



UNIVERSIDAD DE CUENCA
MAESTRÍA EN TOXICOLOGÍA INDUSTRIAL Y AMBIENTAL

**ESTUDIO DE GENOTOXICIDAD DEL MATERIAL PARTICULADO
(PM10) DE LA ZONA URBANA DEL CANTÓN CUENCA**

**TESIS PREVIA A LA OBTENCION DEL TITULO DE
MAGISTER EN TOXICOLOGÍA INDUSTRIAL Y AMBIENTAL**

AUTORA: ING. ANA LUCÍA ASTUDILLO ALEMÁN.

DIRECTORA: DRA. NANCY BEATRIZ GARCÍA ALVEAR. MSc.

CUENCA, ECUADOR

2014



RESUMEN

Las partículas aerodinámicas en suspensión (PM) están constituidas de una variedad de sustancias genotóxicas, capaces de poner en peligro la salud humana. El objetivo de la presente investigación fue determinar las características químicas de la solución acuosa de Material particulado PM10, recolectado en tres sitios de monitoreo de la ciudad de Cuenca, y evaluar su genotoxicidad daño al DNA, mediante el ensayo de electroforesis unicelular en células epiteliales alveolares A549, las concentraciones de material particulado fueron determinadas por análisis gravimétrico de los filtros. Para la determinación de la composición química de la suspensión acuosa del PM10 se analizó la presencia de aniones y metales pesados, mediante las técnicas de cromatografía iónica y espectroscopia de absorción atómica respectivamente. Los cultivos de las células epiteliales A549 fueron donados por el departamento de Biología Molecular y Celular de la Universidad Técnica Particular de Loja, los mismos que fueron expuestos a diferentes concentraciones (0,82; 1,25 y 1,63 m³/ml) de la solución acuosoluble de PM10, finalmente gracias al ensayo de electroforesis unicelular se determinó que los extractos acuosolubles de PM10 inducen daño celular bajo (tipo I) en las células epiteliales alveolares, lo que pudiera constituir un riesgo en la salud de la población expuesta de la ciudad de Cuenca.

PALABRAS CLAVES. Genotoxicidad, Material Particulado, Ensayo del cometa, Células Epiteliales Alveolares A549.



ABSTRACT

Atmospheric particulate matter (PM) are composed of a variety of genotoxic substances capable of endangering human health. The aim of this investigation was to determine the chemical characteristics of a PM₁₀ solution. We collected samples from three monitoring sites within the city of Cuenca, and evaluated its genotoxicity by measuring DNA damage using unicellular electrophoresis assay (comet assay) in alveolar epithelial cells A549. Deionized water solution was used to determine the chemical composition of the PM₁₀. Anions and heavy metals were analyzed using the ion chromatography techniques and atomic absorption spectroscopy respectively. A549 epithelial cell cultures, donated by the Department of Molecular and Cellular Biology from the Technical University of Loja, were exposed to different concentrations (0.82, 1.25 and 1.63 m³/ml) of the water-soluble PM₁₀ solution. Our results indicate slow genotoxicity (Type I) in all three monitoring sites, which could be a health risk to the exposed population of the city of Cuenca.

KEYWORDS: Genotoxicity, Particulate Matter, Comet Assay, A549 Alveolar, Epithelial Cells.



TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	¡Error! Marcador no definido.
ABSTRACT	2
TABLA DE CONTENIDOS	3
CLAUSULA DE RESPONSABILIDAD	6
DERECHOS DE AUTOR	7
AGRADECIMIENTO	8
DEDICATORIA	9
ÍNDICE DE TABLAS	10
ÍNDICE DE FIGURAS	11
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA	14
GLOSARIO	15
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN	16
CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA:	19
2.1.1 CONTAMINACIÓN DEL AIRE:.....	19
2.2 MATERIAL PARTICULADO ATMOSFERICO:	20
2.2.1 MATERIAL PARTICULADO PM10.....	21
2.2.2 FUENTES DE MATERIAL PARTICULADO.....	21
2.2.3 COMPOSICIÓN ELEMENTAL DEL MATERIAL PARTICULADO	23
2.3 IMPACTO DE LA CONTAMINACIÓN POR PARTÍCULAS ATMOSFERICAS EN LA SALUD HUMANA Y PÚBLICA.	34
2.4 ESTÁNDARES DE CALIDAD DEL AIRE PARA MATERIAL PARTICULADO PM10.....	37
2.5 MECANISMO DE DEPOSICIÓN DE AEROSOLES EN EL SISTEMA RESPIRATORIO	39
2.6 TOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DEL MATERIAL PARTICULADO.....	42
2.7 ADN Y GENOTOXICIDAD.....	45
2.8 BIOMARCADORES: INDICADORES DE DAÑO GENÉTICO	50
2.9 PRUEBA DE GENOTOXICIDAD: ENSAYO DEL COMETA.....	53
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	55
3.1 METODOLOGÍA	55



3.2	AREA DE ESTUDIO	55
3.2.1	LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA	55
3.2.2	ASPECTOS DEMOGRÁFICOS.....	56
3.2.3	CARACTERÍSTICAS CLIMATICAS	57
3.3	DISEÑO DEL ESTUDIO.....	57
3.4	SELECCIÓN DE LOS SITIOS DE MONITOREO Y RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	59
3.4.1	DESCRIPCIÓN DE LOS SITIOS DE MONITOREO.....	59
3.4.2	RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE PM10	61
3.4.2.1	ESTABILIZACIÓN DE FILTROS Y CORRECIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE PM10.....	63
3.5	ANÁLISIS QUÍMICO.....	64
3.6	PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSOLUBLE DE MATERIAL PARTICULADO	65
3.7	ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR.....	66
3.7.1	MODELO BIOLÓGICO	66
3.7.2	CONDICIONES DEL CULTIVO	66
3.7.3	CONTEO CELULAR.....	67
3.7.4	PROTOCOLO.....	67
3.8	PRUEBA DE GENOTOXICIDAD ENSAYO DEL COMETA.....	68
3.9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	69
3.9.1	VIABILIDAD CELULAR	69
3.9.2	ENSAYO COMETA	69
	CAPITULO IV: RESULTADOS	70
4.1	CONCENTRACIÓN DE MATERIAL PARTICULADO.....	70
4.2	RELACIÓN ENTRE EL MATERIAL PARTICULADO Y LAS CONDICIONES METEOROLÓGICAS.	75
4.3	CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL PARTICULADO	79
4.4	ACTIVIDAD GENOTÓXICA DE LAS SOLUCIONES ACUOSOLUBLES DE MATERIAL PARTICULADO PM10, EN LA LÍNEA CELULAR (A549).	82
4.4.1	VIABILIDAD DE LAS SOLUCIONES ACUOSOLUBLES DE MATERIAL PARTICULADO PM10, EN LA LÍNEA CELULAR (A549).....	83
4.4.2	LARGO DE COLA CON LAS SOLUCIONES ACUOSOLUBLES DE PM10. .	87
4.4.3	DETERMINACIÓN DE LA CATEGORÍA DE DAÑO CELULAR.	93



CAPITULO V: DISCUSIÓN	94
5.1 COMPARACIÓN CON RESPECTO A LA NORMA ECUATORIANA.	94
5.2 CONDICIONES METEOROLÓGICAS.....	95
5.3 RELACIÓN ENTRE EL MATERIAL PARTICULADO Y LAS CONDICIONES METEOROLÓGICAS.	96
5.4 EVALUACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL MATERIAL PARTICULADO PM10.....	94
5.5 ACTIVIDAD GENOTÓXICA DE LAS SOLUCIONES ACUOSOLUBLES DE PM10.....	102
5.5.1 VIABILIDAD DE: SOLUCIÓN ACUOSOLUBLE DE PM10.....	102
5.5.2 LARGO DE COLA CON LA SOLUCIÓN ACUOSOLUBLE DE PM10 EN EL PUNTO P1.....	104
5.5.3 LARGO DE COLA CON LA SOLUCIÓN ACUOSOLUBLE DE PM10 EN EL PUNTO P2.....	104
5.5.4 LARGO DE COLA CON LA SOLUCIÓN ACUOSOLUBLE DE PM10 EN EL PUNTO P3.....	105
5.6 CATEGORÍA DE DAÑO CELULAR.....	106
5.7 IDENTIFICACIÓN DEL RIESGO.....	110
CAPITULO VI:	112
CONCLUSIONES.....	112
RECOMENDACIONES	114
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	115
ANEXOS.....	119



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

Yo, ANA LUCÍA ASTUDILLO ALEMÁN, autora de la tesis "ESTUDIO DE GENOTOXICIDAD DEL MATERIAL PARTICULADO (PM10) DE LA ZONA URBANA DEL CANTÓN CUENCA", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 16 de abril del 2014

Ana Lucía Astudillo Alemán

C.I: 0103681557



Universidad de Cuenca
Clausula de derechos de autor

Yo, ANA LUCÍA ASTUDILLO ALEMÁN, autora de la tesis "ESTUDIO DE GENOTOXICIDAD DEL MATERIAL PARTICULADO (PM10) DE LA ZONA URBANA DEL CANTÓN CUENCA", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de MAGÍSTER EN TOXICOLOGÍA INDUSTRIAL Y AMBIENTAL. El uso que la Universidad de Cuenca hiciera de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 16 de abril del 2014

Ana Lucía Astudillo Alemán

C.I: 0103681557



AGRADECIMIENTO

Deseo expresar mis más sinceros y profundos agradecimientos al Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca, en la persona de la Dra. Nancy García A. MSc, por impulsar la investigación y formación integral de sus colaboradores en la búsqueda del saber y en especial por brindarme su dirección en la realización del presente proyecto de investigación. Al Centro de Biología Celular y Molecular de la Universidad Técnica Particular de Loja en la persona de la Dra. Natalia Bailón Moscoso por su colaboración desinteresada y conocimiento sobre el tema a realizarse, con su acertada asesoría clara y eficaz para culminar satisfactoriamente la investigación desarrollada. A la Bq. María Isabel Ramírez, a los estudiantes Israel Gutiérrez y Gabriela González por su asesoría, apoyo y su confianza otorgada en todo momento. Al Centro de Servicios y Análisis de Minerales Metálicos y No Metálicos, en la persona de la Ing. Catalina Peñaherrera por su apoyo en la realización de la presente investigación. A mis maestros y amigos por compartir sus experiencias y conocimientos de tipo profesional y personal que fueron de gran valor.

Ana Lucía



DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada a papito Dios por sus bendiciones diarias, por permitirme esforzarme y ser valiente no temer ni desmayar.

A mi esposo Juan Oswaldo, que siempre estuvo apoyándome en el desarrollo de este proyecto, por su paciencia, amor y ayuda incondicional.

A mis amados Padres Amable y Hortensia, quienes me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos.

A María Eugenia y Xavier por estar siempre presentes, acompañándome para poderme realizar. A mis sobrinos María Gracia, María Celeste, Milena y Joaquín quienes ha sido mi motivación, inspiración y felicidad.

Ana Lucía



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Modificaciones en la estructura del DNA causado por genotóxicos...	47
Tabla 2:	Concentraciones de Material Particulado registradas en la Ciudad de Cuenca (2008).....	50
Tabla 3:	Localización de los sitios de monitoreo.....	59
Tabla 4:	Período de monitoreo de Material Particulado PM10 en la ciudad de Cuenca- Año 2013.....	63
Tabla 5:	Concentraciones de Material Particulado (PM10) en la zona Urbana del Cantón Cuenca en $\mu\text{g}/\text{m}^3$	75
Tabla 6:	Concentraciones de Metales pesados presentes en las muestras de PM10 recolectadas en los puntos de monitoreo (Primera Etapa).....	79
Tabla 7:	Concentraciones de metales pesados presentes en las muestras de PM10 recolectadas en los puntos de monitoreo (Segunda Etapa)....	79
Tabla 8:	Concentraciones de aniones presentes en las muestras de PM10 recolectadas en los puntos de monitoreo (Primera Etapa).....	81
Tabla 9:	Concentraciones de aniones presentes en las muestras de PM10 recolectadas en los puntos de monitoreo (Segunda Etapa).....	82
Tabla 10:	Porcentajes de viabilidad de las células A549, tratadas con diferentes dosis de solución acuosa de PM10.....	89
Tabla 11:	Genotoxicidad (expresadas en longitud de cola, μm) de tres experimento, en células epiteliales alveolares A549, expuestos a diferentes dosis de material particulado PM10 de la ciudad de Cuenca.....	93



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Mecanismo de deposición de aerosoles en el sistema respiratorio....	39
Figura 2:	Diagrama del proceso de desplazamiento de partículas gruesa, finas y ultrafinas.....	43
Figura 3:	Estructura química del DNA y puntos vulnerables al ataque en la biomolécula por especies químicas reactivas.....	48
Figura 4:	Localización de la ciudad Cuenca- Ecuador.....	56
Figura 5:	Esquema planteado para el ensayo de viabilidad y genotoxicidad con el extracto acuoso de las muestras de material particulado recolectado en el cantón Cuenca.....	58
Figura 6:	Localización de los puntos de monitoreo para la recolección de las muestras de PM10.....	61
Figura 7:	Equipo de muestreo de bajo caudal F y J modelo LV-2.....	62
Figura 8:	Línea Celular A549.....	66
Figura 9:	Concentraciones de Material Particulado PM10. P1 Primera Etapa. (11/01/2013 - 21/02/2013).....	71
Figura 10:	Concentraciones de Material Particulado PM10. P1 Segunda Etapa (22/02/2013 – 04/04/2013).....	71
Figura 11:	Concentraciones de Material Particulado PM10. P2 Primera Etapa. (05/04/2013 al 24/05/2013).....	72
Figura 12:	Concentraciones de Material Particulado PM10. P2 Segunda Etapa. (27/05/2013 al 05/07/2013).....	72
Figura 13:	Concentraciones de Material Particulado PM10. P3 Primera Etapa. (19/08/2013 al 27/09/2013).....	74
Figura 14:	Concentraciones de Material Particulado PM10. P3 Segunda Etapa. (30/09/2013 al 08/11/2013).....	74
Figura 15:	Evolución de la concentración de material particulado PM10 en función de las condiciones meteorológicas punto P1 (Primera Etapa).....	76
Figura 16:	Evolución de la concentración de material particulado PM10 en función de las condiciones meteorológicas punto P1 (Segunda	



	Etapa).....	76
Figura 17:	Evolución de la concentración de material particulado PM10 en función de las condiciones meteorológicas punto P2 (Primera Etapa).....	77
Figura 18:	Evolución de la concentración de material particulado PM10 en función de las condiciones meteorológicas punto P2 (Segunda Etapa).....	77
Figura 19:	Evolución de la concentración de material particulado PM10 en función de las condiciones meteorológicas punto P3 (Primera Etapa).....	78
Figura 20:	Evolución de la concentración de material particulado PM10 en función de las condiciones meteorológicas punto P3 (Segunda Etapa).....	78
Figura 21:	Variación de la concentración de metales presentes en las muestras de PM10 durante la primera etapa.....	80
Figura 22:	Variación de la concentración de metales presentes en las muestras de PM10 durante la segunda etapa.....	80
Figura 23:	Variación de la concentración de aniones en las muestras de PM10 durante la primera etapa.....	83
Figura 24:	Variación de la concentración de aniones en las muestras de PM10 durante la segunda etapa.....	83
Figura 25:	Viabilidad celular Punto P1 (Primera Etapa).....	86
Figura 26:	Viabilidad celular Punto P1 (Segunda Etapa).....	86
Figura 27:	Viabilidad celular Punto P2 (Primera Etapa).....	87
Figura 28:	Viabilidad celular Punto P2 (Segunda Etapa).....	87
Figura 29:	Viabilidad celular Punto P3 (Primera Etapa).....	88
Figura 30:	Viabilidad celular Punto P3 (Segunda Etapa).....	88
Figura 31:	Efecto genotóxico en células epiteliales alveolares A549, tratadas con diferentes concentraciones de solución acuosa de PM10. Prueba de Kruskal-Wallis(***P<0,0001). Punto P1 (Primera Etapa)...	90
Figura 32:	Efecto genotóxico en células epiteliales alveolares A549, tratadas con diferentes concentraciones de solución acuosa de PM10.	



