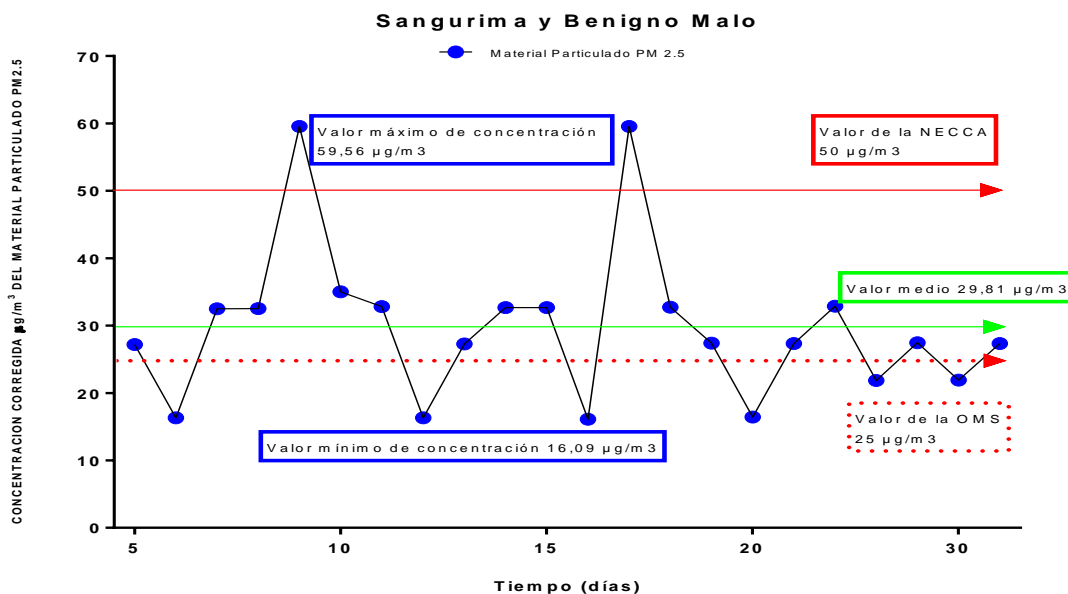


Figura 11. Concentración del material particulado PM 2,5, Punto 1, (Mayo, Junio y Octubre)

En la figura 12 respecto al punto P2, se obtuvo un rango de concentraciones entre  $5,44 \mu\text{g}/\text{m}^3$  para el valor mínimo y  $38,52 \mu\text{g}/\text{m}^3$  como máximo, así como una concentración promedio de  $19,93 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , este punto fue monitoreado durante los meses de julio y septiembre.

AV. AMÉRICAS - SECTOR BASILICA

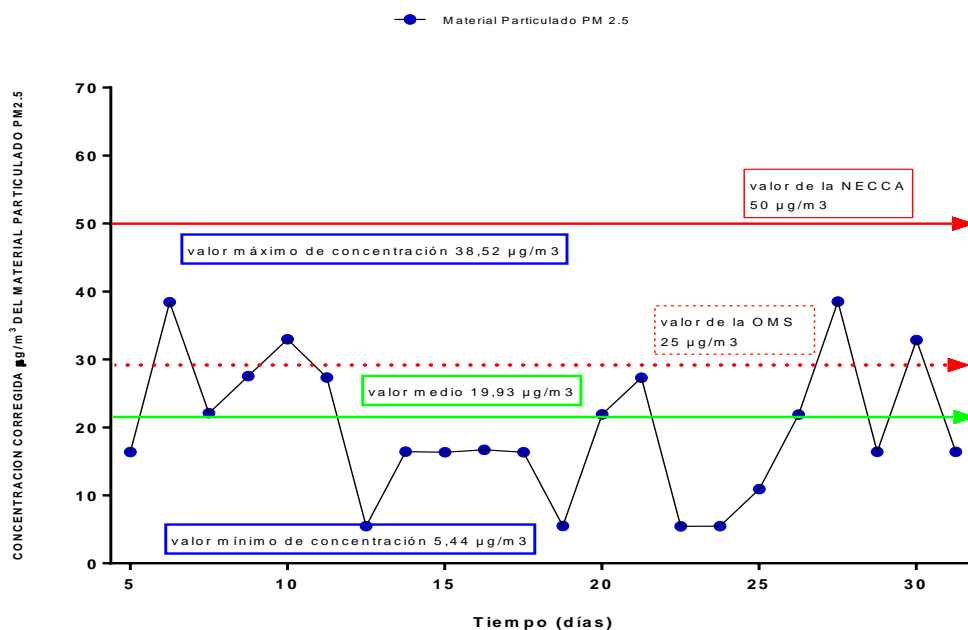


Figura 12. Concentración del material particulado PM 2,5, Punto 2, (Julio, Septiembre).

En el punto P3 ubicado en la Av. De las Américas sector Coralcentro, presentó una concentración promedio de 37,31 µg/m³ y valores mínimo y máximo de 16,20 µg/m³ y 60,13µg/m³ respectivamente durante los meses agosto y septiembre de 2018, representado en la figura 13.

Av. de las Américas - Sector Coralcentro

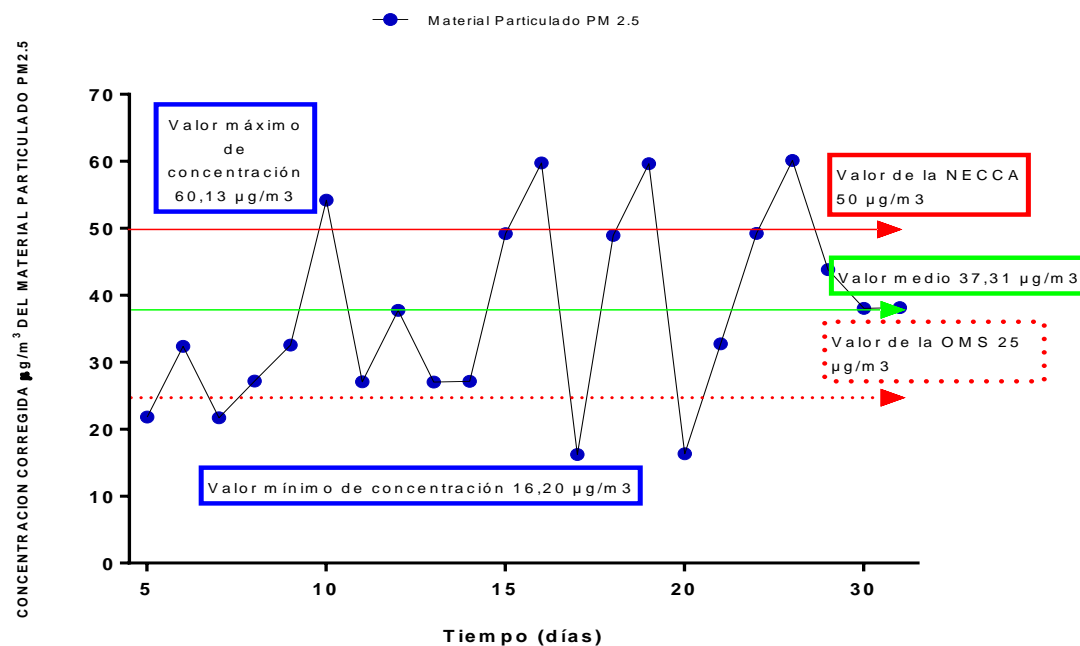


Figura 13. Concentración del material particulado PM 2,5, Punto 3, (Agosto, Septiembre).

Al comparar los datos obtenidos en el punto P1 con lo establecido en la NEECA se determinó que el 9,09 % de los valores obtenidos durante el período de monitoreo sobrepasa al valor establecido en la misma. De igual manera, al comparar con lo establecido en la OMS, el 72,72 % de los valores obtenidos durante el monitoreo sobrepasa el límite establecido. Para el punto P2, ningún valor sobrepasó el límite de la NEECA, sin embargo 31,81 % de los valores superan la OMS. Para P3 se tiene que el 18,18 % de los valores sobrepasa la NEECA, mientras que el 81,81 % supera lo recomendado por la guía de calidad del aire establecida por la OMS.

De lo antes expuesto se puede expresar que, aunque existen días (durante el monitoreo), en los cuales los valores sobrepasan el valor referencial de la concentración de PM 2,5 durante 24 horas que sugiere NECAA, no se puede aseverar un comportamiento alarmante ya que el percentil de los datos no supera el 98 % de la concentración por día para un monitoreo anual sugerido por la misma norma.

Es importante mencionar que al analizar los datos obtenidos en función de su ubicación, se observa que el punto localizado en el lugar más alto de los tres puntos de estudio es el punto P2 ubicado en la Avenida de las Américas Sector Basílica, aquí se identifica que ningún valor sobrepasa lo establecido por las NECCA, igual situación se repite en el estudio realizado por Opazo, 2001, al analizar las estaciones de monitoreo establece que aquellas estaciones que están ubicadas en lugares muy altos registran los niveles más bajos de contaminación, siendo la altura un factor que influye en la determinación de la presencia de material particulado.

Resulta importante contrastar este estudio, con el elaborado por (Pino, 2018), el cual reporta un histórico del número de días al año, en la ciudad de Quito en donde la concentración de PM 2,5 sobrepasa lo establecido por la NECAA en 1 día para el año 2014 y 0 días para el año 2016. Evidenciando la situación de la ciudad de Cuenca que, en un promedio de dos meses de muestreo, presenta 7 días de concentraciones superiores al valor límite.

Al realizar la comparación de los valores obtenidos en este estudio con las guías de calidad del aire de la OMS, la situación es diferente, debido a que existen valores en los puntos de monitoreo que sobrepasan la normativa, teniendo en un promedio de dos meses 20 días de concentraciones de PM 2,5 superior al valor límite, y aunque lo que expone esta guía es solo de manera orientativa en base a los estudios científicos basados en la protección de la salud, se ha constatado que la realidad en cada país es diferente, por ello cada uno de estos adopta su propia política de calidad del aire.

## 4.2 RELACIÓN ENTRE EL MATERIAL PARTICULADO PM 2,5 Y LAS CONDICIONES METEREOLÓGICAS

La información referida a las condiciones meteorológicas se registró durante la etapa de monitoreo realizada en el período comprendido entre 15/05/2018 - 29/10/2018.

Para determinar si existe o no relación directa de estas variables se realizó la figura de la concentración corregida del PM 2,5 de los tres puntos de monitoreo versus las condiciones meteorológicas humedad y temperatura del aire determinadas por el equipo empleado durante el estudio (figuras 14,15 y 16).

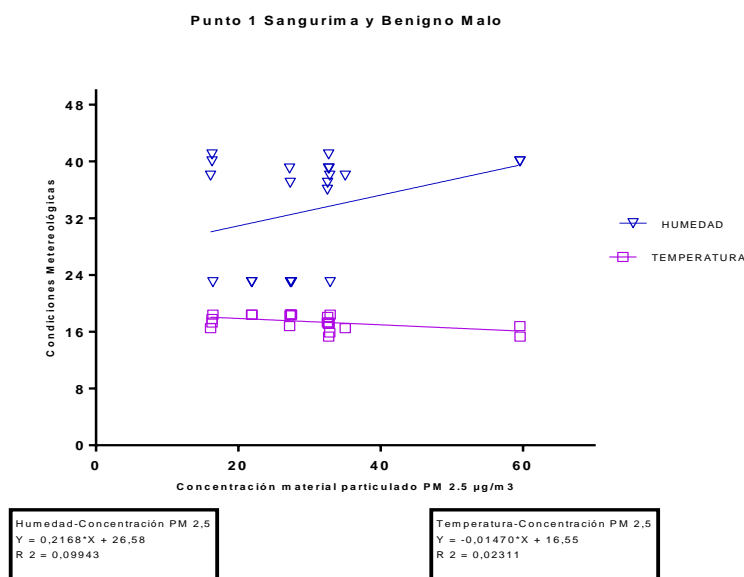
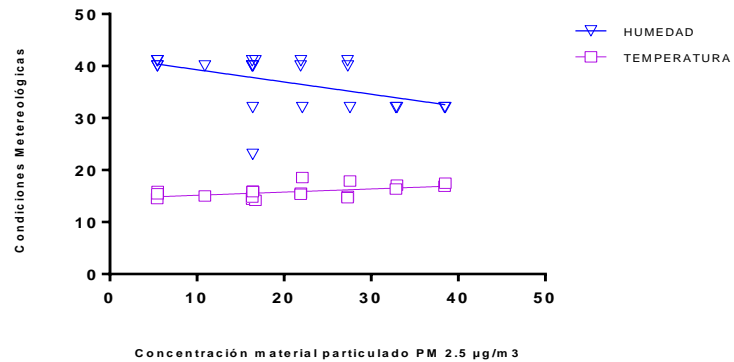


Figura 14. Variación de la concentración del material particulado PM 2,5 del punto P1 en función de las condiciones meteorológicas.

De la figura 14 se observa una tendencia no lineal entre las condiciones meteorológicas analizadas y la concentración corregida del PM 2,5, situación que se corrobora con los índices de correlación para las variables humedad y temperatura que tiene un valor de ( $R^2 = 0,099$ ) y ( $R^2 = 0,02$ ) respectivamente, resultando no significativo.

## Punto 2 Av. de las Américas Sector Basílica



$$\begin{aligned} &\text{Humedad-Concentración PM 2,5} \\ &Y = -0,2356 \cdot X + 41,65 \\ &R^2 = 0,2274 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} &\text{Temperatura -Concentración PM 2,5} \\ &Y = 0,06080 \cdot X + 14,55 \\ &R^2 = 0,2728 \end{aligned}$$

Figura 15. Variación de la concentración del material particulado PM 2,5, del punto P2 en función de las condiciones meteorológicas

De igual manera, al analizar los datos obtenidos en la figura 15 correspondiente al punto P2, se identifica que los índices de correlación para la variable de humedad fue de ( $R^2 = 0,2274$ ) y para la temperatura de ( $R^2 = 0,27$ ) determinando que existe una carente tendencia lineal de las variables, por lo tanto se establece que no existe relación entre la concentración corregida del PM 2,5 con las condiciones meteorológicas.

## Punto 3 Av. de las Américas - Sector Coralcentro

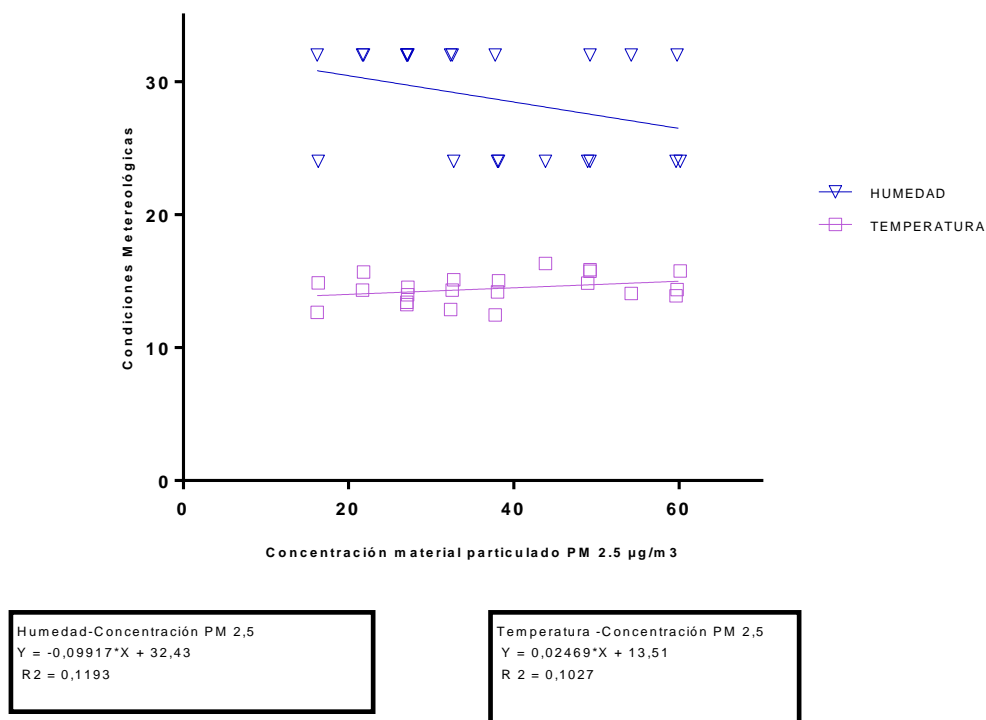


Figura 16. Variación de la concentración del material particulado PM 2,5 del punto P3 en función de las condiciones meteorológicas

Finalmente, en el análisis del punto P3 el cual se representa en la figura 16, se observa que al igual que en los puntos anteriores no existe una correlación lineal debido a que los índices obtenidos fueron de ( $R^2=0,11$ ) para la humedad y ( $R^2=0,10$ ) para la temperatura, lo cual permite identificar que no existe una relación directa entre la concentración corregida de material particulado PM 2,5 y las variables meteorológicas.

En el punto P1 ubicado en las calles Sangurima entre Benigno Malo y Luis Cordero se detectó: un valor promedio de 33,05 % para la humedad y para la temperatura se registró un valor promedio de 17,43 °C.

En el punto P2 ubicado en las calles Av. de las Américas - Sector Basílica para las condiciones de temperatura y humedad se determinó valores promedio de 15,75 °C y 36,95 % respectivamente.

Finalmente, en el punto P3 ubicado en la Av. de las Américas - Sector Coralcentro se registró una temperatura promedio de 14,42 °C y 28,73 % para la humedad.

Para el análisis estadístico efectuado se planteó un modelo de regresión lineal que se muestra en las figuras 14,15 y 16 en las que se evidencia que no fue posible realizar el ajuste en cuestión.

Con esta consideración, así como con la determinación del índice de correlación, se establece que las condiciones meteorológicas estudiadas en la zona geográfica monitoreada no tienen relación alguna con la concentración de PM 2,5.

Debido a la escasa información bibliográfica que relacione la concentración del PM 2,5 en la atmósfera con relación a las condiciones meteorológicas, se realiza una breve discusión de estudios similares existentes para el análisis de PM 10 en función del tiempo de análisis, y condiciones favorables para una acumulación de material particulado.

De acuerdo a los parámetros meteorológicos, es importante mencionar que se trabaja con la información registrada en el equipo que fue temperatura y humedad, y al comparar con el estudio realizado por Ramos, Bautista, & Valdez, 2010, llega a la conclusión de que los parámetros temperatura, humedad y velocidad del viento no tienen correlación alguna con la presencia de contaminantes tóxicos expresados en la concentración por día, lo que valida el análisis realizado.

El Informe de la Calidad del Aire de Cuenca del 2017, establece que los análisis de registros de calidad del aire en relación con los valores meteorológicos permiten entender el comportamiento de los contaminantes y la influencia de las condiciones climáticas. Poniendo a consideración que a bajas temperaturas la atmósfera presenta estabilidad impidiendo así la dispersión de estos compuestos.

Según el estudio realizado por la Empresa de Movilidad, Tránsito y Transporte de Cuenca, se identifica que la influencia de la temperatura sobre el PM 2,5 en un monitoreo continuo realizado desde el año 2015 en la estación ubicada en GAD Municipal de Cuenca, considera para tres días consecutivos del mes de septiembre, y establece que a las primeras horas de la mañana (06h00) al tener temperaturas climáticas bajas con valores de 7 °C y menor flujo vehicular, el valor de concentración del PM 2,5 es bajo, sin embargo este valor cambia a las 08h00, debido a que el tráfico automotor aumenta y por similares condiciones climáticas se impide la dispersión del material particulado lo cual facilita el aumento de la concentración, situación que no se repite al medio día ya que la temperatura ambiente es mayor a la del amanecer y a pesar del alto nivel de circulación a esas horas, ocurre un descenso de la concentración de PM 2,5 debido a que el material particulado con temperaturas elevadas se dispersa fácilmente. (Parra, 2018). Esta situación no permite la comparación con los tres puntos monitoreados porque se ha considerado: la diferencia de tiempos de monitoreo, el punto de toma de muestra y su variabilidad de flujo vehicular son diferentes al planteado en esta investigación.



### 4.3 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL MATERIAL PARTICULADO PM 2,5

La caracterización química, se llevó a cabo en el laboratorio de cromatografía de la Universidad Técnica Particular de Loja ver en el Anexo G.

Se realizó una corrida del patrón EPA 525 PAH MIX-A, 1X1ML, 500UG en el espectrómetro de masas del cromatógrafo marca AGILENT 6890n, en el software enhanced data analysis y por medio de la biblioteca, así como con los tiempos de retención obtenidos, se establece para cada HAPs los valores mostrados en la tabla 5.

Tabla 5. HAPs y tiempos retención

HAPS	TIEMPOS DE RETENCIÓN (s)
Acenaftileno	7,42
Fluoreno	8,37
Fenantreno	10,02
Antraceno	10,12
Pireno	12,95
Benzo (a) antraceno	10,12
Criseno	15,75
Benzo (b) fluoranteno	18,06
Benzo (k) fluoranteno	18,11
Benzo (a) pireno	18,82
Benzo (g,h,i) perileno	21,63
Indeno (1,2,3-CD) pireno	22,47

**Elaborado por:** Autora

Esta información también se puede observar en el Anexo C donde se encuentra el gráfico que fue obtenido con el software Enhanced Data Analysis que indica el cronograma del patrón.

La misma corrida de determinación analítica realizada para el patrón, se llevó a cabo con las muestras de los tres puntos monitoreados, el resultado obtenido se contrastó con los tiempos de retención encontrados y se determinó únicamente, la presencia del Benzo (a) Antraceno en el punto P1.

Para la cuantificación del Benzo(a)Antraceno, se utilizó como base, el método Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons descrito en el reporte entregado por UTP que consta en el Anexo G, mismo que indica que el límite de detección de las muestras analizadas es menor a 1 ppm.

Este proceso se llevó a cabo mediante la construcción de la curva de calibración que se observa en la figura 17, la cual contiene la variable de la respuesta instrumental del área de pico obtenida para cada una de las soluciones de concentraciones propuestas 5, 25 y 50 ppm preparadas a partir del patrón mencionado más el blanco respectivo, obteniéndose un índice de regresión de 0,9994 garantizando su linealidad y utilidad para el cálculo de la concentración del hidrocarburo aromático presente en el punto P1, que se resume en la tabla 6.

Figura 17. Curva de calibración del Benzo(a)Antraceno

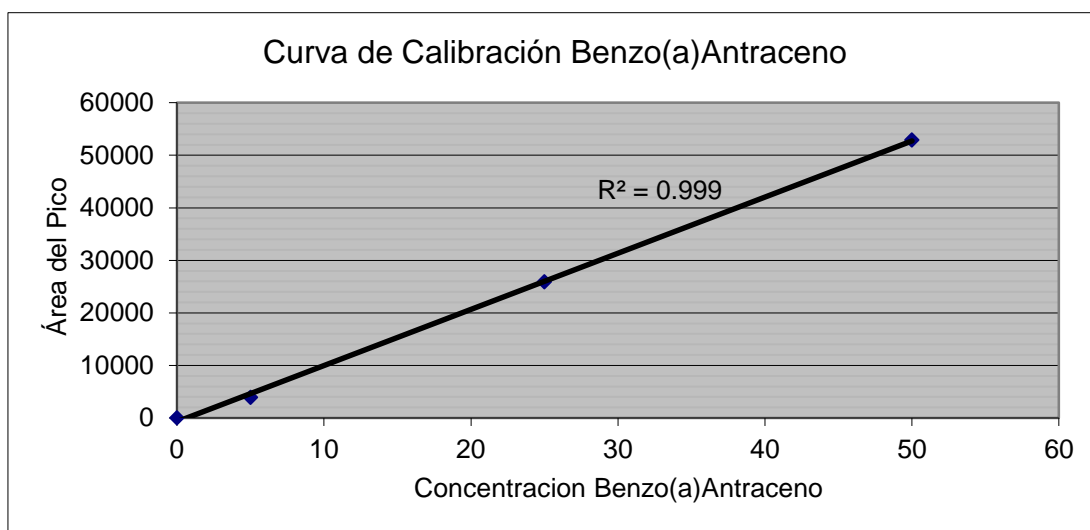


Tabla 6. Datos del Benzo(a)Antraceno

Concentración	TR	Área
0	0	0
5	15,657	3933
25	15,642	25906
50	15,653	52868

Con ayuda de la curva de calibración, la lectura del área bajo la curva del Punto P1, y de acuerdo al reporte emitido da como resultado una concentración para Benzo(a)Antraceno de 3,635 ppm.

El valor de la concentración expresada en ng/m<sup>3</sup> se realizó de la siguiente forma:

$$\begin{array}{cc} 3,635 \mu\text{g} & 1\text{ml} \\ X & 0,001\text{ml} \end{array}$$

$$X = 0,003635 \mu\text{g}$$

$$\begin{array}{r} 0,003635 \mu\text{g} \\ X \end{array} \quad \begin{array}{r} 192,06 \text{ m}^3 \\ 1 \text{ m}^3 \end{array}$$

$$X = 0,00001893 \mu\text{g}/\text{m}^3 \sim 0,01893 \text{ ng}/\text{m}^3$$

En la tabla 7. se determina el tiempo de retención, el área y la concentración del Benzo(a)Antraceno en el punto P1 expresada en ppm y en ng/m<sup>3</sup>.

Tabla 7. Concentración de Benzo(a)Antraceno en el punto P1

Muestra	HAPs	TR	área	Concentración ppm	Concentración en ng/m <sup>3</sup>
Cromatogram a Punto # 1	Benzo(a)Antra ceno	15,656	1698	3,635	0,01893

La cantidad de Benzo(a)Antraceno obtenida, se evaluó para determinar su toxicidad, mediante el Factor Equivalente de Toxicidad TEF (por sus siglas en inglés), mismo que tiene la función de determinar el potencial carcinogénico de cualquier Hidrocarburo Aromático Policíclico Carcinogénico (HAPc) (USEPA, 1993), derivándolo equivalentemente al factor relacionado como si fuera Benzo(a)Pireno.

Para determinar la Concentración Tóxica equivalente de Benzo(a)pireno se empleó la ecuación 3, y para el TEF se empleó la tabla 8.

$$\text{CTE} = \text{Cn} * \text{TEF} \quad (3)$$

Tabla 8. Factores de Toxicidad Equivalente (TEF) de los HAPs

HAPc	TEF
Benzo(a)pireno	1,0
Benzo(a)antraceno	0,1
Benzo(b)fluoranteno	0,1
Benzo(k) fluoranteno	0,01
Criseno	0,001
Dibenz(a,h)antraceno	1,0
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,1

**Fuente:** (USEPA, 1993)

Donde:

CTE= Concentración Tóxica Equivalente

Cn= Concentración del HAP en el particulado atmosférico

TEF= Factor de Equivalencia de Toxicidad correspondiente (0,1)

Por lo tanto:

$$CTE = 0,01893 * 0,1$$

$$CTE = 0,001893 \text{ ng/m}^3$$

El valor obtenido de la Concentración Tóxica equivalente de Benzo(a)Pireno es  $0,001893 \text{ ng/m}^3$  evidenciando que la presencia de este HAPs en el ambiente es baja, por lo que sugiere que el riesgo para la salud de los habitantes es mínimo, ya que el valor límite propuesto por la Comisión Europea en el 2001 establece que es  $1 \text{ ng/m}^3$  (Comisión Europea, 2001).

Para esta determinación, el ensayo se desarrolló mediante el contraste a los tiempos de retención de cada compuesto presente en el patrón, siguiendo una técnica de cromatografía gaseosa acoplada a masas, técnica empleada también por el Programa de Vigilancia y Caracterización de Compuestos Tóxicos en la Atmósfera de Chile en 2018, así como Caballero & Alvarado 2006.

Sin embargo el estudio realizado por Herrera & Chávez, 2012 establece que la identificación de HAPs se puede también determinar por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés) debido a que este procedimiento cuenta con límites de detección incluso más bajos que la técnica gaseosa, establece que el trabajo realizado por el espectrómetro de masas

permite discriminar la presencia de los HAPs independiente de su concentración, y al no tener la presencia de los compuestos propuestos, salvo el Benzo(a)Antraceno, no se tendría problema alguno por una omisión debido a los bajos límites de detección.

#### 4.4 VIABILIDAD DE LA SOLUCIÓN ORGÁNICA DE PM 2,5 EN LA LINEA CELULAR CHO-K1

Como se detalló en párrafos anteriores previo a la detección de la genotoxicidad es necesario realizar la evaluación de la actividad citotóxica, la cual va a determinar si la concentración de la fracción orgánica PM 2,5 a las que fueron expuestas las células puedan sobrevivir, por ello se aplica el test de viabilidad celular mediante el ensayo de doble tinción FDA Diacetato de Fluroescéina-Bromuro de Etidio BrEt, para así poder demostrar que el potencial citotóxico, no está interviniendo en el efecto genotóxico.

La tinción se llevó a cabo en las placas de agarosa que contenían células CHO-K1 desarrolladas en el medio HAM-F12, con una concentración de la solución orgánica de 0,1 m<sup>3</sup>/ml para los puntos de muestreo, un control negativo sin ningún adicional, un blanco con Dimetil Sulfóxido (DMSO) y un control positivo con una solución 2 µmol de doxorrubicina (compuesto químico que causa el daño celular), este ensayo se realizó por cuadruplicado.

El resultado del conteo de células vivas se realizó con la ayuda del microscopio, como se muestra en la tabla 9 los porcentajes de viabilidad de las células CHO - K1 expuestas a una concentración de 0,1 m<sup>3</sup>/ml de la fracción orgánica de material particulado PM 2,5 fue adecuado, debido a que ninguno presentó viabilidad inferior al 70 %, y de esta manera se prosigue un estudio genotóxico con menor riesgo de una mala interpretación de datos.

Tabla 9. Resultado del conteo de células vivas

MUESTRA	Control Negativo	Blanco	Punto de muestreo P1	Punto de muestreo P2	Punto de muestreo P3	Control Positivo
Réplica 1	186	198	197	195	199	170
Réplica 2	194	196	195	192	193	190
Réplica 3	187	199	194	197	191	186
Réplica 4	197	198	196	194	193	177

Los resultados del conteo de células vivas muestran que tanto en el blanco como en el control negativo existen como máximo alrededor de 200 unidades, este valor se toma como base para el cálculo de los porcentajes de viabilidad y se muestran en la tabla 10 y las figuras 18, 19, 20.

Donde se observa que el porcentaje de viabilidad obtenido en cada punto en las cuatro réplicas efectuadas, son superiores al 90 %, teniendo una adecuada probabilidad de que el daño citotóxico no interferirá sobre el genotóxico, esto se complementa en el Anexo D, donde se detalla el tratamiento estadístico de los resultados obtenidos, aplicados a la prueba no paramétrica Oneway, de varianza de Kruskal Wallis, y el posterior análisis de comparación múltiple de Dunns en los tres puntos de monitoreo, en donde indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados en los tres puntos de estudio ( $P < 0,05$ ).