- Prueba de Kruskal-Wallis(***P<0,0001). Punto P1(Segunda Etapa).. 90
- Figura 33:** Efecto genotóxico en células epiteliales alveolares A549, tratadas con diferentes concentraciones de solución acuosa soluble de PM10. Prueba de Kruskal-Wallis(***P<0,0001). Punto P2(Primera Etapa)... 91
- Figura 34:** Efecto genotóxico en células epiteliales alveolares A549, tratadas con diferentes concentraciones de solución acuosa soluble de PM10. Prueba de Kruskal-Wallis(***P<0,0001). Punto P2(Segunda Etapa).. 91
- Figura 35:** Efecto genotóxico en células epiteliales alveolares A549, tratadas con diferentes concentraciones de solución acuosa soluble de PM10. Prueba de Kruskal-Wallis(***P<0,0001). Punto P3 (Primera Etapa)... 92
- Figura 36:** Efecto genotóxico en células epiteliales alveolares A549, tratadas con diferentes concentraciones de solución acuosa soluble de PM10. Prueba de Kruskal-Wallis(***P<0,0001). Punto P3 (Segunda Etapa). 92



ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

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

CH: Centro Histórico

CORPAIRE: Corporación para el Mejoramiento del Aire de Quito.

DNA: Acido Desoxirribonucleico

ELF: Fluido de recubrimiento epitelial

EPA: Agencia de Protección Ambiental

FDA/EtBr: Diacetato de fluoresceína-Bromuro de Etidio

IARC: Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer

INEC: Instituto Nacional de Estadísticas y Censos

NAAQS: Normas nacionales de calidad de aire ambiente establecidas por Agencia de Estados Unidos.

NIOSH: Instituto Nacional de Seguridad y Salud Ocupacional

OAE: Organismo de Acreditación Ecuatoriano

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PA: Partículas Atmosféricas

PM: Material Particulado

PM10: Material Particulado de diámetro aerodinámico menor a 10 micrones.

ROS: Especies reactivas de Oxígeno

SCG: Electroforesis alcalina en gel de células individuales

USEPA: Agencia de Protección Ambiental de los estados Unidos



GLOSARIO

Apoptosis.- Muerte celular programada.

Biomarcador.- Es aquella sustancia utilizada como indicador de un estado biológico.

Citotóxico.- Compuesto perjudicial o destructor para las células del organismo.

Especie Reactiva de Oxígeno.- (ERO o ROS por reactive oxygen species) incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto inorgánicos como orgánicos. Son generalmente moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada. Estas especies se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen un importante papel en la señalización celular. Sin embargo, en épocas de estrés ambiental sus niveles pueden aumentar en gran manera, lo cual puede resultar en daños significativos a las estructuras celulares. Esto lleva en una situación conocida como estrés oxidativo.

Genotoxicidad.- Característica de una sustancia que puede dañar al DNA. Los agentes genotóxicos pueden ser mutagénicos y/o carcinogénicos.

Material Particulado.- Consisten en acumulación de diminutas piezas de sólidos o de gotitas de líquidos en la atmósfera ambiental, generada a partir de alguna actividad antropogénica.

In vitro.- Se refiere a una técnica para realizar un determinado experimento en un tubo de ensayo, o generalmente en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.

Viabilidad celular.- Determinación de si una población de células está viva o muerta.



CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

El elevado estándar de vida de la sociedad, se debe en gran parte al desarrollo tecnológico, el cual ha provocado un crecimiento industrial acelerado, esto junto con el crecimiento demográfico son factores que contribuyen a la liberación y descarga incontrolada de gran cantidad y variedad de compuestos al ambiente, lo que altera las concentraciones naturales, provocando problemas de contaminación atmosférica cuando se supera la capacidad del aire para regenerar y amortiguar los efectos sobre los seres vivos y los materiales.

El material particulado, constituye uno de los principales problemas de contaminación. García, 2008 et al. cita a Shwartz et al. 1996 quienes manifiestan que numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que el incremento en la exposición a partículas atmosféricas puede provocar un aumento en la morbilidad y mortalidad del hombre.

El material particulado aerotransportado, contiene un gran número de sustancias genotóxicas, que ponen en peligro la salud humana, así varios estudios utilizando diferentes ensayos a corto plazo han proporcionado evidencia del potencial mutagénico/genotóxico de los extractos de partículas en el aire.

Gutiérrez, et al., 2006 indican que con el objeto de reducir los riesgos a la salud por la inhalación de las partículas atmosféricas los estándares de calidad del aire para partículas atmosféricas han evolucionado hacia regulaciones cada vez más estricta; Sahagún, 2009 cita a la Agencia Nacional de los Estados Unidos (USEPA) quien manifiesta que las partículas suspendidas PM₁₀ ($\leq 10\mu\text{m}$) y PM_{2,5} ($\leq 2.5\mu\text{m}$), se encuentran consideradas como contaminantes críticos por su presunta contribución en la mortalidad y morbilidad en efectos a largo plazo con el decremento en la función pulmonar y cáncer.

Es importante que para la estimación del impacto, ocasionado por las partículas atmosféricas se considere la evaluación del riesgo genotóxico/carcinógeno, sobre todo porque se ha determinado que las partículas atmosféricas, particularmente las emisiones derivadas de la quema de combustibles fósiles, contienen miles de compuestos adsorbidos en la superficie, muchos de los



cuales está documentado que son mutágenos y/o carcinógenos conocidos como hidrocarburos poliaromáticos (HPAs) sus óxidos y nitro-derivados, algunos metales como el níquel, cromo y otros más como el vanadio, de los cuales se sospecha pueden tener propiedades carcinogénicas, porque inducen daño en el (DNA). Partiendo de esta base Sahagún, 2009 cita a Pope et al., 2002 quienes han sugerido que la combinación de compuestos orgánicos como los HPAs, sus metabolitos o algunos de sus derivados (como los radicales tipo quinonas) y algunos metales pueden conducir a interacciones que resulten en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o otras especies biológicamente activas, y presentar un posible mecanismo en la génesis de cáncer debido a la exposición de las partículas atmosféricas.

Olivos, 2004 en una de sus investigaciones que tenía como objetivo evaluar las especies químicas acuosolubles orgánicas y/o macromoléculas asociadas a las partículas atmosféricas de la Zona Metropolitana del Valle de México concluye que existe presencia de actividad redox en las partículas atmosféricas de la zona metropolitana del valle de México que apoyan la hipótesis de que las partículas atmosféricas contienen moléculas oxidativas altamente reactivas, tipo quinonas.

Algunos estudios han documentado lesiones oxidativas al DNA y su relación con diversas características de las partículas atmosféricas. Hay evidencia de que las fracciones de partículas atmosféricas de diferentes tamaños y sus componentes acuo y/o orgánico solubles e insolubles pueden producir ROS independientemente uno del otro. Los metales solubles en agua asociados a las partículas atmosféricas, como V, Fe, Ni, Cr, Cu, Zn y Mn son capaces de promover la reacción de Fenton y Haber Weiss para generar el radical hidroxilo.

El estudio de los daños inducido al DNA por las partículas atmosféricas se realiza a través de diferentes ensayos biológicos. Generalmente se aplican pruebas en cultivos puros de un tipo único (cultivos primarios o líneas celulares) que emplean un solo compuesto químico o solubilizan extractos de varios compuestos químicos en el medio de cultivo, además existen pruebas *in vivo*, que se emplean como pruebas preliminares para proceder a plantear en definitiva un estudio *in vivo*, tal es el caso de los ensayos de genotoxicidad *in vitro*.



Con lo fundamentado anteriormente la presente investigación permitió determinar en un estudio *in vitro* el efecto genotóxico de la suspensión acuosa del material particulado PM10 recolectado en diferentes sitios de muestreo de la ciudad de Cuenca, sobre cultivos de células epiteliales alveolares A549.

La investigación fue desarrollada gracias al Convenio Específico de Cooperación entre el Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca y la Universidad Técnica Particular de Loja, Instituciones que tienen intereses comunes en investigación, específicamente en el desarrollo de líneas tales como la: Genotoxicidad, Toxicología industrial y ambiental, entre otras.

La presente investigación es de tipo experimental, en la que se aplicó el método científico descriptivo analítico; se consideró como variable independiente los puntos de muestreo y como variables dependientes el % de viabilidad celular y el largo de cola del cometa, además la investigación aplicó el método inductivo.

Para la investigación se planteó el siguiente Objetivo General:

- ✚ Determinar el nivel de genotoxicidad del material particulado (PM10) que se genera como contaminante del aire de la ciudad de Cuenca.

La Hipótesis planteada fue la siguiente:

- ✚ El material particulado (PM10) que respiran los ciudadanos de Cuenca tiene un efecto genotóxico.

Los objetivos específicos propuestos fueron:

- ✚ Establecer la composición química del PM10 originado en diferentes puntos de la ciudad de Cuenca.
- ✚ Recolectar muestras de material particulado PM10 en diferentes puntos de la ciudad de Cuenca y analizar su composición química.
- ✚ Identificar mediante una técnica "*in vitro*" el nivel de afección en el DNA de las células A549.
- ✚ Determinar el riesgo genotoxicológico al que están expuestos los habitantes de la ciudad al respirar aire contaminado con PM10.



CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA:

2.1.1 CONTAMINACIÓN DEL AIRE:

Aunque el aire es un bien precioso, a menudo está cargado con muchas causas potenciales de enfermedad. Los microorganismos que transporta el aire y que contaminan los alimentos y el agua han sido mucho tiempo causas fundamentales de morbilidad, especialmente en los países en desarrollo. Más extensos son los contaminantes químicos y partículas que se encuentran en el aire, especialmente en las naciones industrializadas.

Se ha definido la contaminación del aire de diferentes formas. En un sentido es la adición a la atmósfera de cualquier material o energía que degrada el ambiente para los humanos y otros organismos. Eldon et al. (2006).

Otros autores manifiestan que la “contaminación atmosférica” hace referencia a sustancias que ocasionan daños directos sobre animales, plantas y personas; es decir ejercen un efecto local o regional. Spiro et al. (2004).

Existe una gran cantidad de sustancias químicas que pueden contaminar el aire, las más comunes son:

- Monóxido de carbono (CO)
- Dióxido de Carbono (CO₂)
- Metales pesados
- Ozono
- Material particulado
- Óxidos de nitrógeno (NO_x)
- Dióxido de azufre (SO₂)
- Compuestos Orgánicos Volátiles (COV's)



2.2 MATERIAL PARTICULADO ATMOSFERICO:

El material particulado es uno de los contaminantes atmosféricos más complejos por sus características físicas (distribución de tamaño de partícula, morfología, y densidad), por sus características químicas (compuestos orgánicos e inorgánicos, metales y contaminantes primarios y secundarios), por sus efectos sobre la salud humana, los ecosistemas y el clima. Angulo et al. (2011).

Se engloba bajo este nombre al conjunto de diminutas partículas sólidas y pequeñas gotas de líquido que se hallan presentes en el aire y que son causan en muchas ocasiones de graves problemas de contaminación. Alley, (2001).

Generalmente la simbología que se emplea para referirse al material particulado es PM, por sus siglas en inglés (particulate matter), si este símbolo va acompañado de un número, indicará el diámetro de la partícula.

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), define al material particulado como una mezcla compleja de partículas extremadamente pequeñas y líquidas. Estas partículas tienen como parte de su composición: ácidos (como nitratos y sulfatos), productos químicos orgánicos, metales, y tierra o polvo.

Arciniégas, (2011), define el material particulado como un conjunto de partículas sólidas y/o líquidas (a excepción del agua pura) presentes en suspensión en la atmósfera, que se originan a partir de una gran variedad de fuentes naturales o antropogénicas y poseen un amplio rango de propiedades morfológicas, físicas, químicas y termodinámicas.

El tamaño de las partículas está directamente relacionado con su potencial para causar problemas de salud. La EPA muestra preocupación por las partículas de diámetro igual o menor a 10 micras, porque estas, son las partículas que generalmente pasan por la garganta, la nariz y entrar en los pulmones. Una vez inhaladas, estas partículas pueden afectar el corazón, los pulmones y causar efectos graves para la salud.



El parámetro indicador de este tipo de contaminación es independiente de la naturaleza química de las partículas, por lo que su concentración se expresa en mg o μg de partículas / m^3 de aire, no pudiendo hacerse en este caso la equivalencia correspondiente a ppm o ppb. Heredia et al. (2008).

2.2.1 MATERIAL PARTICULADO PM10

La Agencia de Protección Ambiental de California, (2012), define el PM10 como partículas sólidas o líquidas, como polvo, cenizas, hollín, partículas metálicas, cemento o polen dispersos en la atmósfera, cuyo diámetro es inferior a $10\mu\text{m}$, las mismas que están formadas principalmente por compuestos inorgánicos como silicatos y aluminatos, metales pesados entre otros y material orgánico asociado a partículas de carbono (hollín). Dentro de los metales pesados, los más relevantes desde un punto de vista toxicológico son el arsénico, cadmio, cobre mercurio, plomo, entre otros.

El PM10 es aquel con partículas gruesas en su mayoría de pH básico producto de la combustión no controlada.

2.2.2 FUENTES DE MATERIAL PARTICULADO

En la naturaleza, el material particulado se forma de muchos procesos, tales como el viento, polinización de las plantas e incendios forestales, aunque su efecto se ve incrementado por actividades humanas que implican el cambio de uso de suelo. Castañeda, (2006).

Es conveniente aclarar algunos términos que con frecuencia se emplean al hablar de contaminación por partículas entre estos se mencionan el polvo, los vapores, la niebla, el smog, humos, humo industrial y bruma. Moreno (2003), define estos términos de la siguiente forma:



Polvo: consiste en un aerosol de partículas sólidas producidas por medios mecánicos, como el machacado, la molienda o la meteorización natural del suelo.

La diferencia fundamental entre las partículas de polvo y el material del que proceden es su tamaño y, por consiguiente, su mayor desarrollo superficial medido por su superficie específica, que influye poderosamente en su toxicidad y otras características peligrosas, como su explosividad. Como ejemplos medioambientales de polvo se puede citar las cenizas volcánicas, la carbonilla y los insecticidas sólidos pulverizados.

Vapores: conocidos como humos metálicos, son aerosoles constituidos por partículas muy finas procedentes de la vaporización y ulterior condensación de sólidos. Uno de los ejemplos más claros de formación de vapores es la fusión de metales a alta temperatura en su producción metalúrgica o en procesos de soldadura, en los que una fracción de metal se volatiliza. Al enfriarse, el vapor metálico forma gotículas esféricas líquidas que se solidifican manteniendo su forma.

Si el medio es oxidante, el metal suele transformarse en partículas muy finas de óxido, acompañadas de otros elementos condensables. Su inhalación puede ser causa de numerosos efectos tóxicos.

La **niebla**: está constituida por aerosoles de gotículas esféricas de menor tamaño, formadas por condensación a partir de la fase de vapor.

El **smog**: es el término con que suele describirse el aerosol fotoquímico característico de la contaminación atmosférica de tipo oxidante.

Humos: son mezclas complejas de partículas sólidas y líquidas, gases y vapores formados en la combustión incompleta de la materia orgánica.

Humo Industrial: es la suspensión de partículas sólidas o líquidas debidas a la condensación de vapores producidos en procesos industriales.