Tabla 10. Porcentaje de Viabilidad Celular

MUESTRA	Control Negativo	Blanco	Punto de muestreo P1	Punto de muestreo P2	Punto de muestreo P3	Control Positivo
Réplica 1	93	99	98,5	97,5	99,5	85
Réplica 2	97	98	97,5	96	96,5	95
Réplica 3	93,5	99,5	97	98,5	95,5	93
Réplica 4	98,5	99	98	97	96,5	88,5

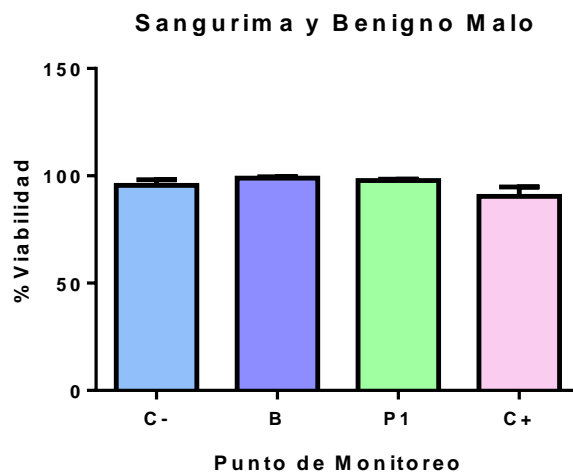


Figura 18. Porcentaje de Viabilidad Celular en el Punto 1

**Av. de las Américas - Sector Basílica**

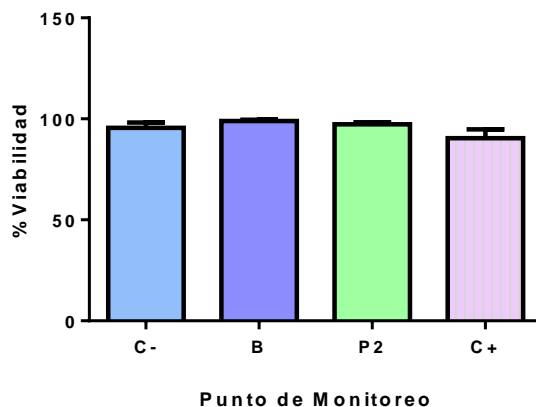


Figura 19. Porcentaje de Viabilidad Celular en el Punto 2

**Av. de las Américas - Sector Coralcentro**

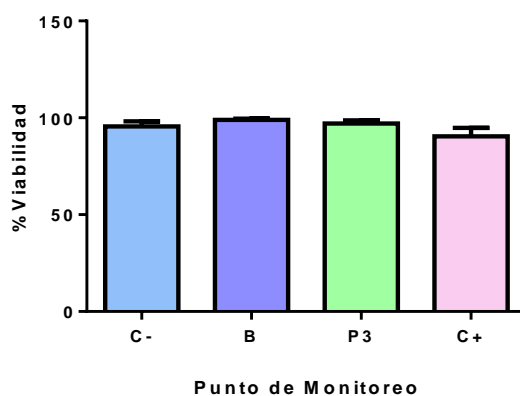


Figura 20. Porcentaje de Viabilidad Celular en el Punto 3

En la tabla 11 se detalla el porcentaje de viabilidad promedio de las células con la concentración de 0,1 m<sup>3</sup>/ml en los tres puntos de estudio, así como los valores para el control negativo, blanco, y control positivo, con su respectiva desviación estándar.

Tabla 11. Valor medio del porcentaje de Viabilidad

Porcentaje de Viabilidad					
Control negativo	Blanco	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Control Positivo
95,5 ± 0,67	98,88 ± 0,62	97,75 ± 0,64	97,25 ± 1,04	97 ± 1,73	90,38 ± 4,49

Analizando los datos del porcentaje de viabilidad mostrados en la tabla 11, se establece que los mismos se encuentran muy próximos al comportamiento medio distal de la muestra, por ende, los valores no varían significativamente dando como resultado representatividad.

Como se muestra en la figura 18 los resultados obtenidos permiten determinar que existe diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) en el punto de estudio P1 que fue tratado a una concentración  $0,1 \text{ m}^3/\text{ml}$ , según se detalla en el análisis estadístico Kruskal-Wallis en donde el valor de P fue menor a 0,05, obteniéndose un valor de 0,0016 indicando que existe una diferencia significativa entre el punto P1 y el blanco (solo células).

Así también en la figura 19, según el análisis estadístico Kruskal-Wallis el valor de P fue menor a 0,05, obteniéndose un valor de 0,0019 en el punto P2, indicando de esta manera que existe una diferencia significativa entre este punto y el blanco (solo células).

Finalmente, en la figura 20, según el análisis estadístico Kruskal-Wallis indica que en el punto P3 el valor de P obtenido fue de 0,007 indicando significancia, debido a que ( $P < 0,05$ ).

De lo expuesto se corrobora que en los tres puntos existe diferencia significativa con respecto al blanco, además los valores medios de los puntos P1, P2 y P3 fueron de 97,75 %, 97,25 % y 97 % respectivamente, demostrando que no existe daño citotóxico

De igual forma en la investigación realizada por Quijano & Meléndez, 2014, determinó que la viabilidad celular se mantenía por encima del 95 %, por lo que se puede demostrar que el daño en el ADN que sufren las células es debido a la exposición de las concentraciones y no a factores que conducen a la muerte celular, por otra parte Gutiérrez, 2014 establece que al obtener un porcentaje inferior al 70 % puede producir que los valores de genotoxicidad encontrados por el ensayo cometa se incrementen por un efecto de las células muertas y no por la genotoxicidad propia del compuesto. De esta manera, se observa que la media del porcentaje de viabilidad obtenida en los tres puntos de monitoreo, es adecuado para poder realizar el ensayo genotóxico, sin interferencias por citotoxicidad.

#### **4.5 LARGO DE COLA CON EL EXTRACTO ORGÁNICO DEL MATERIAL PARTICULADO 2,5**

El daño en el ADN de las células CHO-K1, en relación al largo de cola del cometa se muestran en las figuras 21,22,23 mismas que muestran el comportamiento de los datos al ser sometidos al análisis estadístico respectivo. Dichas figuras están referidas a la longitud de la cola del blanco de experimentación, puntos de monitoreo, controles positivos y negativos.



## EXTRACTO ORGÁNICO PM 2,5 - SANGURIMA Y BENIGNO MALO

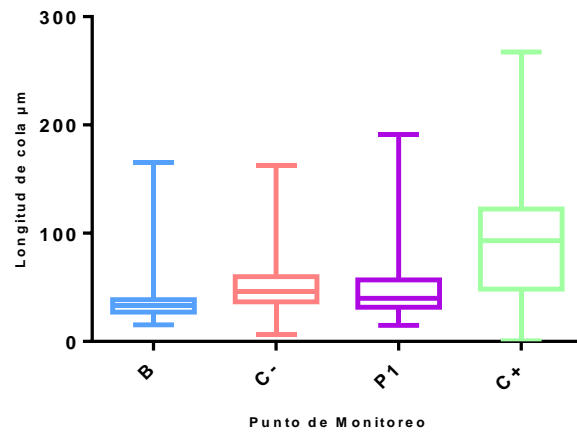


Figura 21. Efecto genotóxico – largo de cola Punto P1

## EXTRACTO ORGÁNICO PM 2,5 - AV. DE LAS AMÉRICAS SECTOR BASILICA

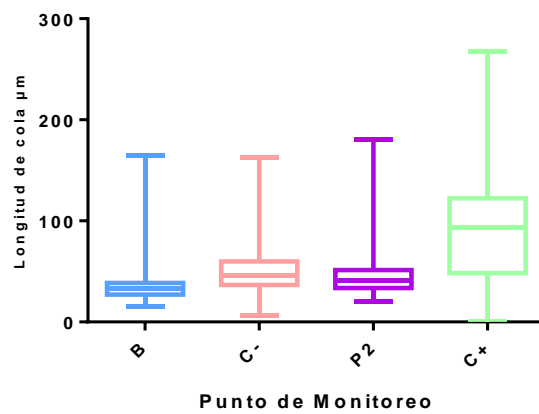


Figura 22. Efecto genotóxico – largo de cola Punto P2

## EXTRACTO ORGÁNICO PM 2,5 - AV. DE LAS AMÉRICAS SECTOR CORALCENTRO

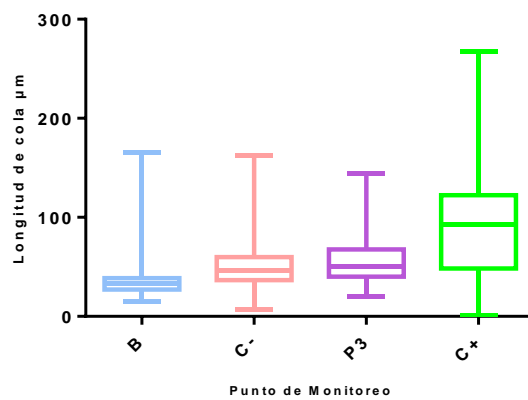


Figura 23. Efecto genotóxico – largo de cola Punto P3

De las figuras 21, 22 y 23, se puede observar en primera instancia, que el tamaño del largo de cola analizada en cada punto monitoreado, aumenta al compararse con el blanco de la experimentación, así también al realizar la comparación entre el control positivo y el blanco, se evidencia que existe un gran incremento en el tamaño, resultado que requiere complementarse con el tratamiento estadístico pertinente.

Para expresar con certeza la relación entre los datos obtenidos, se realizó el análisis estadístico respectivo, con el objetivo de verificar la existencia o no de la significancia al comparar los puntos monitoreados y el blanco pertenecientes a la longitud de cola. Los ensayos aplicados fueron el Test de Kruskal-Wallis y post test de Dunnett realizados en el software GraphPad Prism 6 para la dosis 0,1 mg/ml, donde se obtuvo que las variables evaluadas presentan diferencias significativas con respecto al blanco, con un valor de significación asintótica inferior a 0.05 obteniéndose un valor de P para los puntos P1, P2, P3 < 0,0001.

A pesar de la existencia del daño genotóxico en todos los puntos, resulta importante mencionar que la misma no es atribuible al compuesto encontrado en las muestras analizadas por cromatografía gaseosa, esto porque en el punto P1 se determinó un Hidrocarburo Aromático Policíclico de los cuatro propuestos, y fue el Benzo(a)Antraceno, que se encuentra presente con una concentración de B(a)P eq 0,001893 ng/m<sup>3</sup>, valor que se encuentra por debajo del límite propuesto por la Comisión Europea (Vargas, y col, 2013).

En el trabajo realizado por Barrera, 2018, se tuvo como resultado la diferencia significativa de la longitud de cola al realizar el análisis genotóxico de los habitantes del sur de la ciudad de Cuenca, quienes por motivos de residencia, o desarrollo de actividades económicas habitan en esta zona que es caracterizada por una alta concentración de PM 2,5 concluyendo que la exposición a altas concentraciones de dicho material particulado, causa daño en el ADN incrementando el riesgo de padecer cáncer. Puesto que por el análisis de este mismo parámetro la diferencia significativa revela un impacto a la salud de la población que requiere de atención.

La determinación de la existencia o inexistencia del daño genotóxico se lo pudo establecer por medio del análisis estadístico de la longitud de cola, igual que lo realizado por Meléndez, Quinteros & Quijano, 2016, el cual establece que los compuestos químicos presentes en el PM 2,5 tienen efecto mutagénico y genotóxico sobre las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium* y en linfocitos de sangre, de experiencias como estas se aprecia que el ensayo cometa puede realizarse con cualquier tipo de células eucariotas en general, como lo desarrollado por Betancur, 2016; el cual evalúa el daño genotóxico realizado en células como las propuestas en esta investigación las CHO K1 y Jurkat, en donde los resultados obtenidos exhiben que el material PM 2,5 analizado en tres puntos monitoreados en el Valle de Aburra, tienen potencial genotóxico y puede inducir desarrollo de cáncer. Las experiencias mencionadas

orientan a la veracidad de los datos obtenidos en el estudio, ya que al trabajar con células eucariotas se obtienen resultados precisos.

#### 4.6 MOMENTO DE COLA CON EL EXTRACTO ORGÁNICO DEL MATERIAL PARTICULADO 2,5

EXTRACTO ORGÁNICO PM 2,5 - SANGURIMA Y BENIGNO MALO

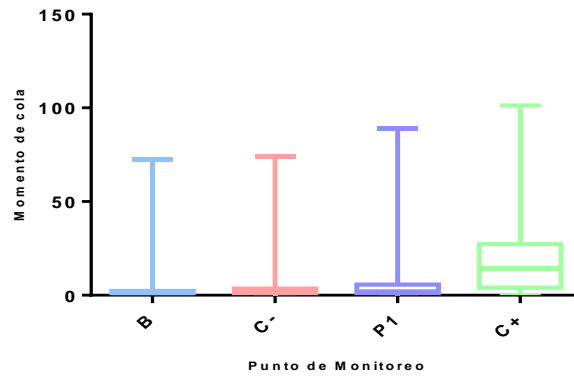


Figura 24. Efecto genotóxico – momento de cola Punto P1

EXTRACTO ORGÁNICO PM 2,5 - AV. DE LAS AMÉRICAS SECTOR BASILICA

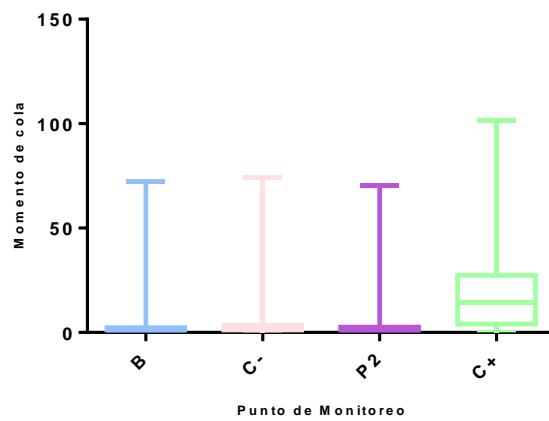


Figura 25. Efecto genotóxico – momento de cola Punto P2

## EXTRACTO ORGÁNICO PM 2.5 - AV. DE LAS AMÉRICAS SECTOR CORALCENTRO

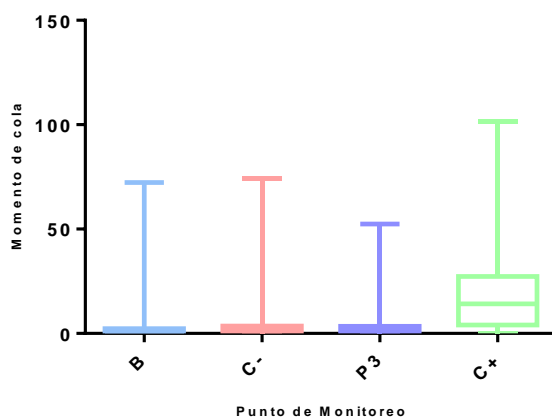


Figura 26. Efecto genotóxico – momento de cola Punto P3

Las figuras 24 y 26, muestran una variación del factor momento, sin embargo, en la figura 25 no es posible apreciar tal variación. Esto ocurrió al comparar el momento de cola del blanco de experimentación con los puntos de monitoreo. Por ello, para completar el análisis y tener resultados adecuados se recurre al trabajo con herramientas estadísticas que permitan, expresar conclusiones certeras de los resultados obtenidos.

Con el análisis estadístico, es posible establecer la significancia entre los puntos monitoreados respecto al blanco perteneciente a los datos obtenidos para el momento de cola. Las herramientas utilizadas fueron el Test de Kruskal-Wallis y post test de Dunnett realizados en el software GraphPad Prism 6 para la dosis 0,1 m<sup>3</sup>/ml. De este procesamiento se determinó que existe diferencia significativa para dos de las variables analizadas, debido a que en los puntos P1 y P3 se obtuvo un valor de  $P < 0,0001$ . Sin embargo, para el punto P2 se obtuvo un valor de  $P = 0.4919$  no demostrando significancia alguna.

Pese a que la diferencia significativa nos sugiere la existencia del daño genotóxico en los puntos P1 y P3, es importante nuevamente mencionar que el mismo no es atribuible al compuesto encontrado en las muestras analizadas por cromatografía gaseosa.

El análisis de momento de cola resultaría ser un parámetro no relevante, según la investigación realizada por Schnurstein y Braunbeck. Donde manifiesta que existe una mayor sensibilidad de demostración del daño genotóxico, al comparar las diferencias significativas de los parámetros de momento de cola y longitud de cola, siendo este último quien da mejores respuestas (Schnurstein & Braunbeck, 2001). Así mismo por la revisión literaria establecida por Zúñiga, concluye que el momento de cola no resulta apropiado, ya que investigadores que lo emplean con unidades de medida difieren entre sí, de acuerdo a sus consideraciones, de igual manera ocurre con los procesos de calibración del análisis.

La inexistencia de diferencia significativa en el punto P2 reflejaría la ausencia de un daño genotóxico, pero al conocer experiencias similares como las ya detalladas no es posible descartar este impacto del material particulado sobre el material genético analizado

#### 4.7 INTENSIDAD DE COLA CON EL EXTRACTO ORGÁNICO DEL MATERIAL PARTICULADO 2,5

Para analizar el factor intensidad de cola, se utilizaron las figuras 27,28 y 29. En estas se identificó que solamente la figura 27 presenta variación al comparar la intensidad de cola del blanco de experimentación con el punto P1. Situación que no se replicó en las figuras 28 y 29 debido a que éstas no presentaron variación alguna

EXTRACTO ORGÁNICO PM 2,5 - SANGURIMA Y BENIGNO MALO

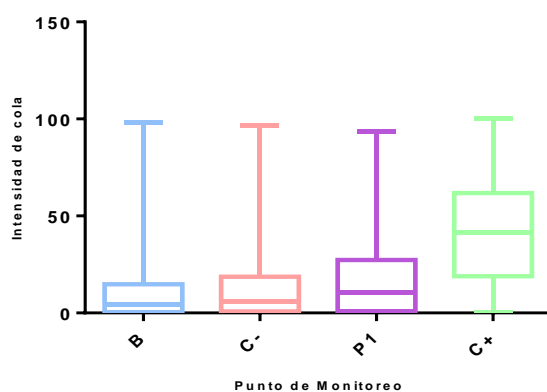


Figura 27. Efecto genotóxico – intensidad de cola Punto P1

EXTRACTO ORGÁNICO PM 2,5 - AV. DE LAS AMÉRICAS SECTOR BASILICA

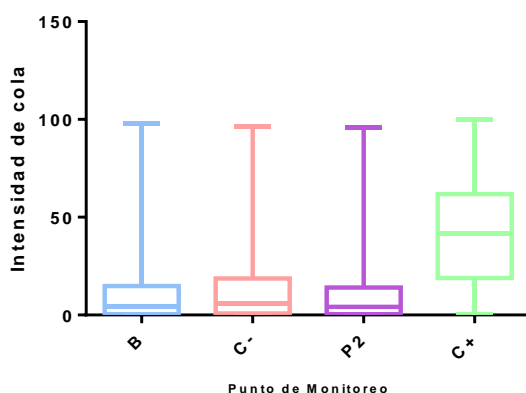


Figura 28. Efecto genotóxico – intensidad de cola Punto P2

## EXTRACTO ORGÁNICO PM 2,5 - AV. DE LAS AMÉRICAS SECTOR CORALCENTRO

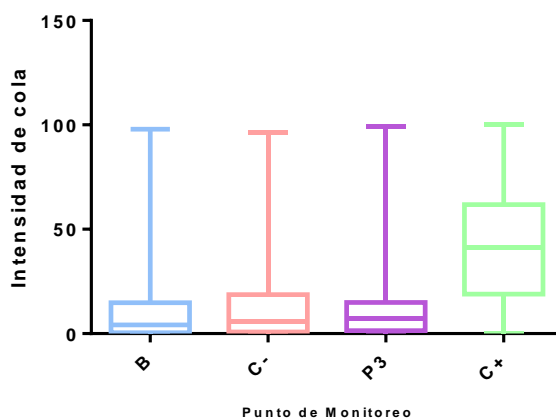


Figura 29. Efecto genotóxico – intensidad de cola Punto P3

No obstante, para poder realizar un análisis de mayor profundidad, es indispensable procesar los datos y así tener una adecuada interpretación de los resultados. El procedimiento realizado fue igual que los dos factores anteriores, puesto que también se utilizó el Test de Kruskal-Wallis y post test de Dunnett realizados en el software GraphPad Prism 6 para la dosis 0,1 m<sup>3</sup>/ml, mismo que facilitó la verificación de la existencia o no de significancia entre los puntos monitoreados respecto al blanco en función de la intensidad de cola.

En donde la existencia del daño genotóxico se presentó fue únicamente en el punto P1, es imperante demostrar que este resultado no es atribuible al compuesto encontrado en las muestras analizadas por cromatografía gaseosa. De este procesamiento se determinó que existe diferencia significativa para una de las variables analizadas, esto fue identificado en el punto P1 con un valor de  $P=0,0003$ . Sin embargo, para los puntos P2 y P3 se obtuvieron valores de  $P > 0,9999$  y de 0,2295 respectivamente no demostrando significancia alguna.

La intensidad de cola, es un parámetro que se calcula en base a una proporción entre la luz emitida por la cola y la intensidad total del cometa (cabeza y cola) (Rueda, 2016), por lo que se convierte en un valor dependiente de la longitud formada por migración del material genético de acuerdo a la comparación de los parámetros de análisis de genotoxicidad. Para el ensayo cometa establecido por (Sunjog, y col, 2013) determina que tanto la intensidad como el momento de cola son parámetros donde se obtienen valores similares ante la evaluación de la existencia del daño, pero los valores de diferencia significativa estadística son menos precisos que los de longitud de cola (Sunjon, y col, 2013). Por esta consideración al igual que el presentado en el parámetro de momento analizado anteriormente, no se puede descartar el daño existente en P2 y P3.

## CAPITULO V

### 5.1 CONCLUSIONES

- Del monitoreo realizado en esta investigación se determinó que la concentración de PM 2,5 presente en dos de los tres puntos evaluados sobrepasa los límites establecidos por la OMS.
- La cuantificación de los HAPs presentes en las muestras del estudio, realizado por medio del análisis en cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas, determinó la presencia, en un solo punto monitoreado, del Benzo(a)Antraceno en concentración por debajo del límite establecido por la Comisión Europea.
- Las pruebas de viabilidad celular y el ensayo cometa son complementarias puesto que permiten determinar con certeza, que no existe daño genético del material particulado PM 2,5.
- El análisis estadístico de los resultados obtenidos en el ensayo cometa, demuestra que existe diferencia significativa entre el blanco y las concentraciones de los puntos de monitoreo, determinando así que las muestras de aire evaluadas causan daño genotóxico.

### 5.2 RECOMENDACIONES

- Se debe considerar que las autoridades desarrollen planes de mejoramiento de la calidad del aire de la ciudad, ya que la OMS solamente dicta una guía, por lo que resultaría importante implementar una normativa nacional de acuerdo a la realidad del país.
- Se debe continuar con el monitoreo por un tiempo más prolongado, de esa manera se podrá obtener una base de datos más amplia la cual permitirá realizar comparaciones con respecto a estaciones climáticas, inclusión de nuevos transportes, entre otros.
- El estudio de identificación de los HAPs, se centró en cuatro de éstos que se encuentran presentes en la mayoría de estudios de alcances similares. Y de acuerdo a lo obtenido en este estudio, el daño genotóxico no obedece a los compuestos estudiados. Por lo que se recomienda extender el estudio alineado con lo establecido en la IARC, misma que abarca a 16 HAPs considerados como genotóxicos, mutagénicos y/o carcinogénicos.

## Bibliografía

- Adonis, M., & Gil, L. (s.f.). Toxicogenómica: una nueva disciplina para evaluar el riesgo de la contaminación ambiental. *Laboratorio de Bioquímica y Toxicología Ambiental, ICBMA*.
- Agudo, A. (2010). *Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP). Acercamiento a su problemática como riesgo laboral*. Madrid: UGT Comisión Ejecutiva Confederal.
- Aiassa, D., Mañas, F., & Bosch, B. (2012). Biomarcadores de daño genético en poblaciones humanas expuestas a plaguicidas. *Acta Biológica Colombiana*, 485-510.
- Albers, P. (1995). *Handbook of Ecotoxicology*. Lewis Publisher, Boca Raton, 330-355.
- Aldunate, P., Paz, O., & Halvorsen, K. (2006). Los efectos de la contaminación atmosférica por PM10 sobre la salud ciudad de La Paz-Bolivia. *Acta Nova*, 422-442.
- Alvarado, G. (2010). *Estudio integrado de factores que influyen sobre la contaminación atmosférica pro material particulado respirable de Pudahuel*. Santiago: Universidad de Chile. *Antecedentes*. (octubre 11, 2017). Obtenido de Trabajo de Fin de Máster TQA: <http://bibing.us.es/proyectos/abreproy/70277/fichero/2-Antecedentes%252FAntecedentes.pdf>
- Arango, S. (2011). Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*, 75-82.
- Arias, J. (2015). *Evaluación genotóxica de un extracto butanólico de Agave brittoniana T subsp. brachypus en ratones balb/c*. Santa Clara.
- Argumedo, C., & Castillo, J. (2016). Caracterización química de material particulado PM10 en la atmósfera de la Guajira, Colombia. *Rev. Colomb. Quím.*, 19-29.
- Astudillo, A. (2014). *Estudio de genotoxicidad del material particulado (PM10) de la zonal urbana del cantón Cuenca*. Cuenca.
- Atkinson, A., Colburn, W., DeGruttola, V., DeMets, D., Downing, G., & Hoth, D. (2000). Biomarkerr and surrogate endopints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Therap*, 89-95.
- ATSDR. (agosto, 1995). *Resumen de Salud Pública (Hidrocarburos aromáticos Policíclicos (HAP=)*. Obtenido de Toxicología: [https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs69.pdf](https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs69.pdf)
- Barrera, D. (2018). Evaluación del daño genotóxico mediante ensayo de cometa en población expuesta a material particulado MP 2.5 en la zona Sur de la ciudad de Cuenca - Ecuador. Loja: Universidad Técnica Particular de Loja.
- Barrera, P. (noviembre 10, 2017). *Maquinaria de reparación del DNA*. Obtenido de <https://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/427/446>
- Bermeo, H. (2013). *Proyecto: Dipecho VII*. Obtenido de Implementación de la metodología de análisis de vulnerabilidades a nivel cantonal- Cuenca: <http://repositorio.cedia.org.ec/bitstream/123456789/842/1/Perfil%20territorial%20CUENCA.pdf>
- Bernal, M. (2014). *Nueva ruralidad, vinculos campo-ciudad: El caso del cantón Cuenca periodo 2000-2010*.
- Bentancour, A. (2016). *Evaluación de la citotoxicidad y gentoxicidad del material quimico en filtros PM 2.5 de las estaciones de monitoreo de la red de calidad del aire del Valle de Aburrá*. Medellín: Universidad Nacioanal de Colombia sede Medellín.



- Billet, S., Garçon, G., Dagher, Z., Verdin, A., Ledoux, F., Cazier, F., . . . Shirali, P. (2007). Ambient particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) physicochemical characterization and metabolic activation of the organic fraction in human lung epithelial cells (A549). *Environmental Research*, 212-223.
- Borrás, E. (2013). *Caracterización de material particulado atmosférico generado en reactores fotoquímicos y procedentes de muestras ambientales*. Valencia.
- Brown, D., Wilson, M., MacNee, W., Stone, V., & Donaldson, K. (2001). Size-dependent pro inflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 191-199.
- Brunekreef, B., & Holgate, S. (2002). Air pollution and health. *Lancet*, 1233-1242.
- Brunekreef, B., Janssen, N., Harssema, H., Knape, M., & Vliet, P. (1997). Air Pollution from truck traffic and lung function in children living near motorways. *Epidemiology*, 8.
- Brunmark, A., & Cadenas, E. (1989). Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. *Free Radical Biology & Medicine*, 435-477.
- Burriel, V. (octubre 17, 2017). *Estructura y propiedades de los ácidos nucleicos*. Obtenido de Universitat de València: [https://www.uv.es/tunon/pdf\\_doc/AcidosNucleicos\\_veronica.pdf](https://www.uv.es/tunon/pdf_doc/AcidosNucleicos_veronica.pdf)
- Caballero, S., & Alvarado, D. (2006). *Análisis y determinación de la concentración de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) contenidos en el material particulado respirable (PM<sub>10</sub>) en la localidad de puente aranda de Bogotá en la zona de alta actividad industrial y alto flujo vehicular*. Bogotá D.C.: Universidad de la Salle.
- Cáceres, D. (2015). *Evaluación de los efectos agudos en la función pulmonar por exposición a material particulado fino (PM<sub>2.5</sub>) en niños que viven próximos a una playa masivamente contaminada con relaves mineros, Chañaral, Chile*. Barcelona.
- Cajaraville, M. (diciembre 1, 2017). *Environmental Quality Assessment*. Obtenido de <http://www.ehu.eus/europeanclass2003/miren1.pdf>
- Campos, J., & Palomo, I. (2009). *Polución aérea y estado protrombótico*.
- Carballo, M., Cortada, C., & Gadano, A. (2005). Riesgos y beneficios en el consumo de plantas medicinales. *Theoria*, 95-108.
- Carmona, F. (2013). *Estudio de las alteraciones en la metilación del ADN en progresión tumoral*. Madrid.
- Chen, L., & Lippmann, M. (2009). Effects of metals within ambient air particulate matter (PM) human health. *Inhal. Toxicol.*, 1-31.
- Colling, A. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. Principales, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.*, 249-259.
- Collins, A. (1999). Oxidative DNA damage, antioxidants and cancer. *BioEssays*, 183-193.
- Comer, J., Kleinstreuer, C., & Zhang, Z. (2001). *Flow structure and particles deposition patterns in double-bifurcation airway models, Part 1 y 2*. J. of Fluid Mechanics.
- Comisión Europea. (2001). *Comisión Europea*. Luxembourg: Office for Official Publications of the Europea Communities. Obtenido [http://ec.europa.eu/environment/air/pdf/pp\\_pah.pdf](http://ec.europa.eu/environment/air/pdf/pp_pah.pdf)
- Comisión Nacional del Medio Ambiente República de Chile. (10 de Agosto de 2009). *Resolución Exenta N°4624*. Obtenido de [http://www.sinia.cl/1292/articles-46479\\_anteproyecto.pdf](http://www.sinia.cl/1292/articles-46479_anteproyecto.pdf)

- Construmática. (agosto 30, 2017). Obtenido de [http://www.construmatica.com/construpedia/Contaminantes.\\_Seguridad\\_y\\_Salud\\_Laboral](http://www.construmatica.com/construpedia/Contaminantes._Seguridad_y_Salud_Laboral)
- Cooke, M., Evans, M., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.*, 1195-1224.
- CORPAIRE. (2006). *Emisiones anuales PM10 en:Inventario de emisiones del Distrito Metropolitano de Quito 2003*. Quito- Ecuador.
- Csavina, J., Field, J., Taylor, M., Gao, S., Landazuri, A., & Betterton, E. (2012). A review on the importance of metals and metalloids in atmospheric dust and aerosol from mining operations. *Sci Total Environ*, 58-73.
- CUENCAIRE. (2009). *Informe de resultados de la red de monitoreo de la calidad de aire de Cuenca*.(mayo 21, 2017) Obtenido de [http://gis.uazuay.edu.ec/ierse/links\\_doc\\_contaminantes/Informes%20Claudia%20Calidad%20del%20Aire/Informe%20Calidad%20del%20Aire%202009.pdf](http://gis.uazuay.edu.ec/ierse/links_doc_contaminantes/Informes%20Claudia%20Calidad%20del%20Aire/Informe%20Calidad%20del%20Aire%202009.pdf)
- De la Cruz, E., & Huaman, J. (2002). *Formación de Hidrocarburos aromáticos policíclicos y del 3,4-Benzopireno en aceites comestibles alterdos pro recalentamiento*. Lima-Perú.
- Díaz, C., Urrego, J., Rojas, N., Rodriguez, A., & Prieto, E. (2013). Cuantificación de hidrocarburos policiclicos aromáticos urinarios en policías de tránsito del área metropolitana de Bogotá. *Rev. Salud pública*, 237-246.
- Dockery, D., & Pope, A. (1996). Epidemiology of acute health effects:Summary of time-series studies.Particles in our air:concentraion and health effects. *Harvard University Press*, 123-147.
- Dockery, D., Pope, C., Xu, X., Sprengler, J., Ware, J., Fay, M., . . . Speizer, F. (1993). An association between air pollution and morality in six U.S. cities. *New England Journal of Medicine*, 753-1759.
- EEA-European Enviroment Agency. (2004). *Transport and enviroment in Europe. eea-Briefing*. Obtenido de <https://www.eea.europa.eu/es>
- Elassouli, S., Aqahtani, M., & Milaat, W. (2007). Genotoxicity of air borne particulates assessed by comet and th Salmonella mutagenicity test in Jeddah, Saudi Arabia. *International Journal of Environmental Research and Public Health.*, 261-233.
- Ellis, J., Athersuch, T., Thomas, L., F, T., Perez-Trujillo, M., & Svendsen, C. (2012). Metabolic profiling detects early effects of enviromental and lifestyle exposure to cadmium in a human population. *BMC Med*, 10-61.
- EPA. (Agosto 30, 2017). *Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos*. Obtenido de <https://espanol.epa.gov/espanol/terminos-s>
- Espinoza, C. (2015). *Red de monitoreo de Calidad del Aire de Cuenca de la EMOV EP. Informe de la calidad del aire Cuenca*. Obtenido de <http://www.emov.gob.ec/sites/default/files/Calidad%20del%20Aire%20final%202015.pdf>
- Fenger, J. (1999). Urban air quality. *Atmospheric Environment*, 4877-4900.
- García, M. (2005). *Los hidrocarburos policiclicos aromáticos asociados a combustibles fósiles. Caracterización, Análisis y remediación*. Madrid.
- Gaviria, C., Benavides, P., & Tangarife, C. (2011). Contaminación por material particulado (pm2.5 y pm10) y consultas por enfermedades respiratorias en Medellin (2008-2009). *Revista Facultad Nacional De Salud Pública*, 241-250.