Bruma: suspensión de pequeñas gotas líquidas, originadas por condensación de vapores o por dispersión de agua o evaporación de aceites esenciales de la vegetación, visibles a simple vista.

2.2.3 COMPOSICIÓN ELEMENTAL DEL MATERIAL PARTICULADO

Las partículas presentes en el aire pueden tener una composición muy diversa.

Parra, et al. (2010) citan a la EPA (2004) quienes indican que la mayoría de los estudios de especiación química del PM evidencian una dependencia entre tamaño y composición química de las partículas, sulfato, amonio, ión hidrógeno, carbón elemental, componentes secundarios, especies orgánicas primarias de quemaduras y combustión y ciertos metales de transición son predominantes en la fracción fina del PM. Elementos de la corteza como calcio, aluminio, sílice, magnesio, hierro y materia orgánica (polen, esporas, restos de plantas y animales) son predominantes en la fracción gruesa del PM, los nitratos y el potasio pueden ser encontrados en ambas fracciones.

Cheung et al. (2011) en su investigación denominada variación temporal y espacial de la composición química del material particulado grueso en el área de los Ángeles, concluyen que una fracción importante presente en la masa del material particulado está constituida por materiales de la corteza y otros oligoelementos, además manifiestan que el PM tiene como parte de su composición iones secundarios (nitrato, sulfato y amonio) los mismos que contribuyen de manera significativa, con una relación media de 22,6%, otros compuestos presentes en el PM son los compuestos carbonosos que comprenden una parte sustancial de las partículas gruesas, la materia orgánica contribuye con un 19,7%, mientras que el carbono elemental se presenta en menor concentración con un promedio igual al 1,1% ; finalmente otra fracción importante la constituyen las partículas de sal marina que representan un fracción de masa promedio igual al 9,14%.



Las partículas atmosféricas contienen iones inorgánicos, componentes metálicos, carbón elemental, compuestos orgánicos y compuestos en forma de cristales.

El creciente interés existente en la actualidad por la investigación en el campo del material particulado atmosférico se debe a la identificación de efectos adversos de este contaminante sobre la salud humana y los ecosistemas.

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 por un lado determinar, el potencial efecto en la salud humana por la presencia de sustancias tóxicas y cancerígenas adheridas a este material.

Los resultados alcanzados de la Investigación desarrollada por la Corporación para el Mejoramiento del Aire de Quito- CORPAIRE en el año 2006, que tenía entre sus objetivos caracterizar químicamente muestras de PM10 para determinar los contenidos de carbón total, polvo mineral e iones, muestran que el principal componente es el polvo mineral (41%). Seguido por 31% de carbón total, 25% de iones y 3% de componentes no identificados, dentro de los iones se cuantificaron sulfatos, nitratos, amonio y cloruros, observándose claramente el efecto del alto contenido de azufre en los combustibles utilizados en el Distrito Metropolitano de Quito y la influencia de los gases emitidos por los volcanes activos, el 52% de los iones son sulfatos, esto corresponde al 13% del total del material particulado.

Estudios desarrollados por el Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca, referente a la evaluación del riesgo de exposición a sustancias tóxicas procedentes de la contaminación atmosférica en la ciudad de Cuenca, concluye: que el material particulado presente en el aire ambiente de la ciudad de Cuenca, tiene como parte de su composición química metales como el aluminio, cromo, cadmio, cobre, hierro, zinc, plomo, níquel y manganeso. Los metales están presentes en pequeñas cantidades entre 1 y 2% en peso en el material particulado (sedimentable y PM10). Jachero et al. (2009).



De todo lo fundamentado anteriormente se deduce que el material particulado atmosférico presenta una naturaleza y una composición química muy variada, relacionada con el origen de éste.

En cuanto a las especies de carácter no biológico, se puede hablar de:

Metales

La corteza terrestre contiene varios metales que, ya desde tiempos remotos, han resultado de gran importancia en el desarrollo y progreso de las civilizaciones, hasta el punto que sería muy difícil imaginar nuestra sociedad actual sin un extenso empleo de utensilios y herramientas elaboradas con metales.

De los elementos químicos que hoy conocemos, aproximadamente un 75% son metales, de entre los que destacan los denominados metales pesados, que presentan una densidad elevada y cierta toxicidad para el ser humano. Los metales están siempre presentes en nuestro ambiente debido tanto a fuentes naturales como antropogénicas. Esta ubicación hace que estos elementos se encuentren prácticamente en todos los organismos vivos, donde ejercen un amplio rango de funciones biológicas importantes tales como componentes enzimáticos y sistemas de óxido reducción, activadores enzimáticos, etc., sin embargo hay una serie de elementos que en alguna de sus formas químicas puede suponer un serio problema para la salud de la población y el medioambiente. Desde el punto de vista biológico y toxicológico los metales pueden ser clasificados en cuatro grupos: (1) metales con toxicidad aparente y con amplia distribución en el ambiente (arsénico, cadmio, plomo, mercurio y uranio); (2) metales traza esenciales (cromo, cobalto, manganeso, selenio y zinc); (3) otros metales con importancia biológica (níquel y vanadio); y metales con interés farmacológico (aluminio, galio, litio y platino). Carmona, (2009).

Toxicidad de los metales

Distintos metales han sido detectados en concentraciones pequeñas en la atmósfera.



Los más abundantes son: el calcio, aluminio, plomo y hierro, en proporciones más pequeñas se encuentran: sodio, potasio, vanadio, magnesio, cobre, cromo y manganeso. Capo, (2002).

A continuación se resume la toxicidad de algunos metales pesados asociados con efectos perjudiciales en el ser humano.

Cromo

Moreno, (2003) manifiesta que el cromo puede encontrarse en distintos estados de oxidación, en el intervalo +2 a +6, si bien los estados de oxidación relevantes desde el punto de vista biológico son +3 y +6. El cromo es relativamente abundante en la corteza terrestre. En el aire el cromo se encuentra en forma particulada y su comportamiento depende fundamentalmente del tamaño de partícula y su densidad.

En condiciones oxidantes, el cromo puede encontrarse en el estado de oxidación (VI), en las formas CrO_4^{2-} y HCrO_4^- . El cromo (VI) es más móvil, ya que se trata de una especie relativamente soluble en agua, cuya movilidad aumenta con el pH del medio. El cromo trivalente es un nutriente esencial para todos los vertebrados, debido al papel que desempeña en el mantenimiento de la tolerancia a la glucosa. El cromo hexavalente cruza con facilidad las membranas celulares, si bien su carácter corrosivo provoca la irritación de los tejidos expuestos y puede incluso producir necrosis en concentraciones elevadas. La absorción del cromo es más rápida en el intestino que en el estómago. Tras su absorción, el cromo se distribuye preferentemente a los pulmones, donde alcanza una concentración 2-3 veces superiores a la del resto de los tejidos. La excreción del cromo tiene lugar principalmente a través de la orina, seguida por la excreción biliar. Una pequeña parte se excreta mediante la leche, el sudor, el pelo y las uñas.

Moreno también expone que los efectos agudos más importantes de la ingestión de dosis de cromo hexavalentes son las lesiones renales, en glomérulos y túbulo. Dado el carácter corrosivo del cromo hexavalente, la exposición dérmica y por inhalación de forma crónica conduce a la ulceración y perforación del tabique nasal,



así como de otras regiones cutáneas expuestas. El cromo (VI) está clasificado como agente cancerígeno del Grupo 1 por la IARC (Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer), cuando la exposición se produce por vía inhalatoria. Se considera que existen evidencias suficientes de sus efectos cancerígenos sobre personas, obtenidos a partir de estudios epidemiológicos realizados en el medio laboral, en los que se ha demostrado la asociación causal entre la exposición a cromo (VI) por inhalación y el cáncer de pulmón. En animales de laboratorio, la evidencia se considera asimismo suficiente, habiéndose demostrado la inducción de cáncer de varios tipos por la exposición a cromo hexavalente.

Moreno, (2003) manifiesta que los ensayos *in vitro* realizados sugieren que el mecanismo de inducción del cáncer consiste en la reducción intracelular a cromo trivalente, seguida por la aparición de mutaciones por oxidación del DNA. El cromo (VI) atraviesa rápidamente la membrana celular por acción del sistema transportador de sulfato. En el interior de la célula se reduce de forma enzimática (citocromo P-450, glutatión reductasa) y no enzimática (ácido ascórbico) a formas intermedias de cromo (V) y cromo (IV), generando en este proceso especies reactivas de oxígeno, como el radical hidroxilo, que reacciona con el DNA produciendo lesiones como la formación de 8-oxo-desoxiguanosina. No se ha demostrado que el cromo trivalente posea efectos cancerígenos por ninguna ruta de administración.

Cadmio:

Kumar, et al. (2010) manifiestan que la toxicidad por cadmio es un problema relativamente moderno, es un contaminante ocupacional y medioambiental generado por la minería, la galvanización y la producción de pilas de níquel-cadmio, que generalmente se desechan con los residuos domiciliarios. El cadmio puede contaminar el suelo y las plantas directamente o a través de los fertilizantes y el agua de riego. Los efectos tóxicos del exceso de cadmio generan una enfermedad pulmonar obstructiva causada por necrosis de los macrófagos alveolares y daño renal, inicialmente consistente en daño tubular que puede progresar hasta enfermedad renal terminal.



Kumar, et al. también indican que la exposición a cadmio además se asocia a un riesgo elevado de cáncer de pulmón, que se ha demostrado en trabajadores expuestos profesionalmente. El cadmio no es directamente genotóxico y más probablemente produce daño del DNA a través de la generación de especies reactivas de oxígeno. Una investigación reciente mostró que el 5% de la población de EE.UU., a partir de los 20 años de edad, tiene unas concentraciones urinarias de cadmio que pueden producir una lesión renal sutil y pérdida de calcio.

Martínez, et al. (2012) exponen que estudios han demostrado que el Cd puede generar EROs de manera indirecta, provocando daño en el DNA en proteínas, en membranas y alterando la cadena de electrones mitocondriales.

El cadmio está clasificado como agente cancerígeno del grupo I por la IARC, esta clasificación se basa fundamentalmente en la asociación entre exposición por inhalación a cadmio y la aparición de cancer de pulmón en estudios epidemiológicos realizados en trabajadores expuestos vía inhalataroria en su centro de trabajo, también existen evidencias suficientes sobre los efectos cancerígenos del cadmio inhalado en animales de laboratorio. Moreno, (2003).

Cobre:

La inhalación de polvos, humos o nieblas de sales de cobre puede causar congestión nasal y de las mucosas, y ulceración con perforación del tabique nasal. Los humos desprendidos durante el calentamiento del cobre metálico pueden producir fiebre, náuseas, gastralgias y diarrea. Gunnar, (2001).

No existen evidencias de efectos cancerígenos del cobre o sus compuestos por ninguna vía de exposición. Moreno, (2003)

Hierro:

Gunnar, (2001) indica que el hierro es el segundo metal más abundante y el cuarto de todos los elementos, superado únicamente por el oxígeno, el silicio y el aluminio. El hierro se utiliza para la fabricación de piezas de hierro y acero fundidos



y en aleaciones con otros metales. También se emplea para aumentar la densidad de los líquidos en las perforaciones petrolíferas. El hierro es un irritante local para los pulmones y el tracto gastrointestinal, si es inhalado. Los informes indican que la exposición prolongada a una mezcla de polvo de hierro y otros metales puede afectar a la función pulmonar.

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

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

Manganeso:

El manganeso (Mn) es uno de los elementos más abundantes de la corteza terrestre. Se encuentra en la tierra, los sedimentos, las rocas, el agua y los productos biológicos.

En situaciones laborales, el manganeso se absorbe principalmente por inhalación. El dióxido de manganeso y otros compuestos de manganeso utilizados o producidos como subproductos volátiles del proceso de refinado del metal son prácticamente insolubles en agua. Por este motivo, sólo llegan al torrente sanguíneo las partículas suficientemente pequeñas para alcanzar el alvéolo pulmonar. Las partículas de mayor tamaño inhaladas pueden ser depuradas por las vías respiratorias y deglutidas. El manganeso también puede llegar al aparato digestivo a través de los alimentos o del agua contaminada. En la velocidad de absorción puede influir el nivel de manganeso y hierro contenido en la dieta, el tipo de compuesto de manganeso, la edad y las deficiencias de hierro. Sin embargo, el riesgo de intoxicación por esta vía no es grande.



La absorción de manganeso a través de la piel puede considerarse despreciable. La intoxicación crónica por manganeso puede tener manifestaciones nerviosas o pulmonares. Gunnar, (2001).

Níquel

Moreno, (2003) manifiesta que el níquel es un elemento relativamente abundante en la naturaleza, donde se presenta principalmente en forma de sulfuro, óxido y silicatos. Los minerales más importantes de níquel son sulfuros complejos, en los que aparece acompañado de otros metales. El níquel puede tener estados de oxidación entre +1 y +4, pero el más frecuente es el estado de oxidación +2. En el estado de oxidación cero es capaz de formar complejos, como el níquel carbonilo, de gran interés industrial y toxicológico.

La vía de exposición profesional más importante es la inhalación, acompañada por absorción gastrointestinal secundaria, ya que una fracción importante del níquel inhalado pasa al tracto digestivo tras su salida del aparato respiratorio por aclaramiento mucociliar. Moreno, (2003).

Se calcula que un 35% del níquel inhalado pasa al torrente sanguíneo. Los factores de los que depende el grado de absorción del níquel por vía inhalatoria son el tamaño de partícula, la concentración de níquel y su solubilidad. La inhalación aguda de partículas que contienen níquel causa irritación pulmonar, asma, neumoconiosis, fibrosis pulmonar y edema pulmonar. Moreno, (2003).

Los compuestos de níquel están clasificados por la IARC en el grupo I de agentes cancerígenos, mientras el níquel se encuentra clasificado en el grupo 2B, posiblemente cancerígeno para personas, por el mismo organismo. Moreno, (2003)

Moreno también manifiesta que numerosos estudios epidemiológicos asociados a la exposición de compuestos de níquel se ha asociado a la aparición de cáncer del sistema respiratorio.



Se han planteado diversos mecanismos para explicar la actividad tumorigénica del níquel, tanto de tipo epigenético como por inducción de lesiones en el DNA. Moreno, (2003)

Estas lesiones estarían causadas por la liberación de especies reactivas de oxígeno en el proceso redox cíclico de oxidación del Ni^{2+} a Ni^{3+} y posterior reducción de esta especie a níquel divalente. Moreno, (2003).

Carmona (2009), expone que a pesar de existir numerosos estudios realizados tanto in vitro como in vivo en células de mamíferos que han documentado daño en el DNA y en los cromosomas, el potencial mutagénico de los compuestos de níquel en células y tejidos expuestos es considerado bajo y restringido a compuestos poco solubles, sin embargo, existen algunos datos que sugieren que el níquel puede actuar como un potente comutágeno en combinación con otros agentes que dañan el DNA, incluyendo la radiación UV, rayos X, los agentes alquilantes y el benzo[α]pireno. Esto sugiere que el níquel puede tener un papel importante en la alteración de los mecanismos involucrados en la reparación del DNA, a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Cinc

Moreno, (2003) indica que el cinc es un nutriente esencial, necesario como integrante de más de 200 enzimas entre las que se cuentan oxidoreductasas, transferasas, hidrolasa, liasas, isomerasas y ligasas, de las que es cofactor. Es asimismo un componente funcional de distintas proteínas implicadas en la expresión y la regulación de la actividad genética. El cinc se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Sin embargo, se cree que aproximadamente la mitad de la población mundial presenta riesgo de desarrollar enfermedades carenciales debido al predominio en la dieta de cereales y legumbres, con un elevado contenido de ácido fítico, que forma fitato de cinc insoluble que impide la absorción intestinal del metal. Moreno, (2003).