- Gillies, J., Watson, J., Rogers, C., Dubois, D., Chow, J., Langston, R., & Sweet, J. (1999). Long-Term efficiencies of dust suppressants to reduce PM<sub>10</sub> emission from unpaved roads. *Journal of the air and waste management association*, 3-16.
- Gonzalez, G. (2014). *Actividad inflamatoria inducida por el material particulado (PM<sub>10</sub>) de la zona urbana del Cantón Cuenca en la línea celular humana A-549*. Loja.
- González, I. (2009). *Evaluación y tendencia espacio-temporal de las concentraciones de partículas totales suspendidas en el municipio San Francisco, Estado Zulia*. Maracaibo – Venezuela
- Gonzalez, O. (2009). *Determinación del contenido de PAHs en partículas PM<sub>2.5</sub> en una zona de alto tráfico vehicular y otra con potencial exposición industrial del Área Metropolitana de Monterrey*. Mexico: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Gu, Y., Hogenesch, J., & Bradfield, C. (2000). The PASSuperfamily: Sensors of Environmental and Developmental signals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 519-561.
- Gupta, R., Reddy, M., & Randerath, K. (1982). 32P-postlabelling analysis of non radioactive aromatic carcinogen. *Carcinogenesis*, 1081-1092.
- Gutiérrez, I. (2014). *Evaluación del daño genotóxico de la línea celular A-549 expuesta al material particulado (PM<sub>10</sub>) recogido en la zona urbana del cantón Cuenca*. Loja.
- Gutiérrez, J., Romieu, I., Corey, G., & Fortoul, T. (1997). Contaminación del aire, riesgos para la salud. *UNAM/El Manual Moderno*, 4-5.
- Gutierrez, M., Roubicek, D., Cebrián-García, M., Sorod-cede, M., & Ostrosky-Wegman, P. (2006). Effect of Chemical Composition on the Induction of DNA Damage by Urban Airborne Particulate matter. *Environmental and Molecular mutagenesis*, 199-211.
- Halliwell, B. (2000). Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *Am J Clin Nutr*, 1082-1087.
- Hamoutene, D., Payne, J., Rahimtula, A., & Lee, K. (2002). Use of the comet assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, 471-474.
- Han, X., Liehr, J., & Bosland, M. (1995). Induction of a DNA adduct detectable by 32P postlabeling in the dorsolateral prostate of NBI/Cr rats treated with estradiol-17Bb testosterone. *Carcinogenesis*, 951-954.
- Harri, M., Svoboda, P., Mori, T., Mutaen, P., Kasai, H., & Savela, K. (2005). Analysis of 8-hydroxydeoxyguanosine among workers exposed to diesel particulate exhaust: comparison with urinary metabolites and PAH air monitoring. *Free Radical Research*, 963-972.
- Hayasi, M., Kodama, Y., Awogi, T., Suzuki, T., Asita, A., & Sofuni, T. (1992). The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from mitomycin-c and eye clophosphamide-treated rats. *Mutat Res*, 209-213.
- Herrera, J., & Chavez, C. (2012). Validación de un método de análisis para la determinación de HAPS por cromatografía líquida de alta eficiencia en partículas PM<sub>10</sub> y PM<sub>2.5</sub>. *Tecnología en marcha*, 39-49.
- Ibedaca, J. (2014). *Optimización de las metodologías de extracción asistida por microondas y ultrasonido para la determinación de Hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de Tillandsia recurvata(L.) biomonitor de la contaminación atmosférica*. Caracas: Universidad Central de Venezuela.

- Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. (s.f.). *Infocarquim, Cancerígenos, Mutagénicos y Reprotóxicos*. Obtenido de <http://infocarquim.insht.es:86/Forms/InformeAgente.aspx?id=195>
- Introducción al monitoreo atmosférico*. (junio 08, 2017). Obtenido de <http://www.bvsde.ops-oms.org/bvsci/e/fulltext/intromon/cap5.pdf>
- Jara, A. (2009). *Estudio de flujos biológicos: Deposición de aerosoles en los pulmones*. Madrid: Universidad Carlos III de Madrid.
- Jena, G., & Bhunya, S. (1995). Use of chick, *Gallus domesticus*, as an in vivo model for the study of chromosome aberration: A study mitomycin C and probable location "hot spot". *Mutat Res*, 167-174.
- Jun, M., Kim, H., Park, Y., D, P., Chung, K., & Oh, S. (2012). Genotoxic effects and oxidative stress induced by organic extracts of particulate matter (PM10) collect from a subway tunnel in Seoul, Korea. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental mutagenesis.*, 39-47.
- Kanakidou, M., Seinfeld, J., Pandis, S., Barnes, I., Dentener, F., Facchini, M., . . . Stephanou, E. (2005). Organic aerosol and global climate modeling: a review. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 1053-1123.
- Kelly, F. (2003). Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occup Environ Med*, 612-616.
- Khaidakov, M., Bishop, M., Manjatatha, M., Lyn-Cook, L., Desai, V., Chen, J., & Aidoo, A. (2001). Influence of dietary antioxidants on the mutagenicity of 7,12-dimethylbenz (a) anthracene and bleomycin in female rats. *Mutat. Res*, 480:481: 163-170.
- Klauning, J., & Kamendulis, L. (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Pharmacol Toxicol*, 239-267.
- Klumpp, A., Ansel, W., & Klumpp, G. (2002). Pan-European biomonitoring network for urban air quality assessment environmental management strategies. *Environ Sci & Pollut Res (ESPR)*, 199-203.
- Koss, G., & Tesseroux, I. (1999). En "Toxicology". *Academic Press, San Diego*, 603-644.
- Kuljukka, T. (1996). Exposure to PAH compounds among cokery workers in the oil shale industry. *Environmental Health Perspectives*, 540.
- Lara, B., & J.A. (1999). *Depuración de aguas residuales urbanas mediante humedales artificiales*. Obtenido de [www.gem.es/MATERIALES/DOCUMENT/DOCUMENT/g01/](http://www.gem.es/MATERIALES/DOCUMENT/DOCUMENT/g01/)
- Large, A., Shaw, J., Peters, L., McInthosh, A. W., Mally, A., & Chipman, J. (2002). Different levels of mussel (*Mytilus edulis*) DAN strand breaks following chronic field and acute laboratory exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research.*, 493-497.
- Lazar, A., Reilly, P., & Whitten, W. (1999). Real-time surface analysis of Individual Airborne Environmet Particles. *Environmental Science & Technology*, 3993-4001.
- Lepers, C., Dergham, M., Armand, L., Billet, S., Verdina, A., Andre, V., & Sichel, F. (2014). Mutagenicity and clastogenicity of native airborne particulate matter samples collected under industrial, urban or rural influence. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 866-874.
- León, A. (2013). *Estudio y evaluación de las interacciones supramoleculares de las escuaramidas con los ácidos nucleicos*. Islas Baleares- España.

- Lewtas, J., Huisingh, R., Bradow, R., Junger, L., Claxton, L., & Zweidinger, R. (1979). Application of Bioassaya to the Characterization of Diesel Particulate Emissions. *Plenum Press*, 383-418.
- Li, N., Sioutas, C., Cho, A., Schmitz, D., Misra, C., & Sempf, J. (2003). Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect*, 455-460.
- Li, X., Gilmour, P., Donaldson, K., & MacNee, W. (1996). Free radical activity and proinflammatory effects of particulate air pollution (PM10) in vivo and in vitro. *Thorax*, 1216-1222.
- Li, X., Gilmour, P., Donaldson, K., & MacNee, W. (1997). In vivo and in vitro pro inflammatory effects of particulate air pollution (PM10). *Environ. Health Perspect*, 1283-1997.
- Lock, E., & Bonventre, J. (2008). Biomarkers in translation; past, present and future. *Toxicology*, 163-166.
- Machado, A., Velázquez, H., García, N., García, C., Acosta, L., Córdova, A., & Linares, M. (2007). Metales en PM10 y su dispersión en zona de alto tráfico vehicular. *Interciencia.*, 312-317.
- Mannino, M., & Orecchio, S. (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) in indoor dust matter of Palermo (Italy) area: Extraction, GC-ms analysis, distribution and sources. *Atom. Environment*, 1801-1817.
- Mansilla, S. (2013). *La degradación de p21 inducida por la luz UV facilita la replicación de ADN lesionado y preserva la estabilidad genómica*. Buenos Aires.
- Marchand, N., Besombes, J., Chevron, N., Masclet, P., Aymoz, G., & Jaffrezo, J. (2004). Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs, in the atmospheres of two French alpine valleys: sources and temporal pattern. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 1167-1181.
- Marr, L., Dzepina, K., Jimenez, J., Riesen, F., Bethel, H., Arey, J., . . . Molina, M. (2006). Sources and transformations of particle-bound polycyclic aromatic hydrocarbons in Mexico city. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 1733-1745.
- Martínez, R. (2011). *Estimación de riesgo en salud por exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos y DDT residual en población infantil del estado de Chiapas*. San Luis Potosí, S.L.P.
- Martínez, S. (2005). *Caracterización de la contaminación atmosférica producidas por partículas en suspensión en Madrid*. Madrid.
- Martínez, S. (2017). *Biomarcadores de genotoxicidad y estudios de homogeneidad genética en Heleobia cf. australis para el análisis ambiental de la costa uruguaya*. Montevideo.
- Mc Carthy, J., & Shugart, L. (1990). Biomarkers of environmental contamination. *Lewis Publ.*
- Medioambientales, C. d. (23 de Enero de 2018). *Departamento de Biología y Geología*. Obtenido de <https://ilexaquifolium.files.wordpress.com/2012/01/ctm9.pdf>
- Meléndez, I., Martínez, M., & Quijano, A. (2012). Actividad mutagénica y genotóxica en el material particulado. *Iatreia*, 347-356.
- Meléndez, I., Quinteros, G., & Quijano, A. (2016). Mutagenicidad y genotoxicidad en fracciones de PM2.5 del aire de villa del Rosario, Colombia. *Actua. Biol*, 191-196.
- Mendoza, L., Orozco, L., Zapata, L., & Palacio, J. (2013). Genotoxicidad sobre linfocitos humanos expuestos a PM10 de tres sitios del Valle de Aburrá (Antioquia). *Rev. Salud*, 294-306.
- Middleton, N., Yiallourous, P., Kleanthous, S., Kleanthous, S., Kolokotroni, O., Schwartz, J., . . . Koutrakis, P. (2008). A 10-yr time-series analysis of respiratory and cardiovascular



- morbidity in Nicosia Cyprus: the effect of short-term changes in air pollution and dust storms. *Environmental Health*, 7-39.
- Miller, C., & Miller, J. (1981). Mechanisms of chemical carcinogenesis. *Cancer Res*, 1055-1064.
- Minguillón, M. (2007). *Composición y fuentes del material particulado atmosférico en la zona cerámica de Castellón. Impacto de la introducción de las mejores técnicas disponibles*. Castellón.
- Ministerio del Ambiente. (2010). *Plan nacional de la calidad del aire*. Quito.
- Misra, R., & Waalkes, M. (2001). *Toxicología genética. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo*. España: Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, Subdirección General de Publicaciones.
- Mithchellmore, C., & Chipma, J. (1998). DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat. Res.*, 135-147.
- Moeller, P., & Loft, S. (2002). Oxidative DNA damage in human white blood cells in dietary antioxidant intervention studies. *Am J Clin Nutr*, 303-310.
- Molina, P. (2013). *Simulación numérica de un problema de contaminación atmosférica*. Madrid.
- Moller, P., & Loft, S. (2010). Oxidative damage to DNA and lipids as biomarkers of exposure to air pollution. *Environmental Health Perspectives*, 1126-1136.
- Monarca, S., Crebelli, R., Ferreti, D., Zanardini, A., Fuselli, S., Filini, L., . . . Nardi, G. (1997). Mutagens and Carcinogens in size-classified air particulates of a Northern Italian town. *Science of the total environment*, 137-144.
- Morales, G. (2006). *Contaminación atmosférica urbana. Episodios críticos de contaminación ambiental en la ciudad de Santiago*. Santiago de Chile: Editorial Universitaria SA.
- Mordechai, C. (1988). A site-specific Mechanism for free radical induced biological damage: The essential role of redox-active transition metals. *Free Radicals in Biology & Medicine.*, 27-37.
- Morgan, T., & Boyd, R. (1998). *Química Orgánica*. Pearson Educación.
- Negral, L. (2010). *Variabilidad de niveles y composición del material particulado en suspensión en el sudeste de la península ibérica*. Cartagena.
- Nemmar, A., & Inuwa, I. (2008). Diesel exhaust particles in blood trigger systemic and pulmonary morphological alterations. *Toxicology letters*, 20-30.
- Nemmar, A., Holme, J., Rosas, I., Schwarze, P., & Alfaro-Moreno, E. (2013). Recent advances in particulate matter and nanoparticle toxicology: A review of the in vivo and in vitro studies. *BioMed Research Internacional*.
- Oberdöster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., & Yang, H. (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology.*, 2-8.
- Oliveira, C., Pio, C., Alves, C., Evtugina, M., Santos, P., Goncalves, V., . . . Harrad, S. (2007). Seasonal distribution of polar organic compounds in the urban atmosphere of two large cities from the North and South of Europe. *Atmospheric Environment*, 5555-5570.
- OMS.(2005). *Guías de calidad del aire de la OMS relativas al material particulado, el ozono, el dióxido de nitrógeno y el dióxido de azufre*. Obtenido de [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69478/WHO\\_SDE\\_PHE\\_OEH\\_06.02\\_spa.pdf;jsessionid=29ED665B300E86FF07AC0CCFDBE05ECD?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69478/WHO_SDE_PHE_OEH_06.02_spa.pdf;jsessionid=29ED665B300E86FF07AC0CCFDBE05ECD?sequence=1)

- Opazo, D. (2011). *Distribución espacial de la contaminación por materia particulada y su relación con las temperaturas del aire y los vientos en Santiago para el año 2009*. Santiago, Chile: Universidad de Chile.
- Östling, O., & Johanson, K. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cell. *Biochem Biophys Res Commun.*, 291-298.
- Oyarzún, G. (2010). Contaminación aérea y sus efectos en la salud. *Revista Chilena de enfermedades respiratorias*, 16-25.
- Parra, R. (2018). *Informe de la calidad del aire Cuenca 2017*. Cuenca.
- Pesántez, M. (2012). *Confort térmico en el área social de una vivienda familiar en Cuenca - Ecuador*. Cuenca.
- Pino, M. (2018). *Predicción de la contaminación atmosférica con Material Particulado PM 2.5 en el Centro Histórico de Quito utilizando la Teoría de Caos*. Sangolquí - Quito: Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Maestría en Sistemas de Gestión Ambiental.
- Pio, C., Legrand, M., Oliveira, T., Alfonso, J., Santos, C., Caseiro, A., . . . Shooch, M. (2007). Climatology of aerosol composition (organic versus inorganic) at nonurban sites on a west-east transect across Europe. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres*, 112.
- Pope III, C., Burnett, R., Thun, M., Calle, E., Krewski, D., Ito, K., & Thurston, G. (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality and long-term exposure to fine particulate air pollution. *J.Am. Med.*, 1132-1141.
- Pope, C., & Dockery, D. (2006). Health effects of fine particulate air pollution: Lines that connect. *J Air Waste Manage Assoc*, 709-742.
- Quality of Urban Air Review Group. (1993). *Second report: Diesel vehicle emissions and urban Air Quality*. Obtenido de Prepared at the request of the Department of the Environment: <https://uk-air.defra.gov.uk/assets/documents/reports/empire/quarg/q2intro.html>
- Quezada, M. (2015). *Lineamientos metodológicos para ordenar el área periurbana de Cuenca: Caso Guncay - El Valle*. Cuenca.
- Quijano Parra, A., Quijano Vargas, M., & Meléndez Gélvez, I. (2013). Influencia de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) y metales en la calidad del aire de Pamplona y sus efectos genotóxicos. *Revista Ambiental, Agua, Aire y Suelo*, 23-34.
- Quijano, A., & Meléndez, I. (2014). Identificación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en el aire de Cúcuta-Colombia: Efecto Gen Tóxico. *Rev. EIA.*, 79-87.
- Ramos, S., Bautista, R., & Valdez, A. (2010). Estudio estadístico de la correlación entre contaminantes atmosféricos y variables meteorológicas en la zona del norte de Chiapas, México. *SciELO*, 65, 80.
- Repetto, M. (1978). Toxicología de los aerosoles. En M. Repetto, *Toxicología de los aerosoles*. (págs. 60-79). Sevilla: Publicaciones de la Universidad.
- Rodríguez, A., Nieves, A., Navas, J., Dorado, G., Lopez-Barea, J., & Pueyo, C. (1995). Metal mutagenicity and biochemical studies on bivalve molluscs from Spanish coast. *Environ Mol Mutagen*, 112-124.
- Rodríguez, V. (2003). *Niveles, composición y origen del material particulado atmosférico en los sectores del norte y este de la Península Ibérica y Canarias*. Politécnico de Cataluña.
- Rodríguez-Rey, A., Noris-García, E., & Fundora-Torres, M. (2016). Principios y relevancias del ensayo cometa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 184-194.