En forma de óxido, el cinc se emplea en la industria del caucho y de pigmentos. En forma de sulfuro, con trazas de otros metales, se utiliza en aplicaciones electrónicas, entre las que destacan las pantallas de televisión y de rayos X. El cinc introducido al medioambiente atmosférico está siempre asociado a la forma particulada, por lo que su comportamiento depende fundamentalmente del tamaño y densidad de partícula y de la eficacia de los procesos de deposición. No se ha detectado la bioconcentración de cinc en organismos terrestres (invertebrados y mamíferos), aunque sí en organismos acuáticos filtrantes, como las ostras. Moreno, (2003).

No se ha descrito efectos adversos sobre el hígado y el riñón, ni efectos hematológicos como resultado de la ingestión de dosis elevadas (12g en un periodo de 3 días). La ingesta de cinc en la dieta de las sociedades occidentales es de unos 12-15mg diarios. La inhalación profesional de humos desprendidos en el calentamiento de cinc a altas temperaturas (930°C), como ocurre durante la soldadura de planchas galvanizadas, produce la llamada fiebre de fundidores, que constituye el efecto tóxico más importante del zinc. Moreno, (2003).

El cinc se encuentra incluido en el grupo D, no clasificable respecto a su actividad cancerígena, por la USEPA (IRIS, 2000), ya que tanto la evidencia obtenida en personas como en animales se considera inadecuada. Moreno, (2003).

Otras especies inorgánicas: debemos destacar la presencia de sulfatos, nitratos, como contaminantes secundarios procedentes de los correspondientes óxidos de azufre y nitrógeno; cloruros, en aerosoles marinos; amonio, generado a partir de amoníaco gaseoso, silicio, proveniente de la erosión terrestre y partículas carbonadas, tanto de carácter inorgánico como orgánico, originadas en procesos de combustión incompleta.

Partículas sulfurosas

Aldabe (2011), expone que los compuestos de azufre presentes en la atmósfera son principalmente sulfatos secundarios de granulometría muy fina, generados como



la oxidación de precursores gaseosos. El 90% del sulfato presente en la atmósfera se origina por oxidación en fase líquida del SO_2 en las nubes. Generalmente, el SO_2 es de origen antrópico, liberándose durante la combustión de carbón y fuel-oil en complejos industriales; no obstante, también puede tener un origen natural, procediendo en este caso de fuentes biogénicas, volcánicas y aerosoles marinos. Entre las fuentes naturales primarias de azufre cabe destacar el yeso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Aldabe también manifiesta que el principal compuesto sulfurado gaseoso es el SO_2 , que presenta una velocidad de oxidación a H_2SO_4 , que varía entre 1-10%/hora, en función de las condiciones meteorológicas. Bajo condiciones atmosféricas normales, las partículas ácidas acuosas son parcial o totalmente neutralizadas por el ión amonio (NH_4^+), dando lugar a la formación de sulfato amónico [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]. Sin embargo, en ambientes con concentraciones bajas de NH_4^+ y elevadas de Na y Ca, es posible obtener también la neutralización de sulfato con NaCl y CaCO_3 , formándose respectivamente sulfato sódico (Na_2SO_4) y sulfato cálcico (CaSO_4).

Compuestos de Nitrógeno

Los compuestos de nitrógeno en la atmósfera, son de origen mayoritariamente secundario, formándose tras la reacción de precursores gaseosos, tanto naturales como antropogénicos. En general estas partículas presentan una granulometría inferior a $1\mu\text{m}$. los precursores más importantes son los óxidos de nitrógeno (NO_x), emitidos durante la combustión de combustibles fósiles a altas temperaturas (producción eléctrica y tráfico), la quema de biomasa y las actividades agrícolas y ganaderas. Aldabe (2011).

Compuestos Orgánicos

Hidrocarburos.- Se han detectado compuestos alifáticos, como propano, hexano y etileno; y aromáticos como el benceno y tolueno. Los del tipo alifático son asfixiantes por desplazamiento de oxígeno. Los aromáticos presentan propiedades anestésicas y tóxicas, las fuentes de estos compuestos son de origen artificial.



Aldehídos.- Pueden presentarse en la atmósfera de ciertas poblaciones, la concentración depende de la actividad industrial y densidad de tráfico. Capo, (2002).

2.3 IMPACTO DE LA CONTAMINACIÓN POR PARTÍCULAS ATMOSFERICAS EN LA SALUD HUMANA Y PÚBLICA.

El material particulado, cuya composición es muy diversa, dependiendo de la fuente de emisión, constituye uno de los principales problemas de contaminación. García, et al. (2008) citan a Schwartz et al. (1996), quienes manifiestan que numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que el incremento en la exposición a partículas atmosféricas puede provocar un aumento en la morbilidad y mortalidad del hombre.

El material particulado aerotransportado, contiene un gran número de sustancias genotóxicas, varios estudios utilizando diferentes ensayos a corto plazo han proporcionado evidencia del potencial mutagénico - genotóxico de los extractos de partículas presentes en el aire.

Numerosos estudios epidemiológicos a corto y largo plazo en la última década han reportado una relación entre la exposición de PM₁₀ y PM_{2.5} con el aumento en la morbilidad y mortalidad, particularmente en aquellas personas con enfermedades respiratorias y cardiovasculares. Pope y Dockery, (2006.)

Sahagún (2009), expone que conscientemente, se ha reportado en investigaciones a corto y largo plazo que la exposición a diferentes niveles de PM₁₀ y PM_{2.5} tiene una asociación con efectos adversos a la salud, tales como:

- Incremento en el empleo de servicios médicos (morbilidad) y mortalidad por padecimientos cardiorespiratorios.
- Exacerbación de cuadros asmáticos y enfermedades alérgicas
- Incremento en la incidencia de enfermedades respiratorias agudas y crónicas



- Alteración en los mecanismos de defensa del sistema respiratorio que resultan en una mayor incidencia de infecciones.
- Disminución de funcionalidad pulmonar
- Incremento en la reactividad de conductos pulmonares
- Inflamación pulmonar e incremento de procesos crónico obstructivos del árbol respiratorio.
- Contribución en procesos de cáncer pulmonar
- Marcada reducción en la expectativa de vida de las poblaciones urbanas particularmente en subgrupos susceptibles de la población

Todo lo indicado anteriormente como consecuencia de estudios prospectivos, los cuales demostraron que exposiciones por períodos prolongados a partículas atmosféricas (PA) estaban asociados con enfermedades respiratorias en niños y mortalidad cardiopulmonar en adultos.

Oyarzún, (2010) concluye que los efectos a corto plazo por la exposición a PM_{10} y $PM_{2.5}$ son aumento en la morbilidad respiratoria, disminución en la función pulmonar, inflamación mononuclear, interferencia en fagocitosis y depuración mucociliar, así también el investigador indica que los efectos a largo plazo por la exposición a PM_{10} y $PM_{2.5}$ son bronquitis crónica, genotoxicidad y aumento de la frecuencia de cáncer pulmonar.

Es importante considerar que la forma en que las partículas atmosféricas (PA) afectan a la población depende de diversos factores como la frecuencia y duración de la exposición, el tipo de contaminante y su concentración, el lugar, la hora y el día de la semana, la temperatura y las condiciones meteorológicas, por mencionar algunos.

Desafortunadamente, la investigación relacionada con los efectos ocasionados por las PA en el país es limitada, ya que únicamente las ciudades de Quito y Cuenca cuentan con investigaciones referentes a la concentración y caracterización de las PA.



Es indispensable considerar dos componentes fundamentales, para determinar el impacto de las PA sobre la salud: Sahagún, (2009).

- La relación dosis-respuesta
- Población susceptible

El primer componente consiste en llevar a cabo estimaciones sobre la magnitud de los efectos de contaminación de las PA sobre la salud, las funciones dosis-respuestas de estudios epidemiológicos, para luego estimar el valor del evento en la población susceptible, esto puede incluir a toda la población expuesta, o para otros efectos se puede incluir únicamente a subgrupos particularmente susceptibles: niños, ancianos o individuos asmáticos, el tercer paso a seguir incluye el 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.

Sahagún (2009), manifiesta que en el análisis de riesgos de los contaminantes es necesario tener resultados cuantitativos a partir de varios estudios, principalmente cuando estos son realizados en ciudades donde la información requerida es limitada, como sería el caso particular de la ciudad de Cuenca, por lo que los resultados obtenidos pueden tomarse como guía para la estimación de los efectos asociados a la exposición, y como referencia en la toma de decisiones, mientras no se cuente con información local completa. Existen investigaciones que han evaluado las asociaciones entre la contaminación por PA y los síntomas y enfermedades crónicas por causas respiratorias decrementos en la función pulmonar. Los resultados sugieren que un aumento de $10\mu\text{g}/\text{m}^3$ en PM_{10} estaba asociado con un incremento entre 10 y 25% en bronquitis y tos crónica.

Otras investigaciones han demostrado que en el aire de la ciudad de Cuenca tienen como parte de su composición plomo. Flores, (2006).



El PM, forma parte de los denominados contaminantes criterio que son los considerados como de mayor impacto en la salud humana, por lo cual, se ha generado una normatividad donde se marcan límites permisibles de concentración en un período de tiempo buscando reducir sus efectos nocivos

2.4 ESTÁNDARES DE CALIDAD DEL AIRE PARA MATERIAL PARTICULADO PM10.

El Ministerio del Ambiente del Ecuador mediante Decreto Ejecutivo 3399 publicado en el Registro Oficial 725 del 16 de diciembre del 2002 expidió el Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria, decreto que en consecuencia derogó expresamente la legislación que regula las actividades medioambientales en el país.

La Normativa Ecuatoriana en su Legislación Ambiental Secundaria, Libro VI, Anexo 4 de Normas de Calidad del Aire Ambiente especifica lo siguiente:

Numeral 4.1.2.- Normas Generales para concentraciones de contaminantes comunes en el aire ambiente:

Material particulado menor a 10 micrones (PM₁₀).- El Promedio aritmético de la concentración de PM₁₀ de todas las muestras en un año no deberá exceder de cincuenta microgramos por metro cúbico (50 µg/m³). La concentración máxima en 24 horas, de todas las muestras colectadas, no deberá exceder ciento cincuenta microgramos por metro cúbico (150 µg/m³), valor que no podrá ser excedido más de dos (2) veces en un año.

Sin embargo el Registro Oficial N° 464, emite un pronunciamiento favorable al proyecto de acuerdo ministerial mediante el cual se reforma la Norma de Calidad del Aire Ambiente o Nivel de Inmisión, constante en el Anexo 4 del libro VI del Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria del Ministerio del Ambiente, y que



forma parte del conjunto de normas técnicas ambientales para la prevención y control de la contaminación.

La presente norma técnica establece lo siguiente:

Numeral 4.1.2.- Normas Generales para concentraciones de contaminantes comunes en el aire ambiente:

Material particulado menor a 10 micrones (PM_{10}).- El Promedio aritmético de la concentración de PM_{10} de todas las muestras en un año no deberá exceder de cincuenta microgramos por metro cúbico ($50 \mu\text{g}/\text{m}^3$). El promedio aritmético de monitoreo continuo durante 24 horas, no deberá exceder cien microgramos por metro cúbico ($100 \mu\text{g}/\text{m}^3$).

Se considera sobrepasada la norma de calidad del aire para material particulado PM_{10} cuando el percentil 98 de las concentraciones de 24 horas registradas durante un periodo anual en cualquier estación monitorea sea mayor o igual a ($100 \mu\text{g}/\text{m}^3$).

Las normas nacionales de calidad de aire ambiente (NAAQS por sus siglas en inglés) son normas en materia de calidad del aire establecidas por la Agencia de Protección Ambiental (Environmental Protection Agency o EPA) de Estados Unidos para seis “contaminantes criterio” que están entre los más dañinos a la salud pública y al medio ambiente, entre estos contaminantes se encuentra el MP_{10} , cuyo valor establecido en esta normativa es de $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$, para un promedio de 24 horas, durante un período de tres años, no debe excederse más de una vez al año en promedio.

Las guías de calidad del aire de la OMS (Organización Mundial de la Salud) con actualización mundial 2005, relativas al material particulado, establecen como límite máximo permisible para el promedio de 24 horas un valor de $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y un promedio anual de PM_{10} de $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$, valores guiados en un conjunto amplio de pruebas científicas relativas a la contaminación del aire y sus consecuencias para la salud.

2.5 MECANISMO DE DEPOSICIÓN DE AEROSOLES EN EL SISTEMA RESPIRATORIO

Los mecanismos que determinan cómo se comportan las partículas y su tendencia a depositarse a su paso por las vías respiratorias son: el impacto directo de las mismas (impactación), la intercepción, la sedimentación y la difusión, figura 1.

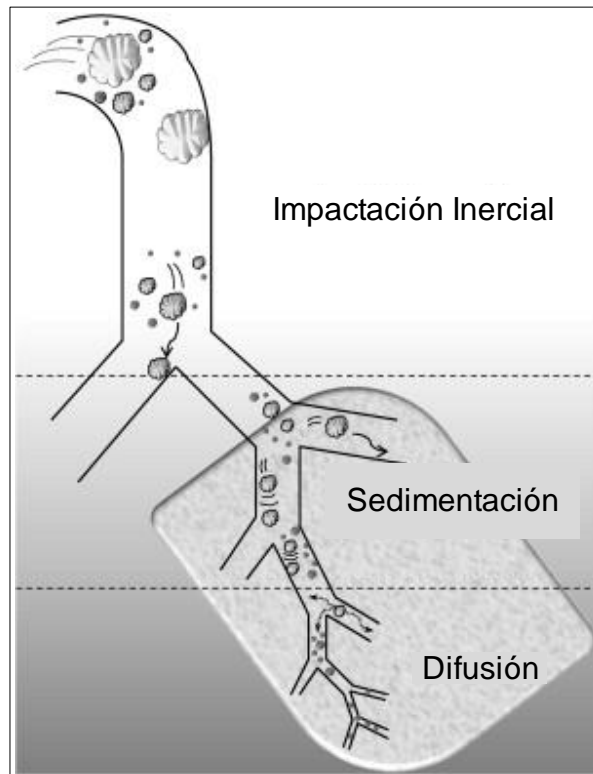


Figura 1. Mecanismo de deposición de aerosoles en el sistema respiratorio

Fuente: C. Thiago Carvalho et al.

Moreno, (2003) define el mecanismo de deposición de las partículas en el sistema respiratorio de la siguiente forma:

La **impactación** de las partículas del aerosol se produce cuando las partículas en el aire poseen suficiente impulso como para mantener su trayectoria a pesar de cambios en la dirección de la corriente, por consiguiente las partículas chocan con las paredes de las vías respiratorias estos choques se ocasiona preferentemente en las bifurcaciones sucesivas de dichas vías. Las posibilidades de deposición por



impacto se incrementan cuando las partículas son más propensas a recorrer distancias más largas.

El diseño de las vías respiratorias ayuda a los choques entre las partículas inhaladas y las paredes en los continuos cambios de dirección que experimenta el aire inspirado, que alejan entre sí inercialmente las líneas de flujo del gas y de las partículas, acercándolas a las superficies donde quedan retenidas en la capa fluida que las recubre. Este fenómeno adopta el nombre de **deposición inercial o intercepción**.

La **intercepción** desempeña un papel más importante en la deposición de partículas fibrosas que en la de partículas esféricas o asimilables de igual tamaño.

La **sedimentación** es un proceso dependiente del tiempo en el que las partículas se depositan debido a la influencia de la gravedad.

La velocidad de sedimentación depende del tamaño de la partícula, de su forma, densidad y, para partículas no esféricas, su orientación así como la densidad y viscosidad del aire.