- Rojas, N. (2004). Revisión de las emisiones de material particulado por la combustión de diesel y biodiesel. *Revista de ingeniería*, 58-67.
- Romero, M., Diego, F., & Álvarez, M. (2006). La contaminación del aire: su repercusión como problema de salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 1-14.
- Rosales-Castillo, J., Torres-Meza, V., & Olaiz-Fernandez, G. (2001). Acute effects of air pollution on health: evidence from epidemiological studies. *Salud Pública Mex.*, 544-555.
- Sahagún, M. (2009). *Efecto genotóxico de las partículas atmosféricas urbanas*. Tesis de Pregrado. Instituto Politecnico Nacional.
- Sanchez, J., & Alcantara, A. (s.f.). *Compuestos Orgánicos Volátiles en el medio ambiente*.
- Sanchez, V., & Guiza, B. (1989). *Glosario de términos sobre medio ambiente*. Santiago, Chile: Andrómeda, S.A.
- Sánchez, W. (2015). *Actividad citotóxica, genotóxica y producción de ROS inducida por el material particulado soluble en solventes orgánicos (PM10) de la zona urbana del cantón Cuenca en la línea celular humana A-549*. Loja.
- Sbarato, V. (1999). *Análisis y Caracterización del material particulado atmosférico*. Cordoba, Argentina.
- Schnurstein, A., & Braunbeck, T. (2001). Tail Moment versus Tail LengthNAApplication of an In Vitro Version of the Comet Assay in Biomonitoring for Genotoxicity in Native Surface Waters Using Primary Hepatocytes and Gill Cells from Zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 187-196.
- Schwartz, J. (1994). What are people dying of on high air pollution days? . *Environmental Research*, 26-35.
- Schwarze, P., Ovreivik, J., Hetland, R., Becher, R., Cassee, F., Lag, M., & Refsnes, M. (2007). Importance of size and composition of particles for effects on cells in vitro. *Inhalation Toxicology.*, 17-22.
- Senlin, L., Zhenkun, Y., Xiaohui, C., Minghong, W., Guoying, S., & Jiamo, F. (2008). The relationship between physicochemical characterization and the potential toxicity of fine particules (PM2.5) uin Shangai atmosphere. *Atmos. Environ*, 7205-7214.
- Shugart, L., Bickham, J., Jackim, G., McMahon, G., Ridley, W., Stein, J., & Steinert, S. (1992). DNA alterations. *In Huggett*.
- Silva, V. (03 de 2010). *Contaminación del aire por material particulado PM10 y PM2.5*. Obtenido de [http://tallerdearquitecturamexicana.com/observaleon.org/wp-content/uploads/2010/03/Material-Particulado\\_Vicente-Silva.pdf](http://tallerdearquitecturamexicana.com/observaleon.org/wp-content/uploads/2010/03/Material-Particulado_Vicente-Silva.pdf)
- Soriano, M. (2015). *Niebla como fuente alternativa para suministro de agua*. Bogotá, Colombia.
- Stellman, J., & McCan, M. (1998). Hidrocarburos poliaromáticos. En J. Stellman, & M. McCan, *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo* (págs. 310-9). Madrid: Organización Internacional del Trabajo.
- Sun, Q., Wang, A., Jin, X., Natanzon, A., Duquaine, D., Brook, R., . . . Rajagopalan, S. (2005). Long-term air pollution exposure an acceleration of atherosclerosis and vascular inflammation in a animal model. *Jama-Journal of the American Association*, 3003-3010.
- Sunjog, K., Kolarević, S., Héberger, K., Gačić, Z., Knežević-Vukčević, Vuković-Gačić, M., & Lenhardt, M. (2013). Comparison of cometa assay parameters for estimation of genotoxicity by sum of raking differences. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.*, 4879-4885.



- Tafur, Y., & Marin, M. (2014). Principales mecanismos de reparación de daños en la molécula de ADN. *Revista Biosalud*, 91-110.
- Talegón, E. (2011). Optimización de la determinación de partículas en suspensión en el Laboratorio de Calidad del Aire de la Agencia del medio ambiente y agua. Sevilla-España: Universidad de Sevilla.
- Tambor, V., Fucikavá, A., Lenco, J., Kacerovsky, M., Reháček, V., & Stulik, J. (2010). Application of proteomics in biomarker discovery: a primer for th clinician. *Physiol Res.*, 471-497.
- Tice, R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., & Kobayashi, H. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.*, 206-221.
- Torres, Y. (2011). *Estado oxidante-antioxidante en eritrocitos de pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. "Efecto de contaminantes de la Atmósfera Material Particulado 2.5"*.
- TOXNET. (2002). *Toxicological Data Network*. Obtenido de <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>
- Ubilla, C., & Johannssen, K. (2017). Contaminación atmosférica efectos en la salud respiratoria en el niño. *Revista med.clin.condes*, 111-118.
- USEPA. (1993). *Methods for derivatios of inhalation reference concentrations and Application of Inhalation Dosimetry*.
- Valavanidis, A., Fiotakis, k., Vlahogianni, T., Bakeas, E., Triantafillaki, S., Paraskevopoulou, V., & Dassenakis, M. (2006). Characterization of atmospheric particulates, particle-bound transition metals and polycyclic aromatic hydrocarbons on urban ari in the centre of Athens (Greece. *Chesmophere*, 760-768.
- Vana, M., Tamm, E., & Vill, M. (1999). Experimental Study of the Air Pollution Transport by Synchronized Monitoring of Atmospheric Aerosols. *Atmospheric Environment*, 4615-4628.
- Vargas, M., Romero, G., Palencia, A., Rivero, E., & Piñero, S. (2013). Equivalentes tóxicos de hidrocarburos aromáticos policíclicos en particulado atmosférico en Valencia, Venezuela. *Acta.toxicol.argent.*, 69-77.
- Vázquez-Gómez, G., Rubio-Lightbourn, J., & Espinosa-Aguirre, J. (2016). Mecanismos de acción del receptor de Hidrocarburos de Arilos en el metabolismo del Benzo (a) Pireno y el desarrollo de tumores. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 54-67.
- Villalba, N. M. (2016). *Remediación de suelos contaminados con fenantreno por oxidación química*. San Lorenzo Paraguay.
- Vives, I., Grimalt, J., & Guitart, R. (2001). Los Hidrocarburos Aromáticos policíclicos y la salud humana. *Apuntes de Ciencia y Tecnología*, 45-51.
- Volk, D., Thivyanathan, V., Rice, J., Luxon, B., Shah, J., Yagi, H., . . . Gorenstein, D. (2003). Solution structure of a cis-opened (10R)-N6-deoxyadenosine adduct of (9S,10R)-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene in a DNA duplex. *Biochemistry.* , 1410-20. Obtenido de [https://www.ecured.cu/Benzo\(a\)pireno](https://www.ecured.cu/Benzo(a)pireno)
- Volker, M. (2005). 3-Nitrobenzantrone, a potencial human caner hazard in diesel exhaust and urban air pollution. *Mutagenesis*, 399-410.
- Walker, B., & Mouton, C. (2008). Enviromental influences on cardiovascular health. *Journal of the National Medical Association*, 98-102.

- Wante, F., Demmer, C., Tappler, P., & Jarish, R. (1996). Exposure to gaseous formaldehyde induces IgE-mediated sensitization to formaldehyde in school-children. *Clin Exp Allergy*, 246-280.
- Watson, J., Zhu, T., Chow, J., Engelbrecht, J., Fujita, E., & Wilson, W. (2002). Receptor modeling application framework for particle source attribution. *Chemosphere*, 1093-1136.
- Weng, M. (2005). Alleviation of benzo(a)pyrene-diolepoxide-DNA damage in human lung carcinoma by glutathione S-trasnferase M2. *DNA Repair*, 493-502.
- Westerholm, R., & Li, H. (1994). A multivariate statistical analysis on fuel-related polycyclic aromatic hydrocarbon emissions from heavy-duty diesel vehicles. *Enviromental Science and Technology*, 965-972.
- Yassi, A., Kjellstrom, T., & de Kok, T. (2002). *Salud Ambiental Básica*. México DF: PNUMA.
- Yeatts, K., Svendsen, E., Creason, J., Alexis, N., Herbst, M., ScottJ, . . . Peden, D. (2007). Coarse particulate matter (pm2.5-10) affects heart rate variability, blood lipids and circulating eosinophils in adults with asthma. *Environmental Health perspectives*, 709-714.
- Zhaoa, H., Bagera, M., Mab, J., & Castranova, V. (2004). Effects of exposure to diesel exhaust particles (DEP) on pulmonary metabolic activation of mutagenic agents. *Mut Res*, 103-113.
- Zúniga, L. (2009). *Optimizaciones metodológicas de ensayo del cometa y su aplicación en biomonitorización humana*. Bellaterra: Universitat Autònoma de Barcelona Facultat de Biociències.

**ANEXOS**

## Anexo A. Análisis preliminar de material particulado

<b>ANÁLISIS PRELIMINAR DE MATERIAL PARTICULADO</b>						
<b>PROYECTO DE GENOTOXICIDAD DEL MATERIAL PARTICULADO PM<sub>2,5</sub> / UNIVERSIDAD DE CUENCA/CEA/DIUC</b>						
	<b>Ubicación</b>	<b>Filtro</b>	<b>Conc. Prom.(µg/m<sup>3</sup>)</b>	<b>Conc. Mínima (µg/m<sup>3</sup>)</b>	<b>Conc. Máxima(µg/m<sup>3</sup>)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
1	Av. De los Cerezos y calle de las Gadiolas	PM <sub>2,5</sub>	<b>2,06</b>	1,98	2,06	22,3
2	Abelardo J. Andrade	PM <sub>2,5</sub>	<b>1,22</b>	1,20	1,30	22,0
3	Felix Roggia y Yaupi	PM <sub>2,5</sub>	<b>2,91</b>	2,71	3,41	23,4
4	Mariscal Lamar y A. Ortega (sector el Punto)	PM <sub>2,5</sub>	<b>2,03</b>	2,02	2,04	20,0
5	Quinta de Balzaín	PM <sub>2,5</sub>	<b>1,95</b>	1,93	2,01	18,0
6	Panamericana Norte (sector la Llantera)	PM <sub>2,5</sub>	<b>1,54</b>	1,49	1,63	26,2
7	Calle Roma entre sofía y varsovia	PM <sub>2,5</sub>	<b>1,64</b>	1,55	1,90	22,7
8	Max Uhle y Gil Ramiro Davalos	PM <sub>2,5</sub>	<b>1,12</b>	1,57	1,74	23,2
9	Padrea Aguirre y Rafael María Arízaga	PM <sub>2,5</sub>	<b>1,95</b>	1,90	2,15	26,5
10	C. Tamaríz (sector Misicata) próxima a las Américas	PM <sub>2,5</sub>	<b>1,01</b>	0,96	1,11	21,3
11	Santa Marianita del Arenal	PM <sub>2,5</sub>	<b>4,34</b>	4,04	5,41	26,2
12	El Tequila Sector Cristo del Consuelo)	PM <sub>2,5</sub>	<b>2,64</b>	2,64	2,64	16,4
13	Av. Remigio Crespo Toral y Guayana	PM <sub>2,5</sub>	<b>1,03</b>	1,03	1,07	30,0
14	Luis Cordero y Mariscal Sucre	PM <sub>2,5</sub>	<b>3,44</b>	3,42	3,48	25,2
15	Av. Yana Urco entre Rio Cutucú y Rio Upano	PM <sub>2,5</sub>	<b>1,37</b>	1,37	1,37	25,6

16	Popayan (Sector IESS)	PM2,5	<b>1,71</b>	1,65	1,81	22,8
17	Hospital del Río	PM2,5	<b>1,74</b>	1,74	1,80	25,1
18	Av. 10 de Agosto y V. Cordero (sector Iglesia del verbo)	PM2,5	<b>3,02</b>	2,96	3,14	22,3
19	José Peralta y Alfonso Cordero	PM2,5	<b>1,30</b>	1,30	1,33	25,1
20	Av. De las Américas y Av. Loja	PM2,5	<b>2,67</b>	2,66	2,68	18,0
21	Circumbalación Sur y Diego de Tapia	PM2,5	<b>3,35</b>	3,27	3,4	21,2
22	12 de Octubre y Cristobal Colón (sector Parque Iberia)	PM2,5	<b>2,73</b>	2,69	2,79	22,4
23	Roberto Crespo Toral y Miguel Moreno	PM2,5	<b>1,82</b>	1,75	1,83	24,0
24	Macas y Tena Ciudadela Chaguarchimbana	PM2,5	<b>2,22</b>	2,22	2,24	26,1
25	Del Antiplano y Duquilema (Sector Totoracocha)	PM2,5	<b>1,69</b>	1,58	1,70	28,0
26	Numa Pompilio Llona	PM2,5	<b>2,16</b>	2,16	2,17	29,3
27	Av. Circumbalación Sur (Sector UDA)	PM2,5	<b>2,16</b>	2,07	2,16	24,6

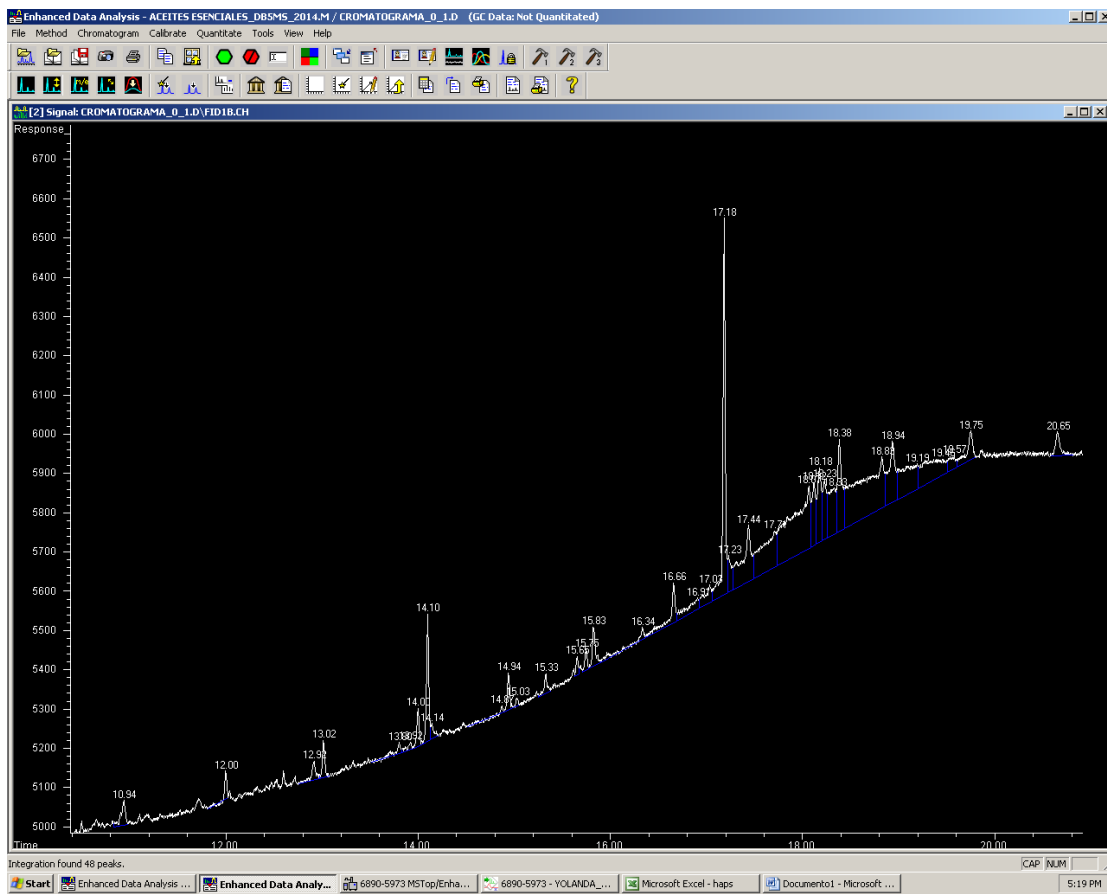
Anexo B. Condiciones meteorológicas obtenidas durante período de monitoreo

Puntos de monitoreo	# de filtros	Fechas	Flujo m3/24h	Presión mmHg	Temperatura °C	Concentración ug/m3	C-Corregida ug/m3
PUNTO 1	1	15/5/2018	24,0058	563,679	15,60766551	20,82834	27,19742
	2	18/5/2018	24,0082	563,906	15,76968641	12,49572	16,31938
	3	21/5/2018	24,0090	564,111	14,60731707	24,99067	32,49452
	4	24/5/2018	24,0050	564,895	15,26794425	24,99479	32,52933
	5	27/5/2018	24,0060	564,902	14,89303136	45,82187	59,55632
	6	30/5/2018	24,0080	525,334	15,52369338	24,99166	35,00563
	7	2/6/2018	24,0086	563,909	17,40592334	24,99108	32,82302
	8	6/6/2018	24,0072	564,024	15,73135889	12,49627	16,3145
	9	9/6/2018	24,0065	564,850	17,13623693	20,82769	27,28394
	10	12/6/2018	24,0082	564,763	16,55261324	24,99150	32,67765
	11	15/6/2018	24,0075	564,930	16,57421603	24,99218	32,6731
	12	18/6/2018	24,0062	566,530	13,07560976	12,49680	16,09364
	13	21/6/2018	24,0097	565,125	15,07770035	45,81478	59,56179
	14	24/6/2018	24,0059	563,909	16,65679443	24,99390	32,74205
	15	15/10/2018	24,0092	562,547	17,35017422	20,82534	27,41275
	16	17/10/2018	24,0076	562,615	17,04652778	12,49607	16,42962
	17	19/10/2018	24,0084	562,425	16,39581882	20,82603	27,32949
	18	21/10/2018	24,0061	562,268	17,11881533	24,99364	32,88965
	19	23/10/2018	24,0082	562,923	16,59860627	16,66100	21,85977
	20	25/10/2018	24,0057	562,289	17,78013937	20,82843	27,47001
	21	27/10/2018	24,0079	561,268	16,36445993	16,66117	21,90673
	22	29/10/2019	24,0075	561,236	15,84965278	20,82682	27,33673
PUNTO 2	1	4/7/2018	24,0085	560,059	14,52369338	12,49559	16,3604
	2	6/7/2018	24,0076	559,676	14,9554007	20,82673	27,32795
	3	8/7/2018	24,0060	560,645	15,39338	4,16562	5,46481
	4	10/7/2018	24,0064	560,328	15,87805	12,49669	16,43104
	5	12/7/2018	24,0061	560,436	14,39791	12,49685	16,3439
	6	13/7/2018	23,4752	560,395	14,1884	12,77946	16,70253
	7	16/7/2018	24,0083	560,785	14,82257	12,49570	16,35636
	8	18/7/2018	24,0069	559,307	15,90767	4,16548	5,48746
	9	20/7/2018	24,0079	559,181	15,55261	16,66121	21,92685
	10	22/7/2018	24,0075	559,587	14,67188	20,82682	27,30551
	11	24/7/2018	24,0052	561,206	14,52578	4,16576	5,44311
	12	26/7/2018	24,0063	560,700	15,02474	8,33116	10,91445
	13	28/7/2018	24,0046	560,317	15,42300	4,16586	5,46887
	14	29/7/2018	24,0065	559,692	15,35385	16,66214	21,89296
	15	25/9/2018	24,0081	561,087	16,88293	29,15687	38,41763
	16	28/9/2018	24,0068	560,937	18,54599	16,66194	22,08593
	17	29/9/2018	24,0068	560,683	17,90836	20,82743	27,55953
	18	1/10/2018	24,0082	561,017	17,09792	24,99146	32,95773



	19	3/10/2018	24,0062	560,798	17,48537	29,15919	38,52039
	20	5/10/2018	24,0062	561,129	15,92369	12,49680	16,4103
	21	7/10/2018	24,0079	561,268	16,36446	24,99176	32,8601
	22	9/10/2018	24,0075	561,236	15,84965	12,49609	16,40204
PUNTO 3	1	7/8/2018	24,0080	562,118	15,69024	16,66111	21,82254
	2	9/8/2018	24,0058	563,101	12,86063	24,99396	32,35939
	3	12/8/2018	24,0087	562,620	14,32195	16,66062	21,69911
	4	15/8/2018	24,0082	562,052	14,52857	20,82625	27,17144
	5	18/8/2018	24,0070	562,568	14,31324	24,99275	32,55308
	6	21/8/2018	24,0057	562,662	14,06899	41,65685	54,2029
	7	23/8/2018	24,0060	561,993	13,23194	20,82813	27,0542
	8	26/8/2018	24,0065	562,404	12,44682	29,15880	37,74361
	9	28/8/2018	24,0053	562,467	13,41115	20,82878	27,04917
	10	30/8/2018	24,0060	561,843	13,97596	20,82812	27,13175
	11	1/9/2018	24,0059	561,021	15,73206	37,49086	49,20833
	12	3/9/2018	24,0057	561,861	14,36411	45,82244	59,76948
	13	5/9/2018	24,0042	562,014	12,657143	12,49781	16,20054
	14	7/9/2018	24,0078	562,216	14,840070	37,48788	48,94814
	15	9/9/2018	24,0076	562,066	13,896	45,81881	59,64552
	16	11/9/2018	24,0067	562,300	14,859	12,49651	16,3154
	17	13/9/2018	24,0075	561,063	15,091	24,99223	32,72804
	18	15/9/2018	24,0078	560,889	15,848	37,48788	49,23582
	19	17/9/2018	24,0067	561,090	15,755	45,82064	60,13876
	20	19/9/2018	24,0072	561,132	16,319	33,32332	43,8185
21	21/7/2018	24,0043	561,516	14,179	29,16144	38,03617	
22	23/9/2018	24,0085	561,160	15,027	29,15634	38,16605	

## Anexo C. Captura de pantalla del cromatograma perteneciente al patrón



Anexo D. Análisis estadístico de viabilidad

**Kruskal-Wallis test of Transform of P1:ANOVA**

	Data Set-A
Table Analyzed	Transform of P1
Kruskal-Wallis test	
P value	0.0016
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	4
Kruskal-Wallis statistic	10.94
Data summary	
Number of treatments (columns)	4
Number of values (total)	16

**Kruskal-Wallis test of Transform of P1:Multiple comparisons**

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E
Number of families	1				
Number of comparisons per family	6				
Alpha	0.05				
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary		
C- vs. B	-6.750	No	ns		
C- vs. P1	-2.750	No	ns		
C- vs. C+	4.000	No	ns		
B vs. P1	4.000	No	ns		
B vs. C+	10.75	Yes	**		
P1 vs. C+	6.750	No	ns		
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2
C- vs. B	7.125	13.88	-6.750	4	4
C- vs. P1	7.125	9.875	-2.750	4	4
C- vs. C+	7.125	3.125	4.000	4	4
B vs. P1	13.88	9.875	4.000	4	4
B vs. C+	13.88	3.125	10.75	4	4
P1 vs. C+	9.875	3.125	6.750	4	4

**Kruskal-Wallis test of Transform of P2:ANOVA**

	Data Set-A
Table Analyzed	Transform of P2
Kruskal-Wallis test	
P value	0.0019
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	4
Kruskal-Wallis statistic	10.90
Data summary	
Number of treatments (columns)	4
Number of values (total)	16





**Kruskal-Wallis test of Transform of P2:Multiple comparisons**

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E
Number of families	1				
Number of comparisons per family	6				
Alpha	0.05				
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary		
C- vs. B	-6.625	No	ns		
C- vs. P2	-2.125	No	ns		
C- vs. C+	4.250	No	ns		
B vs. P2	4.500	No	ns		
B vs. C+	10.88	Yes	***		
P2 vs. C+	6.375	No	ns		
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2
C- vs. B	7.375	14.00	-6.625	4	4
C- vs. P2	7.375	9.500	-2.125	4	4
C- vs. C+	7.375	3.125	4.250	4	4
B vs. P2	14.00	9.500	4.500	4	4
B vs. C+	14.00	3.125	10.88	4	4
P2 vs. C+	9.500	3.125	6.375	4	4

**Kruskal-Wallis test of Transform of P3:ANOVA**

	Data Set-A
Table Analyzed	Transform of P3
Kruskal-Wallis test	
P value	0.0057
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	***
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	4
Kruskal-Wallis statistic	9.819
Data summary	
Number of treatments (columns)	4
Number of values (total)	16

**Kruskal-Wallis test of Transform of P3:Multiple comparisons**

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E
Number of families	1				
Number of comparisons per family	6				
Alpha	0.05				
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary		
C- vs. B	-5.750	No	ns		
C- vs. P3	-2.250	No	ns		
C- vs. C+	4.500	No	ns		
B vs. P3	3.500	No	ns		
B vs. C+	10.25	Yes	*		
P3 vs. C+	6.750	No	ns		
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2
C- vs. B	7.625	13.38	-5.750	4	4
C- vs. P3	7.625	9.875	-2.250	4	4
C- vs. C+	7.625	3.125	4.500	4	4
B vs. P3	13.38	9.875	3.500	4	4
B vs. C+	13.38	3.125	10.25	4	4
P3 vs. C+	9.875	3.125	6.750	4	4

Anexo E. Análisis estadístico de genotoxicidad

1way ANOVA Multiple comparisons					
1	Number of families	1			
2	Number of comparisons per family	6			
3	Alpha	0.05			
4					
5	Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
6					
7	C- vs. B	344.3	Yes	****	< 0.0001
8	P1 vs. B	232.8	Yes	****	< 0.0001
9	C+ vs. B	630.9	Yes	****	< 0.0001
10	P1 vs. C-	-111.5	Yes	**	0.0069
11	C+ vs. C-	286.6	Yes	****	< 0.0001
12	C+ vs. P1	398.1	Yes	****	< 0.0001

1way ANOVA Multiple comparisons					
1	Number of families	1			
2	Number of comparisons per family	6			
3	Alpha	0.05			
4					
5	Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
6					
7	C- vs. B	359.4	Yes	****	< 0.0001
8	P2 vs. B	256.1	Yes	****	< 0.0001
9	C+ vs. B	643.3	Yes	****	< 0.0001
10	P2 vs. C-	-103.2	Yes	*	0.0156
11	C+ vs. C-	284.0	Yes	****	< 0.0001
12	C+ vs. P2	387.2	Yes	****	< 0.0001

1way ANOVA Multiple comparisons					
1	Number of families	1			
2	Number of comparisons per family	6			
3	Alpha	0.05			
4					
5	Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
6					
7	C- vs. B	347.5	Yes	****	< 0.0001
8	P3 vs. B	430.4	Yes	****	< 0.0001
9	C+ vs. B	669.2	Yes	****	< 0.0001
10	P3 vs. C-	82.84	No	ns	0.0939
11	C+ vs. C-	321.6	Yes	****	< 0.0001
12	C+ vs. P3	238.8	Yes	****	< 0.0001

1way ANOVA Multiple comparisons					
1	Number of families	1			
2	Number of comparisons per family	6			
3	Alpha	0.05			
4					
5	Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
6					
7	C- vs. B	50.24	No	ns	0.9082
8	P1 vs. B	115.9	Yes	***	0.0003
9	C+ vs. B	443.3	Yes	****	< 0.0001
10	P1 vs. C-	65.66	No	ns	0.3649
11	C+ vs. C-	393.1	Yes	****	< 0.0001
12	C+ vs. P1	327.4	Yes	****	< 0.0001

1way ANOVA Multiple comparisons						
1	Number of families	1				
2	Number of comparisons per family	6				
3	Alpha	0.05				
4						
5	Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
6						
7	C- vs. B	53.99	No	ns	0.7387	
8	P2 vs. B	11.92	No	ns	> 0.9999	
9	C+ vs. B	418.1	Yes	****	< 0.0001	
10	P2 vs. C-	-42.07	No	ns	> 0.9999	
11	C+ vs. C-	364.1	Yes	****	< 0.0001	
12	C+ vs. P2	406.1	Yes	****	< 0.0001	

1way ANOVA Multiple comparisons						
1	Number of families	1				
2	Number of comparisons per family	6				
3	Alpha	0.05				
4						
5	Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
6						
7	C- vs. B	54.05	No	ns	0.7362	
8	P3 vs. B	59.26	No	ns	0.2295	
9	C+ vs. B	442.6	Yes	****	< 0.0001	
10	P3 vs. C-	5.203	No	ns	> 0.9999	
11	C+ vs. C-	388.6	Yes	****	< 0.0001	
12	C+ vs. P3	383.4	Yes	****	< 0.0001	

1way ANOVA Multiple comparisons						
1	Number of families	1				
2	Number of comparisons per family	6				
3	Alpha	0.05				
4						
5	Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
6						
7	C- vs. B	104.4	Yes	*	0.0173	
8	P1 vs. B	146.7	Yes	****	< 0.0001	
9	C+ vs. B	493.0	Yes	****	< 0.0001	
10	P1 vs. C-	42.35	No	ns	> 0.9999	
11	C+ vs. C-	388.6	Yes	****	< 0.0001	
12	C+ vs. P1	346.3	Yes	****	< 0.0001	

1way ANOVA Multiple comparisons						
1	Number of families	1				
2	Number of comparisons per family	6				
3	Alpha	0.05				
4						
5	Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
6						
7	C- vs. B	106.6	Yes	*	0.0141	
8	P2 vs. B	49.73	No	ns	0.4919	
9	C+ vs. B	463.3	Yes	****	< 0.0001	
10	P2 vs. C-	-56.86	No	ns	0.6267	
11	C+ vs. C-	356.7	Yes	****	< 0.0001	
12	C+ vs. P2	413.6	Yes	****	< 0.0001	

1way ANOVA Multiple comparisons						
1	Number of families	1				
2	Number of comparisons per family	6				
3	Alpha	0.05				
4						
5	Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
6						
7	C- vs. B	107.7	Yes	*	0.0127	
8	P3 vs. B	135.5	Yes	****	< 0.0001	
9	C+ vs. B	495.8	Yes	****	< 0.0001	
10	P3 vs. C-	27.81	No	ns	> 0.9999	
11	C+ vs. C-	388.1	Yes	****	< 0.0001	
12	C+ vs. P3	360.3	Yes	****	< 0.0001	
13						

## Anexo F. Reporte de análisis en filtro

## REPORTE DE ANÁLISIS

**Cliente:** UNIVERSIDAD DE CUENCA  
CUENCA / AV. DOCE DE ABRIL S/N Y AGUSTIN CUEVA Telf:  
074051000

**Atn:** Ing. Sandra Pesántez

**Proyecto:** Análisis en Filtro de Material Particulado

**Muestra Recibida:** 05-dic-18

**Tipo de Muestra:** 1 Muestra de Filtro

**Análisis Completado:** 14-dic-18

**Número reporte Gruentec:** 1812113-S001

Rotulación Muestra:	MUESTRA 1 CH	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d	
No. Reporte Gruentec:	1812113-S001	
<b>Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en peso seco :</b>		
Acenaftaleno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Acenafteno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Antraceno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)antraceno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)pireno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(b)fluoranteno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(g,h,i)perileno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(k)fluoranteno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Criseno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Dibenzo(a,h)antraceno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Fenantreno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoranteno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoreno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Indeno(1,2,3 c,d) pireno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Naftaleno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Pireno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22

n.d - No Determinado, fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

n) Valor referencial, debido a que la matriz no es la adecuada para el método ofrecido por el laboratorio, los resultados presentados no se consideran representativos.