Por último los choques entre sí que experimentan las partículas del aerosol provocan su desviación aleatoria respecto a la trayectoria común, representada por las líneas de flujo del aire inspirado. Este movimiento recibe el nombre **difusión**, y es responsable de que ciertas partículas se pongan en contacto con las paredes de las vías respiratorias, quedando retenidas en éstas.

El transporte por difusión se ve favorecido por la disminución del tamaño de partícula y por los aumentos en las diferencias de concentración en el seno del fluido.

La retención de las partículas en las paredes de las vías respiratorias, una vez que se produce el contacto, depende de distintas fuerzas que actúan simultáneamente.



Entre las fuerzas tendentes a retener las partículas sobre las vías respiratorias están las fuerzas de atracción de Van der Waals, la atracción electrostática entre cargas opuestas, unas situadas en la superficie de las partículas y otras, de signo contrario, en la superficie de las paredes, y las fuerzas capilares debidas a la presencia de una película acuosa en dichas paredes.

En general, cuanto menor es el tamaño de partícula mayor es la retención que experimenta en las paredes de las vías respiratorias.

Se calcula que solo la mitad de las partículas de tamaño superior a $50\mu\text{m}$, se inhalan, cuando se respira en calma. Las partículas de tamaño superior a $10\mu\text{m}$ quedan retenidas en la mucosa nasal debido a las turbulencias producidas por las altas velocidades y los bruscos cambios de dirección del flujo de aire.

La impactación y la intercepción son los principales mecanismos de retención de partículas en el primer tramo de las vías respiratorias. Sin embargo las partículas que no se retienen penetran en el tramo traqueobronquial de las vías respiratorias, constituido por la tráquea, bronquios y bronquiolos, estas partículas constituyen la llamada fracción torácica y poseen un tamaño normalmente inferior a $10\mu\text{m}$.

La zona traqueobronquial es considerado como un sistema ramificado constituido por 16 bifurcaciones sucesivas, formado por conductos tapizados por epitelio ciliado recubierto por secreciones mucosas. Las ramificaciones presentan ángulos de hasta 45° y su inclinación respecto a la vertical varía desde 0° , en la tráquea, hasta 60° el diámetro de los conductos va disminuyendo con cada bifurcación, mientras su número va creciendo geométricamente en este proceso.

Las partículas que han logrado superar el tramo traqueobronquial penetran en la región pulmonar, constituida por los bronquios respiratorios, los conductos alveolares y los sacos alveolares, en los que tiene lugar el intercambio de gases, es necesario tener en cuenta que el tramo traqueobronquial no participa en el intercambio de gases, su función es disminuir el aire inspirado uniforme y rápidamente hacia el interior de los pulmones.



2.6 TOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DEL MATERIAL PARTICULADO

La mayor parte de los efectos adversos del PM se producen por la presencia de partículas cuyo diámetro es inferior a 10 μm (PM10) ya que, por su tamaño, pueden penetrar más profundamente en el tracto respiratorio e incluso llegar a depositarse en los alvéolos pulmonares. Más aún, estudios recientes demuestran que existen efectos adversos producidos por acción de PM a niveles que es frecuente encontrar en ambientes urbanos.

Una revisión y análisis de diferentes investigaciones toxicológicas muestra que existe un conjunto de fundamentos que describen diversos efectos biológicos de las partículas atmosféricas a diferentes niveles orgánicos: celular, tisular, bioquímico y genético.

Sahagún (2009), menciona que estudios referentes a citotoxicidad y potencial proinflamatorio en las vías respiratorias han sido asociados con estrés oxidativo, efectos atribuidos al potencial oxidante de componentes solubles, como los metales de transición asociados a las PA, que catalizan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y conllevan al subsecuente desequilibrio de sistemas antioxidantes, a la inducción de citosinas y factores de transcripción y que finalmente culminan en inflamación, daño celular y/u oxidación de macromoléculas y apoptosis.

Sahagún también indica que la suma de los efectos a nivel celular y tisular inducidos por las PA, resulta en la típica inflamación pulmonar, incremento en la permeabilidad y daño epitelial, muerte celular y fibrosis.

Sin embargo la genotoxicidad no ha sido considerada como el principal efecto tóxico del material particulado en humanos, existen muy limitada información sobre el efecto mutagénico y genotóxico del material particulado, a pesar de que este tipo de estudios proporcionan evidencias y elementos para entender el efecto crónico del material particulado y los posibles riesgos en enfermedades como el cáncer.

El material particulado PM₁₀, contienen un gran número de sustancias genotóxicas capaces de comprometer la salud. Estudios realizados en modelos *in vivo* e *in vitro* a corto plazo han evaluado el potencial genotóxico de las partículas atmosféricas, a través del seguimiento del daño al DNA (lesiones oxidativas específicas en base a inspecciones en diversas regiones de una hélice y/o en las dos hélices), mutaciones puntuales, aberraciones cromosomales.

El sistema respiratorio constituye la principal vía de ingreso del material particulado, razón por la cual es de esperarse que este sistema resulte principalmente afectado. En la figura 2 se muestran los segmentos del tracto respiratorio donde se alojan las partículas atmosféricas.

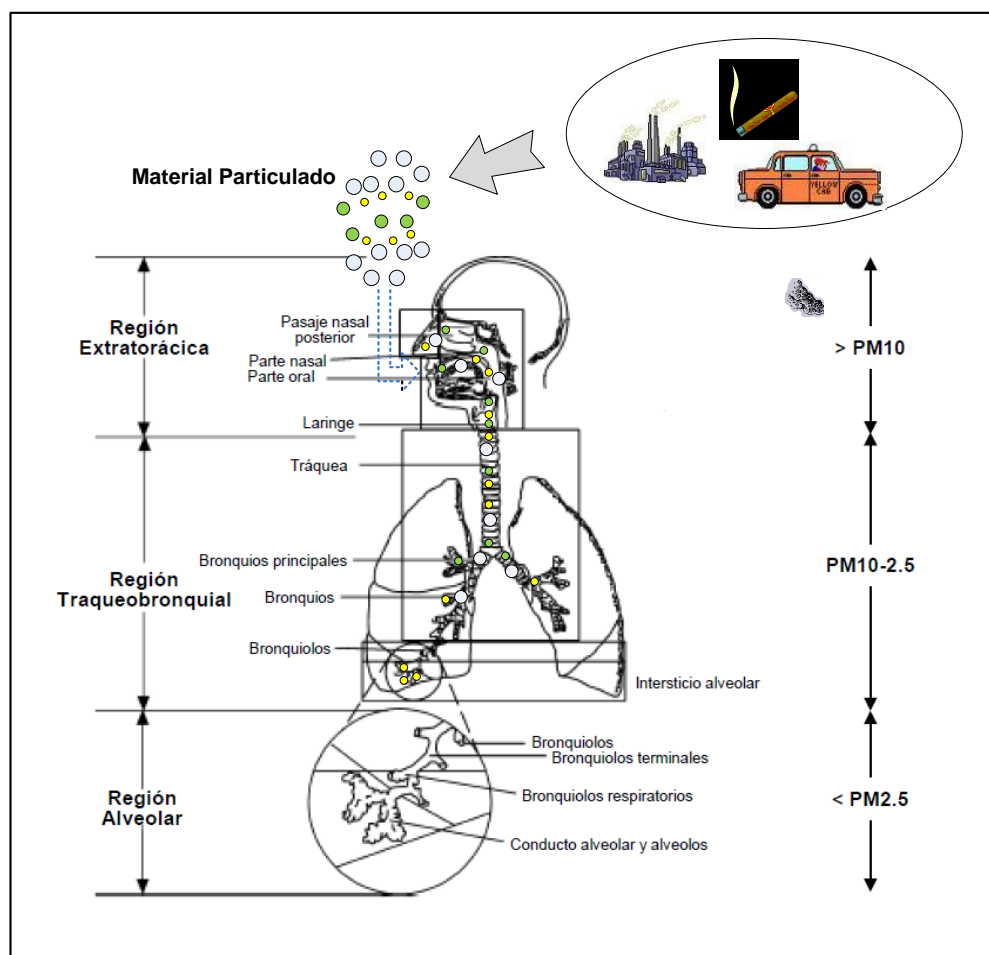


Figura 2. Diagrama del proceso de desplazamiento de partículas gruesas, finas y ultrafinas.

Fuente: modificada y adaptada de Bérubé et al.



Después de la inhalación, las PA depositadas en el pulmón pueden estimar la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como los radicales hidroxilo (OH^\cdot) y superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Estas ROS pueden ser derivados directamente de las PA o producidas endógenamente por los componentes químicos de las PA, como los metales de transición y estructuras de quinona que han experimentado el ciclo redox. A pesar de que algunos antioxidantes como el ascorbato, urato y glutatina están presentes en el fluido de recubrimiento epitelial (ELF) y pueden actuar como una primera línea de defensa oxidante, particularmente el ascorbato, puede aumentar la formación de radicales hidroxilo derivados de las partículas. Esto también puede ocurrir cuando las ROS son generadas por la acción de los metales de transición presentes en las PA.

Las ROS pueden dañar los lípidos de las membranas, las proteínas y el DNA, lo cual puede resultar en muerte celular, por cualquiera de los procesos necrótico o apoptótico.

Pérez, (s/f) manifiesta que el estrés oxidativo puede ser producto de la inflamación inducida por las partículas al ser inhaladas o por partículas *per se* al entrarse en contacto con células y biomoléculas. Dentro de los componentes de las partículas que serían capaces de generar ROS se encuentran algunos metales (Fe, Cu) y compuestos orgánicos (quinonas).

Sahagún (2009), manifiesta que la investigación de los daños inducidos al DNA por el material particulado, se puede realizar a través de diferentes tipos de ensayos biológicos. Generalmente se aplican pruebas en cultivos puros de un tipo único (cultivos primarios o líneas celulares) que emplean un solo compuesto químico o solubilizan extractos de varios compuestos químicos en el medio de cultivo, más que exponer a atmósferas complejas, este tipo de ensayos presentan ventajas puesto que permiten conocer la velocidad metabólica de los compuestos analizados, así como su metabolismo biológico, proporcionando información adicional de la respuesta individual que presentan ciertos tipos de células.



También existen estudios *in vitro*, que rutinariamente se emplean como pruebas preliminares, para posteriormente plantearse un estudio *in vivo*, tal es el caso de los ensayos de *genotoxicidad in vitro* que sólo ocasionalmente requieren de estudios adicionales *in vivo*, para clarificar descubrimientos inequívocos.

Con lo fundamentado anteriormente para estudiar toxicológicamente el material particulado es de particular importancia la preparación de extractos crudos químicamente caracterizados como punto primordial para entender los resultados, así también es fundamental caracterizar el sistema *in vitro* que se empleará.

2.7 ADN Y GENOTOXICIDAD

En las células eucariotas el ácido desoxirribonucleico (DNA) se encuentra localizado en dos compartimientos celulares, especialmente en el núcleo, y también en la mitocondria. El DNA nuclear, existe en forma de largas cadenas, que se unen para formar lo que se conoce como cromosomas. El DNA nuclear es un ácido nucleico que contiene instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos, y es el responsable de su transmisión hereditaria. Sin embargo como cualquier molécula el DNA está expuesto al ataque de diferentes agentes ya sea físicos o químicos presentes en el ambiente que interaccionan con él, pudiendo alterar su estructura química básica. Sahagún (2009).

El DNA se somete a los procesos de replicación y transcripción del código base, razón por la cual estos procesos en el DNA quedan expuestos y sujetos a ataques químicos que pueden afectar su integridad, la molécula de DNA está sujeta a un sin número de cambios dinámicos los cuales posibilitan el funcionamiento celular, razón por la cual podemos afirmar que el DNA no se encuentra es estado estático.

Son difíciles y complejos los análisis de riesgo para la salud de los individuos, expuestos a agentes físicos y químicos que afectan la molécula de DNA, ya sea por



la forma como lo hacen, los mecanismos de respuesta y defensa que desencadenan, además del limitado conocimiento que se tiene de ellos, para poder valorar el riesgo ocasionado por los xenobióticos, el análisis de riesgo en la práctica se basa en la evaluación de los efectos inducidos por los compuestos tóxicos, a través de una batería de ensayos que acumulados pueden ayudar a predecir el potencial carcinogénico de las sustancias. Las pruebas a aplicar son restringidas y se limitan a pruebas *in vitro* o *in vivo* con animales de laboratorio.

Un resumen de las modificaciones más comunes que presenta el DNA cuando un genotóxico interactúa con él se presenta en la tabla 1, de acuerdo a la información proporcionada por Hoffman, (2003) se pueden indicar dos clases generales de modificaciones en la estructura del DNA. En primer lugar, están las modificaciones que identifican la especie genotóxica responsable de la modificación estructural. Por ejemplo la luz ultravioleta en el rango de 290-300nm (UV-B) causa dimerización específica de las bases de pirimidina del DNA. También muchos químicos, tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y benzo[a]pireno (BaP), pueden formar aductos con el DNA.

En segundo lugar, están los cambios estructurales que, aunque no es específico de un genotóxico en particular, sin embargo, sugieren que la exposición ha ocurrido (por ejemplo, la rotura de la columna de fosfodiéster de la molécula de ADN) la rotura de la hebra de ADN puede resultar cuando un genotóxico produce radicales libres, muchos genotóxicos son conocidos por interferir con actividades normales de procesamiento de ADN, tales como la replicación, la metilación, y la reparación, que a su vez puede dar lugar a mutaciones (por ejemplo, adición de base / eliminación).



Tabla 1. Modificaciones en la estructura del DNA causadas por genotóxicos.

Genotóxico	Tipo de Modificación	Mecanismo
Físico	Dímero Timina-Timina	Dimerización de las bases de pirimidina por luz UV-B.
	Ruptura de la Hebra	Rotura de los enlaces fosfodiéster debido a la formación de radicales libres por la radiación ionizante.
Química	Aductos	La unión covalente del genotóxico a la molécula de ADN.
	Bases alteradas	Modificación química de las bases existentes.
	Sitios abásico	Pérdida de aducto químicamente inestable o bases dañadas.
	Roturas de la cadena	Rotura de los enlaces fosfodiéster debido a la formación de los radicales libres y los sitios abásicos
	Hipometilación del DNA	Reparación postrplicación
	Mutación	Reparación del ADN incorrecto

Fuente: Hoffman referido a de Shugart, LR Ecotoxicología

Sahagún (2009), manifiesta que la información disponible hasta la fecha indica que el DNA puede interactuar con las moléculas de acuerdo básicamente a tres patrones: interacciones electrostáticas que inducen ruptura de hélice (de una sola o de las dos hélices), pérdida de sensibilidad y modificaciones químicas de las bases por intercalación (oxidantes o formación de aductos).

Los sistemas biológicos están capacitados para detectar diversos tipos de lesiones, debido a que poseen sistemas eficientes de reparación del DNA, cuya finalidad es mantener la integridad genética, sin embargo cuando la lesión no se repara o su reparación es imprecisa, las lesiones inducidas en el DNA pueden resultar en mutaciones o re-arreglos genéticos.

La figura 3 presenta la estructura del DNA y los puntos vulnerables al ataque en la biomolécula por especies químicas reactivas.

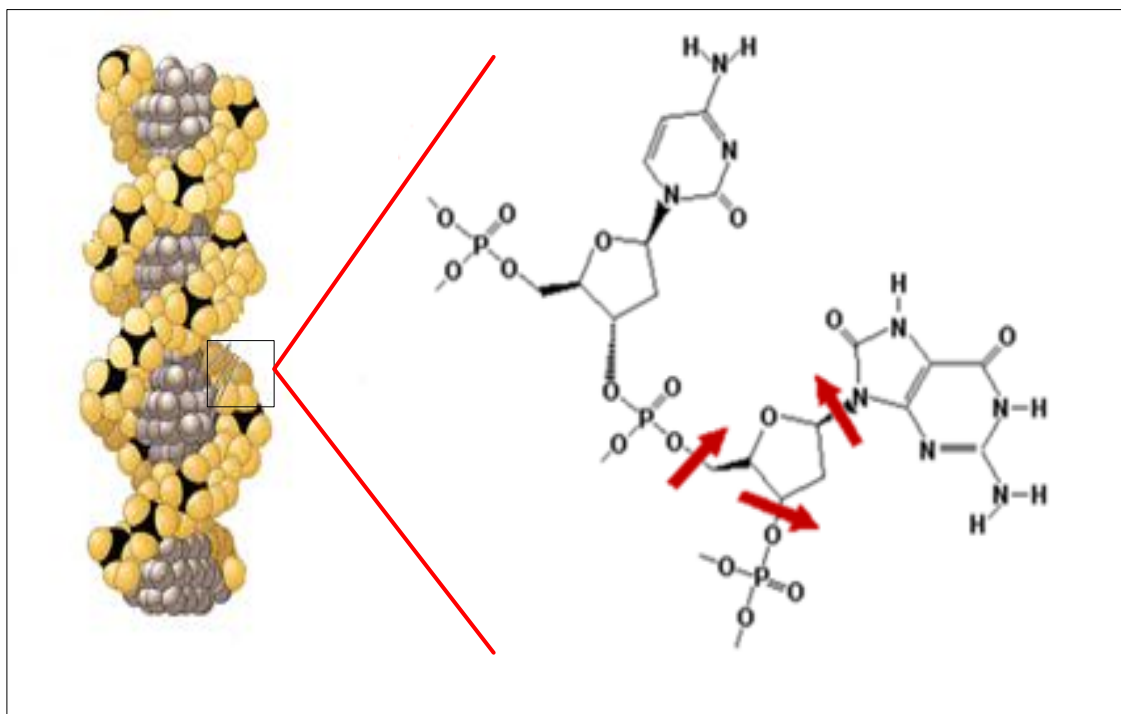


Figura 3. Estructura química del DNA y puntos vulnerables al ataque en la biomolécula por especies químicas reactivas.

Fuente: Sahagún, (2009)

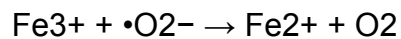
Las alteraciones en la estructura química de DNA pueden ser de diversos tipos: oxidativas (alteraciones en las base o en los azúcares), o delección de bases (eliminación de bases) o bien rupturas de una cadena (rupturas entre la unión de un azúcar y el grupo fosfato).

Los estudios reportan que existe relación entre las lesiones oxidativas al DNA y las diversas características de la partículas atmosféricas. Knaapen et.al. (2004) citado por Sahagún (2009), evidencian en sus investigaciones que fracciones de partículas atmosféricas de diferentes tamaños y sus componentes acu y/o orgánico solubles e insolubles pueden producir ROS independientemente uno del otro. Los metales solubles en agua asociados a las partículas atmosféricas como V, Fe, Ni, Cr, Cu, Zn y Mn son capaces de promover la reacción Fenton y Haber Weiss para

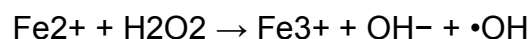


general el radical hidroxilo a través de la reducción del peróxido de hidrógeno, como se muestra en el esquema de la reacción.

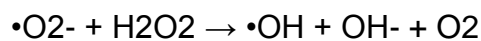
El primer paso del ciclo catalítico se produce por la reducción del catión férrico a catión ferroso:



El segundo paso es una reacción de Fenton:



La reacción neta es:



Esquema de la reacción Fenton- Haber Weiss. Catálisis de ROS

La hipótesis dominante para los efectos en la salud inducidos por partículas, es el estrés oxidativo. Las dosis elevadas, la inadecuada remoción de ROS, los componentes altamente reactivos en la respuesta al estrés oxidativo pueden causar severas disfunciones metabólicas, daño biológico a las macromoléculas y muerte celular por cualquiera de los procesos necrótico o apóptico.

Los metales de transición son abundantes en las partículas atmosféricas, la concentración de los metales en las partículas atmosféricas de la ciudad de Cuenca fueron reportados previamente por Jachero, et al. (2008).

En la Tabla 2, se resumen las concentraciones de metales de transición registrados en el material particulado PM₁₀ de la ciudad de Cuenca (2008).



Tabla 2. Concentraciones de Material Particulado registradas en la Ciudad de Cuenca (2008)

Primera fase ng/m³									
Lugar	Al	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
EIE¹	267,8	0,1	2,1	13,1	242,5	7,1	1,7	4,1	8,1
MUN²	99,4	0,1	0,8	11,7	93,1	2,5	3,4	2,8	3,1
CCA³	191,1	0,4	1,4	7,4	186,9	5,3	5,4	5,5	38,1
Segunda fase ng/m³									
EIE	240,3	0,0	2,18	6,9	216,6	6,92	2,3	4,90	38,0
MUN	160,9	0,0	2,12	19,8	158,3	5,67	4,2	4,67	35,8
CCA	334,9	0,1	3,27	12,6	381,2	10,1	9,8	14,7	681,2

Fuente: Evaluación del Riesgo de Exposición a Sustancias Tóxicas procedentes de la Contaminación Atmosférica en la Ciudad de Cuenca, Jachero, et al. (2008).

Múltiples investigaciones han reportado los efectos tóxicos y carcinogénicos inducidos por la exposición de humanos y animales a ciertos metales.

2.8 BIOMARCADORES: INDICADORES DE DAÑO GENÉTICO

Gamboa (2009) cita a Wang (2001) quien indica que la exposición a agentes genotóxicos puede originar una variedad de efectos, que se expresan inmediatamente o producen algún tipo de alteración que puede tardar años en manifestarse. El aumento en la exposición a agentes potencialmente genotóxicos ha generado la necesidad de identificar, caracterizar y evaluar el riesgo con el objetivo de crear medidas para prevención y reducción de riesgos individuales y poblacionales.

¹ Escuela Ignacio Escandón.

² Municipio

³ Colegio Carlos Arízaga



Para la evaluación de cambios moleculares o celulares en los sistemas biológicos se hace empleo de los biomarcadores. El daño genético es un proceso que se lleva a cabo en varias etapas en el organismo durante el desarrollo, el agente potencialmente genotóxico ingresa al organismo, se absorbe, se distribuye y atraviesa las membranas celulares.

Una vez dentro de la célula, el agente puede reaccionar por sí mismo (acción directa), o bien puede ser activado por las enzimas metabólicas (acción indirecta).

Si la exposición al genotóxico produce alteraciones tempranas en los individuos ya sea antes del desarrollo del impedimento o de la enfermedad, estos cambios podrían transformarse en señales o marcadores, que pueden ser valorados mediante estrategias adecuadas y correlacionarse con los efectos observados a largo plazo en modelos experimentales o en grupos humanos expuestos.

Con el objeto de detectar estas alteraciones tempranas, la epidemiología molecular ha planteado la utilización de marcadores biológicos (biomarcadores) en las células de individuos en riesgo, definiendo a un biomarcador como un indicador de la variación de los componentes y procesos bioquímicos o celulares que pueden ser medidos en muestras biológicas.

De acuerdo a su definición, los biomarcadores pueden encontrarse en diferentes niveles biológicos y se clasifican en tres tipos: marcadores de exposición, marcadores de efecto y marcadores de susceptibilidad. Salazar et. al., (1996) citado por Gamboa (2009).

Marcadores de Exposición: Determinan la concentración de agentes químicos o de sus metabolitos en los fluidos biológicos o en los tejidos, poniendo de manifiesto que el organismo tuvo contacto con estos agentes.

Marcadores de susceptibilidad: Son indicadores de la existencia de una limitación heredada o adquirida de la capacidad de un organismo para responder al reto de la exposición a un agente xenobiótico específico.



Marcadores de efecto: Pueden definirse como las alteraciones bioquímicas, fisiológicas, genéticas o de otro tipo que dependiendo de su magnitud pueden ser reconocidas como un daño potencial o efectivo sobre la salud y son producto de la exposición a un agente determinado de tipo exógeno.

Los biomarcadores de efecto se clasifican en citotóxicos y en citostáticos.

Citotóxicos.- hacen referencia al daño y muerte celular.

Citostáticos.- se reflejan en los incrementos o retrasos en la síntesis del DNA y pueden causar muerte celular, mutaciones y cáncer.

Estos marcadores pueden servir como señal de alarma, ya que constituyen un dosímetro para guiar la intervención en cuanto a reducir o prevenir la exposición.

El daño específico a la estructura del DNA puede ser revisado como un biomarcador de exposición. Cualquier evento que ocurra después de iniciar la interacción del genotóxico con el DNA se le denomina biomarcador de efecto.

Las pruebas o ensayos de genotoxicidad, se han clasificado según las características de los eventos que pueden detectar, de tal manera que existen cuatro grupos: mutaciones genéticas, aberraciones cromosómicas, transformación morfológica y daño al DNA.

Para la determinación del daño al DNA, se pueden emplear los siguientes marcadores de efecto genotóxico: aberraciones cromosómicas, intercambio de cromáticas hermanas micronucleos y ensayo del cometa o electroforesis unicelular en microgel, siendo esta última la más utilizada en los últimos años.

La magnitud de la alteración que produce la exposición a sustancias tóxicas dependerá de la naturaleza del compuesto, de la dosis de exposición y de la función que desempeñe en los tejidos afectados del organismo.



2.9 PRUEBA DE GENOTOXICIDAD: ENSAYO DEL COMETA

El ensayo del cometa es la técnica que más se ha extendido en la evaluación de genotoxicidad, desarrollándose en diferentes organismos hasta su aplicación en el ser humano. Carmona, (2009).

El ensayo del cometa, también conocido con el nombre de electroforesis alcalina en gel de células individuales (SCG: Single cell gel electrophoresis assay), es una prueba sensible, rápida y sencilla que permite la cuantificación y análisis del daño genético causado por diferentes agentes químicos y físicos.

Este ensayo tiene la capacidad de detectar el daño genético causado por roturas del DNA de doble y simple cadena, sitios álcali-lábiles, daño oxidativo, y enlaces DNA-DNA, DNA-proteína, o aductos, así como el daño genético debido a deficiencias en la reparación del DNA.

El ensayo del cometa comprende una metodología que puede resumirse en siete etapas: las células de estudio son suspendidas en agarosa y se colocan en portaobjetos previamente cubiertos con agarosa; (2) para liberar el DNA y eliminar las proteínas celulares se procede a la lisis de las células bajo una alta concentración de sales, (3) se lleva a cabo una exposición alcalina (usualmente, pH 13) para el desenrollamiento y relajación del DNA, permitiendo la expresión de roturas de cadena simple y de sitios álcali lábiles; (4) se lleva a cabo una electroforesis bajo condiciones alcalinas (pH > 13), la cual permite que las roturas del DNA o los bucles relajados migren bajo el efecto del campo eléctrico hacia el ánodo; (5) se procede a la neutralización de las condiciones alcalinas; (6) se procede a la tinción de DNA y a la visualización microscópica (mediante fluorescencia) de los cometas; y (7) finalmente se procede al recuento y análisis de los niveles de daño genético observado.

El ensayo del cometa se basa en que el DNA no dañado mantiene una asociación altamente organizada con una matriz de proteínas en el núcleo.



El DNA dañado presenta una organización alterada, y las cadenas simples de DNA pierden su estructura compacta y se relajan, expandiéndose fuera de su cavidad. Cuando el campo eléctrico es aplicado, el DNA, que tiene una carga negativa, migra hacia el ánodo. Las cadenas de DNA no dañado son demasiado grandes, y no migran de la cavidad, mientras que el DNA dañado presenta fragmentos, los cuales se pueden mover fácilmente a través de la agarosa. Así la cantidad de DNA que migra es una medida de la cantidad de DNA dañado en la célula. Carmona (2009).



CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 METODOLOGÍA

3.2 AREA DE ESTUDIO

3.2.1 LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA

El cantón Cuenca, cabecera cantonal de la provincia del Azuay, se ubica en el centro-sur del Ecuador, en la región llamada “la Sierra” a 2.800 m.s.n.m. Figura 4.

De acuerdo a lo establecido en la Reforma, Actualización, Complementación y Codificación de la Ordenanza que sanciona el Plan de Ordenamiento Territorial del cantón Cuenca, el territorio se divide en tres áreas:

Área urbana, con una superficie de 6.771 hectáreas

Área de influencia inmediata, con una superficie de 12.013 hectáreas y

Área rural, con una superficie de 312.880 hectáreas

Las coordenadas geográficas de la ciudad son: 2°52'- 2°54' latitud Sur y 78°59' - 79°01' longitud Oeste Greenwich.



Figura 4. Localización de la ciudad Cuenca- Ecuador

Fuente: Autor

3.2.2 ASPECTOS DEMOGRÁFICOS

La ciudad de Cuenca, según el censo del 2010 realizado por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) cuenta con una población de 505.585 habitantes.

A causa del fenómeno de la migración de la población de las zonas rurales hacia los centros urbanos que proveen posibilidades de empleo por el desarrollo del comercio, industrias y de servicios a la población en general, se observa crecimiento demográfico de la ciudad de Cuenca como en la mayoría de los centros provinciales mucho más rápido de lo planificado.



3.2.3 CARACTERÍSTICAS CLIMATICAS

La topografía de la provincia del Azuay produce un significativo mosaico climático, desde los páramos fríos de altura con clima fresco hasta un clima subtropical en las zonas bajas y abrigadas. La ciudad de Cuenca al estar ubicada en el Callejón Interandino se encuentra influenciada por masas de aire húmedo provenientes de la Cuenca Amazónica.

Cuenca goza de un clima privilegiado por localizarse dentro de un extenso valle en medio de la columna andina con una temperatura variable entre 7 a 15°C en invierno y 12 a 25°C en verano. La temperatura promedio de la ciudad es de 15 °C.

También debido a su ubicación la ciudad puede experimentar en algunas ocasiones varios cambios de clima y de temperatura durante el transcurso del día.

La ciudad tiene una orientación que sigue el eje este-oeste que hasta hoy predomina, por el norte la ciudad se extiende al pie de la colina de Cullca, y además encontramos el valle del río Machángara; al occidente se abre hacia los páramos del Cajas; hacia el oriente está la zona colinada de Guagualzhumi y el inicio del cañón del río Paute; hacia el sur se encuentra la confluencia de los ríos Tarqui y Yanuncay.

3.3 DISEÑO DEL ESTUDIO

Para evaluar el efecto genotóxico del material particulado, se emplearon extractos acuosolubles de PM₁₀, procedentes de tres áreas de la ciudad de Cuenca, la genotoxicidad de estos extractos se determinó utilizando un indicador de daño genético denominado ensayo del cometa. La figura 5, sintetiza el procedimiento desarrollado para el ensayo de viabilidad y genotoxicidad.