INCERTIDUMBRE (U):

HAP's = 30%

Cálculo:  $C \pm (U \times C / 100)$  en donde: C=valor medido; U= incertidumbre %.



Ing. Isabel Estrella

Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.

Página 1 de 1



**REPORTE DE ANÁLISIS**

**Cliente:** UNIVERSIDAD DE CUENCA  
CUENCA / AV. DOCE DE ABRIL S/N Y AGUSTIN CUEVA Telf:  
074051000

**Atn:** Ing. Sandra Pesántez

**Proyecto:** Análisis en Filtro de Material Particulado

**Muestra Recibida:** 05-dic-18

**Tipo de Muestra:** 1 Muestra de Filtro

**Análisis Completado:** 14-dic-18

**Número reporte Gruentec:** 1812113-S002

<b>Rotulación Muestra:</b>	<b>MUESTRA 2 BAS</b>	<b>Método Adaptado de Referencia / Método Interno</b>
<b>Fecha de Muestreo:</b>	<b>n.d</b>	
<b>No. Reporte Gruentec:</b>	<b>1812113-S002</b>	

<b>Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en peso seco :</b>		
Acenaftaleno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Acenafteno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Antraceno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)antraceno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)pireno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(b)fluoranteno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(g,h,i)perileno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(k)fluoranteno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Criseno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Dibenzo(a,h)antraceno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Fenantreno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoranteno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoreno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Indeno(1,2,3 c,d) pireno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Naftaleno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Pireno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22

n.d - No Determinado, fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

n) Valor referencial, debido a que la matriz no es la adecuada para el método ofrecido por el laboratorio, los resultados presentados no se consideran representativos.

**INCERTIDUMBRE (U):**

HAP's = 30%

Cálculo:  $C \pm (U \times C/100)$  en donde: C=valor medido; U= incertidumbre %.

**Ing. Isabel Estrella**

**Gerente de Operaciones**

Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.

Página 1 de 1



**REPORTE DE ANÁLISIS**

**Cliente:** UNIVERSIDAD DE CUENCA  
CUENCA / AV. DOCE DE ABRIL S/N Y AGUSTIN CUEVA Telf:  
074051000

**Atn:** Ing. Sandra Pesántez

**Proyecto:** Análisis en Filtro de Material Particulado

**Muestra Recibida:** 05-dic-18

**Tipo de Muestra:** 1 Muestra de Filtro

**Análisis Completado:** 14-dic-18

**Número reporte Gruentec:** 1812113-S003

Rotulación Muestra:	MUESTRA 3 AM	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d	
No. Reporte Gruentec:	1812113-S003	
<b>Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en peso seco :</b>		
Acenaftaleno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Acenafteno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Antraceno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)antraceno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)pireno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(b)fluoranteno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(g,h,i)perileno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(k)fluoranteno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Criseno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Dibenzo(a,h)antraceno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Fenantreno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoranteno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoreno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Indeno(1,2,3 c,d) pireno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Naftaleno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22
Pireno mg/kg	<0.1 <sup>n)</sup>	EPA 8270 D / MM-S-22

n.d - No Determinado, fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

n) Valor referencial, debido a que la matriz no es la adecuada para el método ofrecido por el laboratorio, los resultados presentados no se consideran representativos.

INCERTIDUMBRE (U):

HAP's = 30%

Cálculo:  $C \pm (U \times C / 100)$  en donde: C=valor medido; U= incertidumbre %.



**Ing. Isabel Estrella**  
**Gerente de Operaciones**


Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.

Página 1 de 1

Anexo G. Reporte de análisis de cromatografía de la fracción orgánica realizada en la Universidad Técnica Particular de Loja.


		UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA			
		<b>REGISTRO DE INFORME DE RESULTADOS</b>			
		LABORATORIOS UTPL			
<b>A. DATOS DEL INFORME DE RESULTADOS</b>					
FECHA DEL INFORME:		11/04/2019		INFORME Nro.: 190HAP013	
<b>B. INFORMACIÓN DEL CLIENTE</b>					
NOMBRE:		Pamela Vazquez			
DIRECCIÓN:		Cuenca			
TELÉFONO:		0995962675		E-MAIL: pamela_vazquezg@hotmail.com	
<b>C. DATOS GENERALES DE LAS MUESTRAS</b>					
DESCRIPCIÓN:		Cromatograma Punto # 1			
FECHA DE RECEPCIÓN:		06/07/2018			
<b>D. RESULTADOS DE ANÁLISIS DE MUESTRAS EN LABORATORIO</b>					
DETERMINACIÓN	FECHA DE ENSAYO		MÉTODO	UNIDAD	RESULTADO
	INICIO	FIN			
ACENAPHTHYLENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
FLUORENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
PHENANTHRENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
ANTHRACENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
PYRENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
BENZO (A) ANTHRACENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	3.64
CHRYSENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
BENZO (B) FLUORANTHENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
BENZO (K) FLUORANTHENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
BENZO (A) PYRENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
DIBENZ (A,H) ANTHRACENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
BENZO (G,H,I) PERYLENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
INDENO (1,2,3-CD) PYRENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
<b>E. OBSERVACIONES</b>					
El informe de ensayo no se puede reproducir parcialmente, excepto en su totalidad con la aprobación escrita del laboratorio. Los resultados representan exclusivamente la muestra (s) analizada (s).					
<b>F. GLOSARIO</b>					
<: menor al límite de detección mg/l: miligramos por litro					

  
 Técnico Analista  
 Mgr. Diego Maza Estrada



FIN DEL INFORME




	<b>UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA</b>				
	<b>REGISTRO DE INFORME DE RESULTADOS</b>				
	LABORATORIOS UTPL				
<b>A. DATOS DEL INFORME DE RESULTADOS</b>					
FECHA DEL INFORME:	11/04/2019	INFORME Nro.: 190HAP014			
<b>B. INFORMACIÓN DEL CLIENTE</b>					
NOMBRE:	Pamela Vazquez				
DIRECCIÓN:	Cuenca				
TELÉFONO:	0995962675	E-MAIL: pamela_vazquezg@hotmail.com			
<b>C. DATOS GENERALES DE LAS MUESTRAS</b>					
DESCRIPCIÓN:	Cromatograma Punto # 2				
FECHA DE RECEPCIÓN:	06/07/2018				
<b>D. RESULTADOS DE ANÁLISIS DE MUESTRAS EN LABORATORIO</b>					
DETERMINACIÓN	FECHA DE ENSAYO		MÉTODO	UNIDAD	RESULTADO
	INICIO	FIN			
ACENAPHTHYLENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
FLUORENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
PHENANTHRENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
ANTHRACENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
PYRENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
BENZO (A) ANTHRACENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
CHRYSENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
BENZO (B) FLUORANTHENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
BENZO (K) FLUORANTHENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
BENZO (A) PYRENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
DIBENZ (A,H) ANTHRACENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
BENZO (G,H,I) PERYLENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
INDENO (1,2,3-CD) PYRENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
<b>E. OBSERVACIONES</b>					
El informe de ensayo no se puede reproducir parcialmente, excepto en su totalidad con la aprobación escrita del laboratorio. Los resultados representan exclusivamente la muestra (s) analizada (s).					
<b>F. GLOSARIO</b>					
<: menor al limite de detección mg/l: miligramos por litro					



Técnico Analista  
Mgtr. Diego Maza Estrada



	<b>UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA</b>				
	<b>REGISTRO DE INFORME DE RESULTADOS</b>				
	LABORATORIOS UTPL				
<b>A. DATOS DEL INFORME DE RESULTADOS</b>					
FECHA DEL INFORME:			11/04/2019		
			INFORME Nro.: 190HAP015		
<b>B. INFORMACIÓN DEL CLIENTE</b>					
NOMBRE:		Pamela Vazquez			
DIRECCIÓN:		Cuenca			
TELÉFONO:		0995962675		E-MAIL: pamela_vazquezg@hotmail.com	
<b>C. DATOS GENERALES DE LAS MUESTRAS</b>					
DESCRIPCIÓN:			Cromatograma Punto # 3		
FECHA DE RECEPCIÓN:			06/07/2018		
<b>D. RESULTADOS DE ANÁLISIS DE MUESTRAS EN LABORATORIO</b>					
DETERMINACIÓN	FECHA DE ENSAYO		MÉTODO	UNIDAD	RESULTADO
	INICIO	FIN			
ACENAPHTHYLENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
FLUORENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
PHENANTHRENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
ANTHRACENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
PYRENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
BENZO (A) ANTHRACENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
CHRYSENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
BENZO (B) FLUORANTHENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
BENZO (K) FLUORANTHENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
BENZO (A) PYRENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
DIBENZ (A,H) ANTHRACENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
BENZO (G,H,I) PERYLENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
INDENO (1,2,3-CD) PYRENE	12/12/2018	13/12/2018	Method EPA 8100 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons	mg/l	<1
<b>E. OBSERVACIONES</b>					
El informe de ensayo no se puede reproducir parcialmente, excepto en su totalidad con la aprobación escrita del laboratorio. Los resultados representan exclusivamente la muestra (s) analizada (s).					
<b>F. GLOSARIO</b>					
<: menor al límite de detección					
mg/l: miligramos por litro					



Técnico Analista  
Mgr. Diego Maza Estrada



## Anexo H. Fotografías

**REGISTRO FOTOGRÁFICO DE LA INVESTIGACIÓN  
MONITOREO-RECOLECCIÓN DE FILTROS**

Equipo y pantalla de programación del equipo muestreador de bajo caudal Partisol 2000i del Centro de Estudios Ambientales



Recolección y Almacenamiento de los filtros en el Centro de Estudios Ambientales



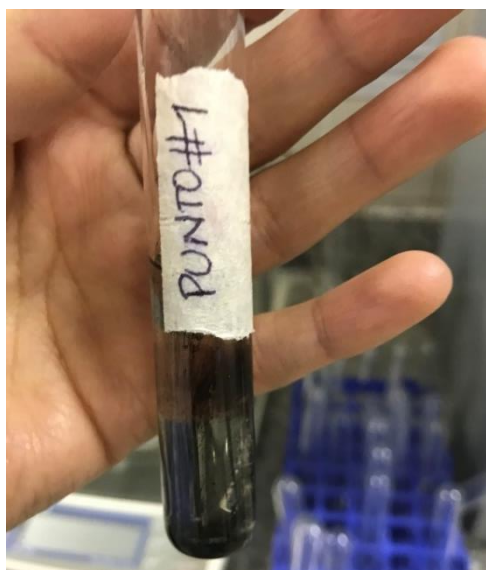
## EXTRACCIÓN DE LA FRACCIÓN ORGÁNICA



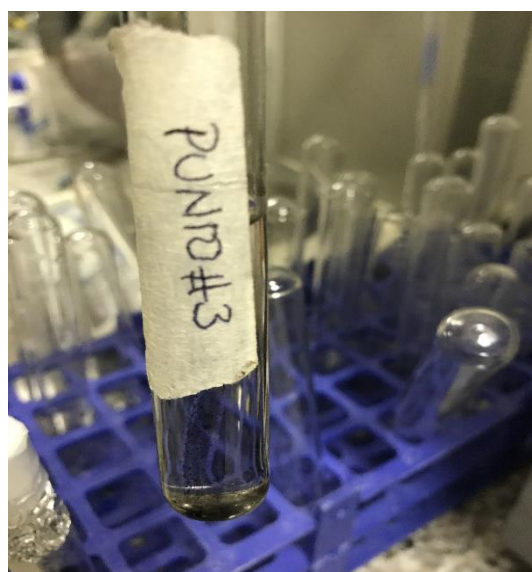
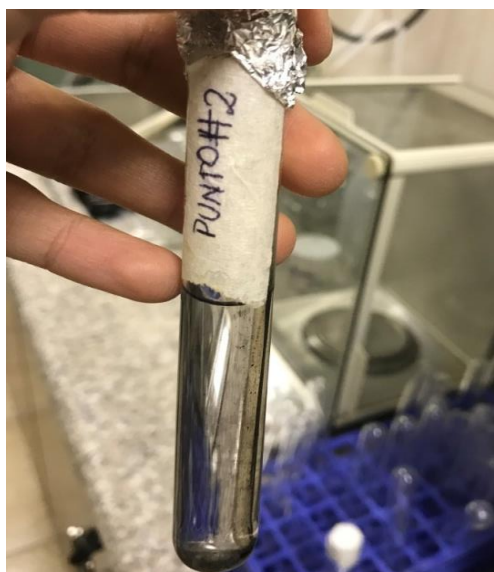
Selección de los filtros para la extracción de la fracción orgánica realizada en el Centro de Estudios Ambientales



Colocación de filtros con Diclorometano-Acetona de los tres puntos de monitor, realizado en el Centro de Estudios Ambientales



Extracción mediante sonicación de la fracción orgánica de los puntos de monitoreo, realizado en el Centro de estudios ambientales



Extracto de la fracción orgánica de los puntos de monitoreo, realizado en el Centro de Estudios Ambientales



Centrifugación para separar el material resuspendido de las muestras recolectadas en los tres puntos de monitoreo

### ENSAYO COMETA



Proceso de electroforesis con el extracto de la fracción orgánica de los tres puntos de monitoreo, realizado en la Universidad Técnica Particular de Loja





Lectura de las placas con el Software Comet Assay IV, realizado en la Universidad Técnica Particular de Loja

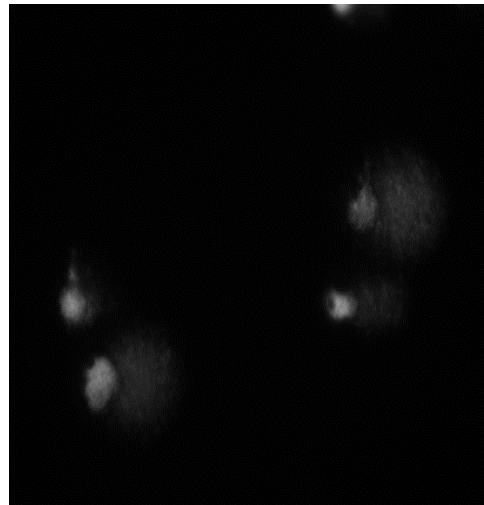


Imagen de las células sin y con daño genotóxico capturado a través de Software Comet Assay IV, realizado en la Universidad Técnica Particular de Loja

## CARACTERIZACIÓN QUÍMICA



Equipo empleado para la caracterización química realizado en la Universidad Técnica Particular de Loja.