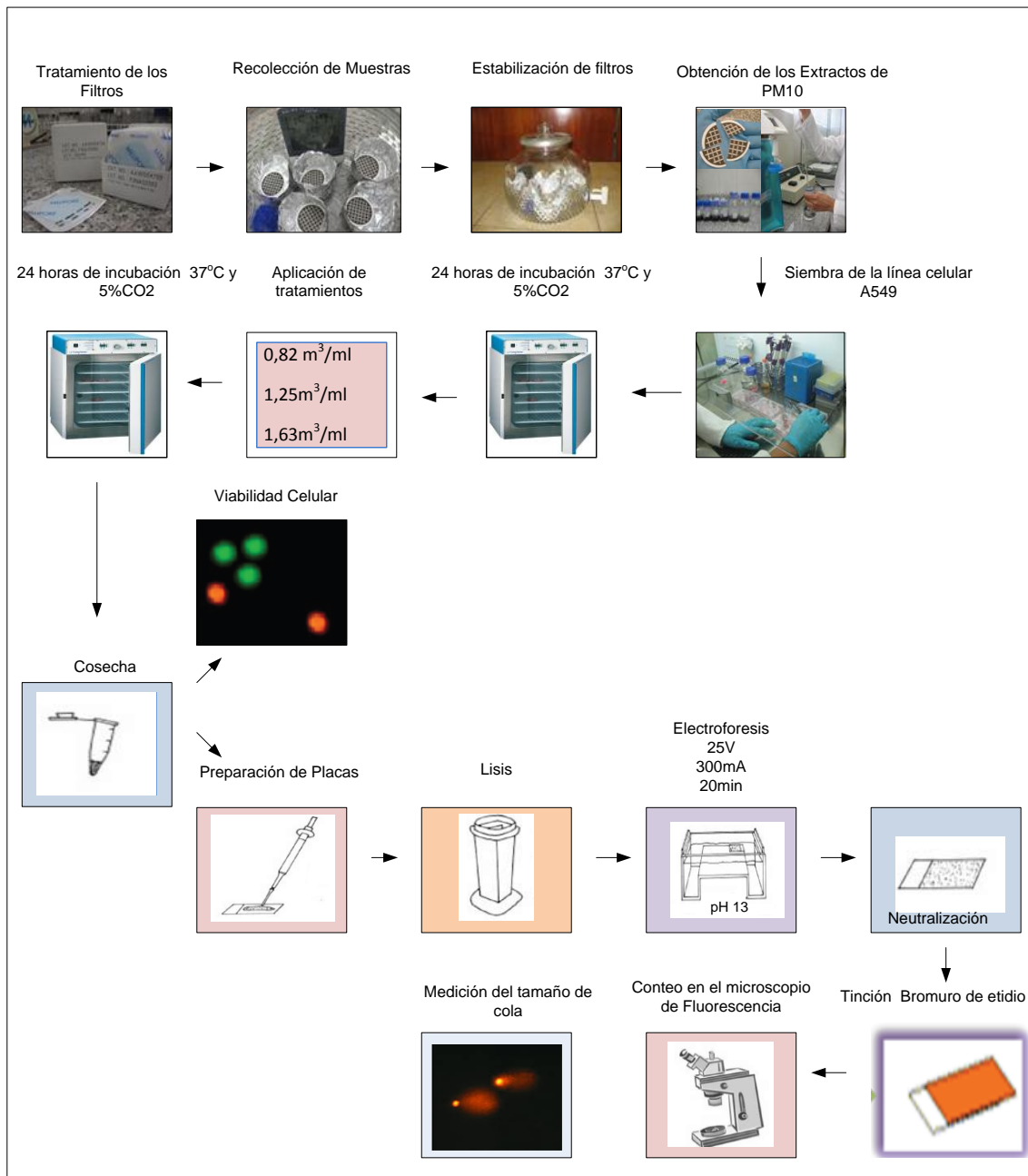


Figura 5. Esquema planteado para el ensayo de viabilidad y genotoxicidad con los extractos acuosolubles de las muestras de material particulado recolectado en el cantón Cuenca.

Fuente: Autor



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

La elección de los sitios de monitoreo, se estableció en base a las conclusiones de un estudio previo, desarrollado por el Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca en el año 2006, denominado: Determinación de la concentración de Material particulado en diferentes zonas de la ciudad de Cuenca, donde se concluye que el 80% de los sitios estudiados, registran niveles de concentración máxima superiores a los límites establecidos en la Normativa Ecuatoriana para la calidad del Aire Ambiente, Libro VI, Anexo 4.

El monitoreo y recolección de PM10 se llevó a cabo en tres puntos de la ciudad de Cuenca. La ubicación de los puntos se detalla a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3. Localización de los Sitios de monitoreo

Puntos	Ubicación	Coordenadas	
		Latitud	Longitud
P1	Calle Vega Muñoz y Hermano Miguel	2°53'39.31"S	79° 0'4.62"O
P2	Av. Loja y Remigio Tamariz	2°54'2.91"S	79° 0'52.30"O
P3	Av. Ricardo Durán (Vía a Baños)	2°55'10.04"S	79° 3'8.07"O

3.4.1 DESCRIPCIÓN DE LOS SITIOS DE MONITOREO

Calle Vega Muñoz y Hermano Miguel

El punto P1 correspondiente a la calle Vega Muñoz y Hermano Miguel, se encuentra localizado en un área cuyo uso de suelo está designado a la gestión y administración, comercio, servicios generales y vivienda (Sector de Planeamiento



Especial CH). Cercano al mismo existen comercios como restaurantes, tiendas, panaderías, etc. Este punto se ubicada en el Centro Histórico de la ciudad, el mismo que se caracteriza por presentar altas emisiones de vehículos y poca vegetación.

Avenida Loja y Remigio Tamariz

El punto P2 localizado en la Avenida Loja y Remigio Tamariz, representa una zona principal de ingreso al Centro Histórico, este sector es considerado una zona de alto flujo vehicular. El uso de suelo asignado al sector de planeamiento CH (Centro Histórico) a donde pertenece este punto se caracteriza por ser un área de gestión y administración, comercio, servicios generales y vivienda.

Avenida Ricardo Duran (Sector del colegio Rafael Borja)

El punto P3 se ubicó en la Av. Ricardo Duran vía a Baños sector del colegio Rafael Borja, cuyo uso de suelo esta designado a la vivienda, (Sector de planeamiento O22-B).

Los puntos de recolección de las muestras de PM10, se presentan en la figura 6, estos sitios son representativos de diferentes ambientes urbanos.

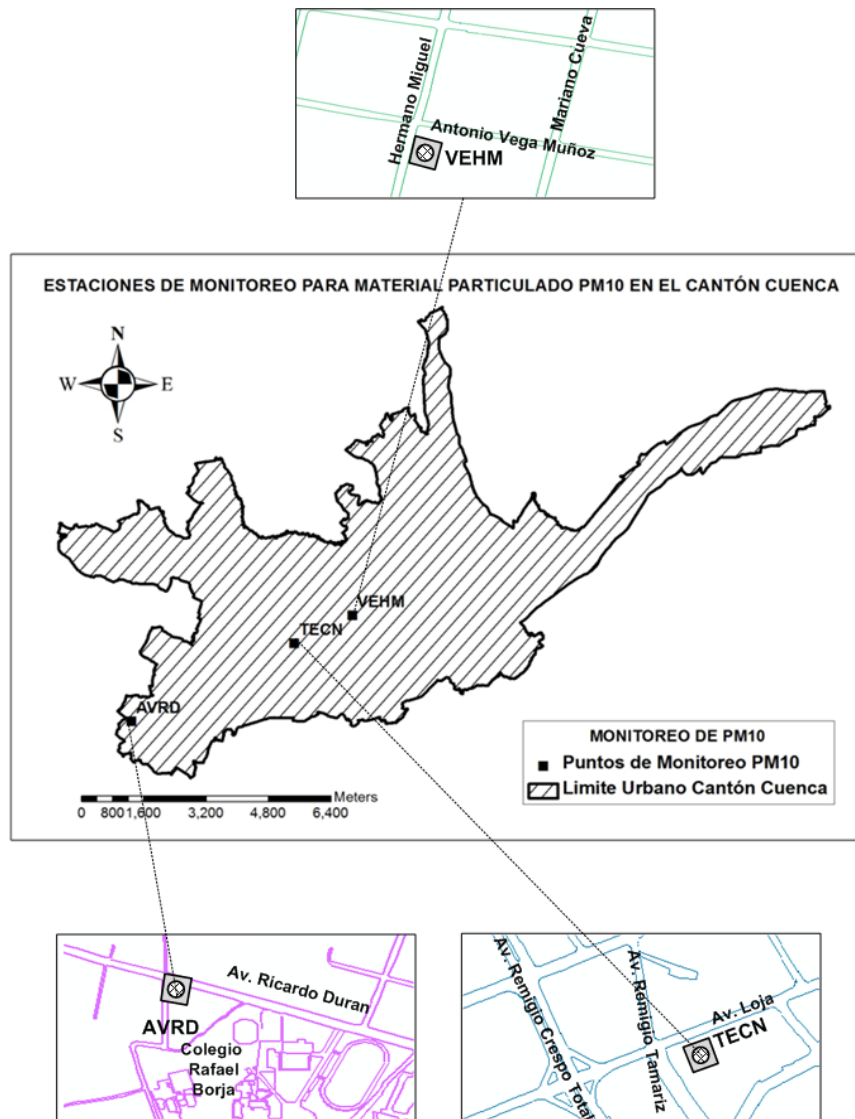


Figura 6. Localización de los puntos de monitoreo para la recolección de las muestras de PM10.

3.4.2 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE PM10

Para la recolección de las muestras de PM10, se empleó un equipo de muestreo de bajo volumen (Low Vol de F y J modelo LV-2), con un flujo constante de 100l/min, para filtrar 6m³ de aire por hora. (Figura 7)

Para la recolección se emplearon filtros de membrana de éster celulosa (CAT. NO.: AAWG047S6) con diámetro de poro de 0,8 micras.



Figura 7. Equipo de muestreo de bajo caudal F y J modelo LV-2.

El equipo de monitoreo fue instalado a una altura de 3 metros sobre el nivel del suelo, en los balcones de las tres viviendas correspondientes a los puntos evaluados. La ubicación del equipo en el punto P2 se muestra en el Anexo 1.

En vista de que la cantidad de PM10 obtenida por mes era muy reducida para los análisis de caracterización y ensayo de genotoxicidad, se realizaron dos fases de monitoreo por cada punto de estudio, recolectando en cada fase treinta filtros.

Los filtros fueron colocados diariamente en el equipo recolector de PM10, durante un tiempo de exposición de seis horas, este procedimiento se llevó a cabo durante sesenta días en cada punto.

Los días programados para el monitoreo fueron de lunes a viernes en consideración a que la actividad humana en la ciudad y el incremento del movimiento vehicular se inician aproximadamente a las 06:00 horas y dura aproximadamente hasta las 20:00 horas, el período comprendido entre las 09:00 horas y las 15:00 horas representó un intervalo central del tiempo de actividad total



considerado, tomando en consideración además que una vez emitidas las partículas al aire, debido a su tamaño, permanecerán en suspensión por semanas.

La Tabla 4 resume el período de recolección de las muestras en cada uno de los sitios monitoreados.

Tabla 4. Período de Monitoreo de Material Particulado PM10 en la ciudad de Cuenca. Año 2013

No	Localización	Período de Monitoreo	
		Fase 1	Fase 2
P1	Vega Muñoz y Hermano Miguel.	11/01/2013 - 21/02/2013	22/02/2013 - 4/04/2013
P2	Av. Loja y Remigio Tamariz.	05/04/2013 - 24/05/2013	27/05/2013 - 05/07/2013
P3	Av. Ricardo Durán (Colegio Rafael Borja).	19/08/2013 - 27/09/2013	30/09/2013 – 06/11/2013

3.4.2.1 ESTABILIZACIÓN DE FILTROS Y CORRECCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE PM10

La concentración de las partículas ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) fue determinada por análisis gravimétrico, previa estabilización de los filtros (40% - 45% de humedad relativa y temperatura de entre 15°C y 30°C.) pesando antes y después de la recolección Balcarce, (2009).

Se emplearon datos de temperatura y condiciones ambientales de la estación meteorológica del Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca para llevar a cabo la corrección de la concentración, como lo señala la norma ecuatoriana en el Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria, para ello se aplicó la siguiente ecuación:



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

En donde:

C_c = Concentración corregida

C_o = Concentración observada

P_{bl} = Presión atmosférica local en mmHg

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

3.5 ANALISIS QUÍMICO

Previamente se seleccionaron mediante muestreos aleatorios, diez muestras de PM10 de cada una de las fases del monitoreo.

De las muestras seleccionadas cinco se emplearon para la determinación de metales pesados (Cr, Fe, Ni, Zn, Cu, Cd, Mn) y cinco para el análisis de aniones (Cl^- , NO_3^- y SO_4^{-2}).

El método analítico empleado para determinar la presencia de metales en los filtros fue el NIOSH 7082 (Lead by Atomic Absorption Spectrometry), que en resumen contempla el ataque ácido del filtro hasta disolución total del mismo y completa solubilización de los metales, aforo a un volumen conocido, homogeneización y lectura en el equipo de absorción atómica (previamente calibrado empleando los patrones certificados por el NIST y dentro del rango lineal), utilizando las respectivas lámparas.

Este análisis se llevó a cabo por parte del personal técnico calificado del Centro de Servicios y Análisis de Minerales (CESEMIN) de la Universidad de Cuenca.

Para la determinación de aniones se empleó el método adaptado de referencia EPA 330.1; que en resumen emplea un volumen determinado de muestra acuosa, usualmente 5ml son filtrados por un micro filtro de celulosa de $0,45\mu\text{m}$. Un mililitro de



este filtrado es analizado con cromatografía líquida de alta eficiencia con una columna en fase de reversa. Para cualificar y cuantificar se elaboraron curvas de calibración de diferentes rangos.

Los aniones se analizaron mediante cromatografía líquida iónica, primero los aniones son separados en la columna, después pasan por el supresor donde ocurre una reacción química, para finalmente poder ser analizados con el detector de conductividad.

Para el caso de los filtros de material particulado se usó una cantidad determinada de muestra, la misma que se obtuvo de varios lavados con una cantidad determinada y específica de agua desionizada, esta solución sigue el procedimiento normal de análisis con el equipo y técnica antes mencionada.

El análisis de aniones fue desarrollado por personal técnico calificado del laboratorio de servicios ambientales Gruentec, localizado en la ciudad de Quito, el mismo que cuenta con certificación del Organismo de Acreditación Ecuatoriano (OAE).

En el Anexo 2 se presentan los informes de la caracterización del PM10 de los tres sitios de estudio.

3.6 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSOLUBLE DE MATERIAL PARTICULADO

El procedimiento empleado para extraer la solución acuosoluble de las partículas fue el siguiente:

El material particulado contenido en los filtros se extrajo con agua desionizada (ultra pura Milli Q), vía ultrasonificación durante 15min a temperatura ambiente.

Por cada fase de monitoreo se obtuvieron 40ml de solución o extracto acuoso, el mismo que corresponde al lavado de veinte muestras.

Posteriormente el extracto acuoso fue centrifugado a 2500g durante 30min para sedimentar la materia insoluble.

Las soluciones frescas preparadas fueron posteriormente almacenadas en refrigeración para su posterior empleo en el ensayo de genotoxicidad.

3.7 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

3.7.1 MODELO BIOLÓGICO

Para la realización de los ensayos de viabilidad celular y cometa, se emplearon células del epitelio alveolar pulmonar A549, donadas por el Centro de Biología Celular y Molecular de la Universidad Técnica Particular de Loja.

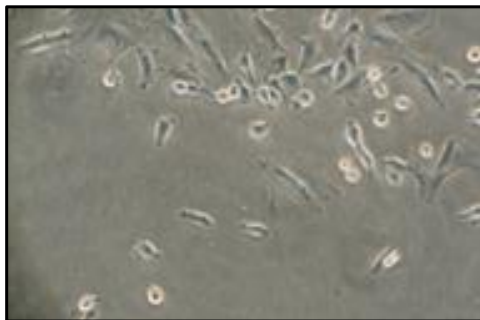


Figura 8. Línea Celular A549.

3.7.2 CONDICIONES DEL CULTIVO

La línea celular A549 fue cultivada en un medio base RPMI-1640 suplementado con Suero Fetal Bovino al 10%, antibiótico-antimicótico (100Unidades/ml de Penicilina, 100 μ g/ml de sulfato de Estreptomina y 0,25 μ g/ml de Amphotericina B como Funfizona), 1% de L-Glutamina, Bicarbonato de sodio al



0,2%. Los cultivos celulares se mantuvieron en incubación a 37°C de temperatura en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂.

3.7.3 CONTEO CELULAR

La cuantificación del número de células por ml se realizó mediante el método de exclusión con azul de tripano, contando en la cámara de Neubaüer 5 campos. La fórmula para la determinación de número de células se muestra a continuación.

$$\#células/ml = \frac{N \times F \cdot D \times 10^3}{\#placas\ contabilizadas\ en\ el\ recuento}$$

Dónde:

N= Número de células

F.D = Factor de dilución

3.7.4 PROTOCOLO

Para la realización del ensayo de viabilidad celular se sembró en dos multiplatos de 6 pocillos cada uno 2,16x10⁵ células/pocillo, a partir de los cultivos preparados previamente; y se incubó durante 24 horas, transcurrido este tiempo se colocó nuevo medio con las concentraciones de las suspensiones acuosas de material particulado a probar (0,82; 1,25; 1,63 m³/ml), además se utilizó como control negativo células, y como control positivo se trabajó con etil metanosulfonato (EMS) a una concentración de 2µM ya que es un poderoso agente alquilante monofuncional, el mismo que tiene afinidad por el DNA. Las células se incubaron por 24 horas más.

La viabilidad se cuantificó en función a la intensidad de fluorescencia relativa proporcional a la cantidad de células que sobreviven al tratamiento. Los valores se normalizaron con las unidades de fluorescencia relativa de las condiciones control



(100% viabilidad) y a partir de este valor se obtuvo el porcentaje de células en condiciones experimentales.

Para poder determinar el porcentaje de células vivas, en los experimentos se procedió a realizar la técnica de doble tinción con una solución de Diacetato de Fluoresceína – Bromuro de Etidio (FDA/EtBr).

Luego de las 24 horas de incubación se homogenizaron los tubos y se centrifugaron por 2 min a 1000rpm, del pellet obtenido se tomaron 20 μ L y se mezclaron con 20 μ L de la solución de FDA-EtBr. La mezcla se colocó en un microscopio de fluorescencia con el fin de determinar el porcentaje de células vivas. Se contaron un total de 200 células entre vivas y muertas (vivas de color verde y muertas de color rojo).

3.8 PRUEBA DE GENOTOXICIDAD ENSAYO DEL COMETA

Para determinar el daño al DNA se utilizó la técnica SCGE o ensayo del cometa. Anexo 3.

Posteriormente se cuantificó el daño, para ello se establecieron las categorías de daño celular en base a la categorización dada por Carballo, N. et al. (2005) en la cual se consideran de 4 a 5 categorías basadas en el largo de cola del cometa:

Categoría I: bajo (<20 μ m)

Categoría II: medio (20-40 μ m)

Categoría III: alto (40-80 μ m) y

Categoría IV: célula totalmente dañadas (>80 μ m).

Para el análisis de genotoxicidad las células fueron sembradas, tratadas con las dosis (0,82; 1,25; 1,63m³/ml de la solución acuosoluble de PM10), para posteriormente ser cosechadas y analizadas.



Los controles fueron los mismos que se aplicaron en viabilidad, incluyendo como controles negativos:

- Un cultivo de células
- Solución acuosoluble de lavado de filtros como blanco.

3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.9.1 VIABILIDAD CELULAR

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos de viabilidad se empleó el estadígrafo de comparación múltiple ANOVA, Kruskal Wallis y post test de Dunnett usando el software estadístico SPSS y GraphPad Prism 5.

3.9.2 ENSAYO COMETA

Para evaluar el largo de los cometas se empleó el estadígrafo de Kruskal-Wallis, el test de rangos de Mann Whitney, y Dunnett, para ello se usó el software estadístico SPSS y GraphPad Prism.



CAPITULO IV: RESULTADOS

4.1 CONCENTRACIÓN DE MATERIAL PARTICULADO

La figura 9 y 10 muestran las concentraciones de PM₁₀, registradas en el punto P1, correspondiente a la calle Vega Muñoz y Hermano Miguel durante la primera y segunda etapa de monitoreo respectivamente.

La concentración promedio de PM₁₀, registrada en el punto P1 durante la primera etapa, fue de 93,80 μg/m³ con un rango de valores que oscilan entre 18,28 μg/m³ y 215,33 μg/m³, concentraciones registradas durante los días, cinco y trece de febrero del 2013 respectivamente.

El 86,6% de los días monitoreados en la primera etapa, sobrepasan la normativa nacional, cabe indicar que este límite se toma únicamente como referencia ya que el monitoreo se realizó por períodos inferiores a 365 días como lo indica la Normativa Ecuatoriana.

Durante la segunda etapa del monitoreo, en la Calle Vega Muñoz y Hermano Miguel se registró una concentración máxima de PM₁₀ igual a 311,83 μg/m³ y una concentración mínima de 43,72 μg/m³, mientras la concentración promedio fue de 127,56 μg/m³. El 97% de los días monitoreados en la segunda etapa, superan la normativa nacional estipulada en el Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria, valor que se toma únicamente como referencia ya que el monitoreo se efectuó en un período inferior a 365 días como lo indica la Legislación Ecuatoriana.

Las Figuras 11 y 12 presentan los resultados obtenidos de PM₁₀, en el punto P2 correspondiente a la Av. Loja y Remigio Tamariz, durante las dos etapas del monitoreo.

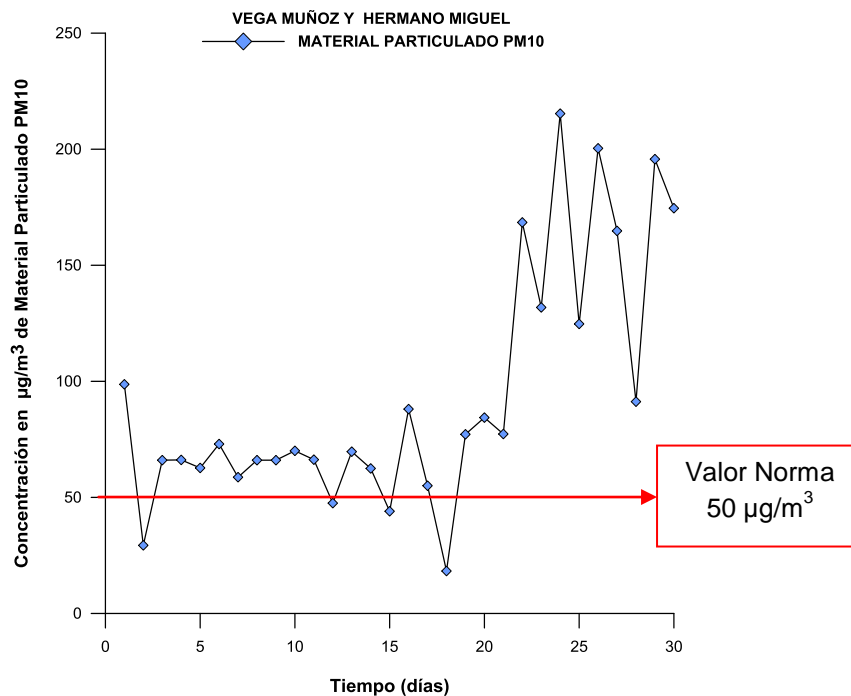


Figura 9. Concentraciones de Material Particulado PM10.
P1 Primera Etapa. (11/01/2013 - 21/02/2013)

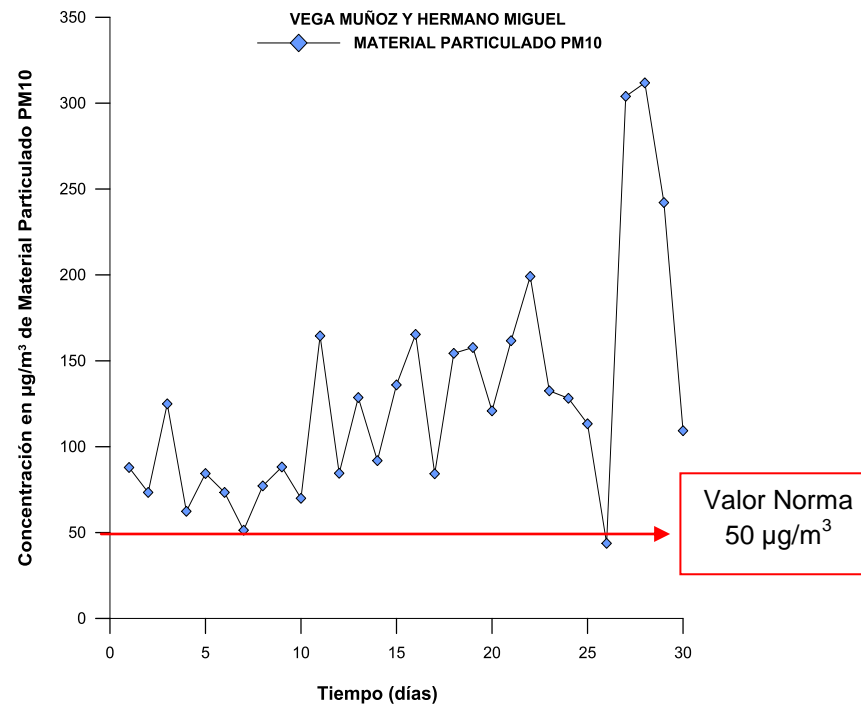


Figura 10. Concentraciones de Material Particulado PM10.
P1 Segunda Etapa (22/02/2013 – 04/04/2013)

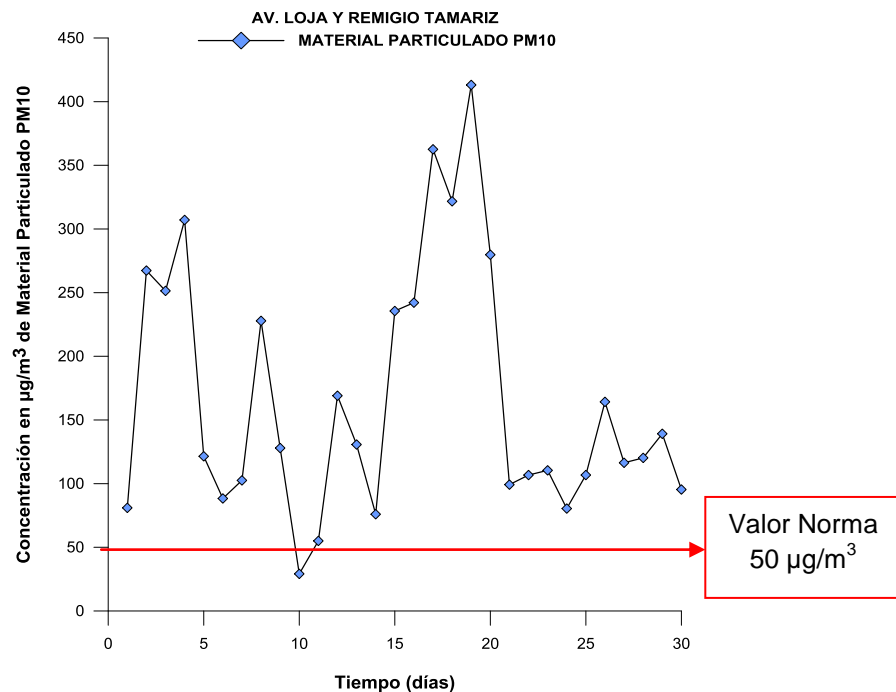


Figura 11. Concentraciones de Material Particulado PM10.
P2 Primera Etapa (05/04/2013 al 24/05/2013)

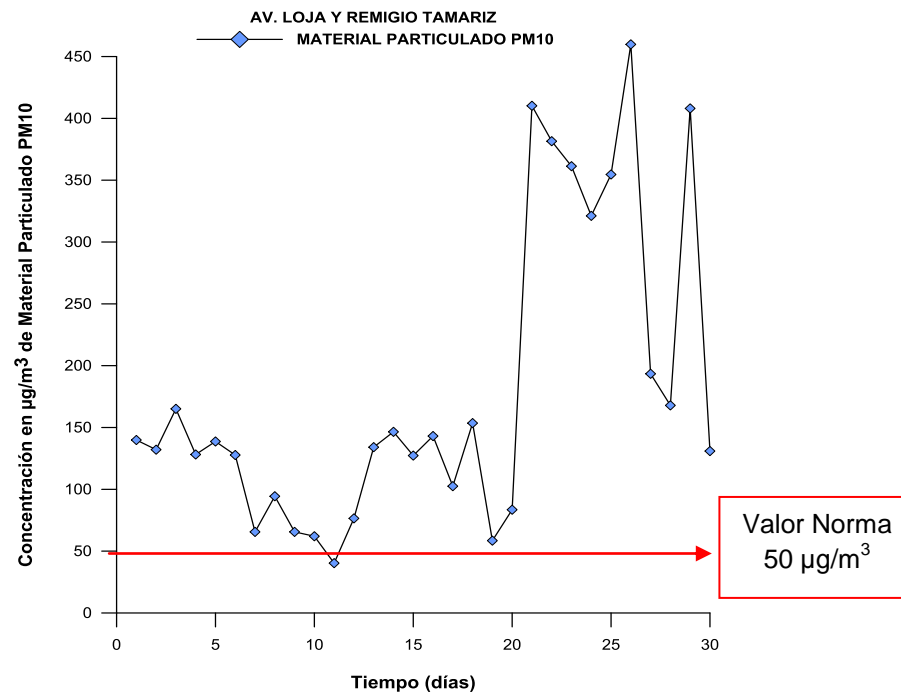


Figura 12. Concentraciones de Material Particulado PM10.
P2 Segunda Etapa. (27/05/2013 al 05/07/2013)



La concentración promedio de material particulado PM_{10} , registrada en la Av. Loja y Remigio Tamariz, fue de $167,63 \mu\text{g}/\text{m}^3$, la concentración mínima se presentó el día dieciocho de mayo con un valor igual a $29,15 \mu\text{g}/\text{m}^3$, mientras que la concentración máxima igual a $413,13 \mu\text{g}/\text{m}^3$, se registró el día ocho de mayo del 2013.

El 97% de los días monitoreados durante la primera etapa, en la Av. Loja y Remigio Tamariz, superan el límite estipulado en la Norma Nacional este límite se toma únicamente como referencia puesto que el monitoreo se realizó por un período inferior a los establecido en la Normativa.

El 97% de las concentraciones de PM_{10} , registradas durante la segunda fase en la Av. Loja y Remigio Tamariz, superan la normativa nacional, este límite se toma únicamente como referencia puesto que el monitoreo se realizó por un período inferior a 365 días.

El rango de concentraciones observadas en el punto P2 Segunda etapa fue de $40,28 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y $459,85 \mu\text{g}/\text{m}^3$ valores registrados el diez de julio y primero de agosto del 2013 respectivamente.

La concentración promedio durante la segunda etapa fue igual a $179,13 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

Las etapas de monitoreo de PM_{10} , correspondiente al punto P3 colegio Rafael Borja (Av. Ricardo Durán) se muestra en las figuras 13 y 14.

El rango de concentraciones observado en el punto P3 durante la primera etapa, varió entre $58,49 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y $379,22 \mu\text{g}/\text{m}^3$ para una concentración promedio de $171,36 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Todas las concentraciones registradas en este punto superan los $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ estipulados en la Normativa Ecuatoriana valor que se toma únicamente como referencia puesto que el monitoreo se realizó por periodos inferiores a los establecidos en la legislación Nacional.

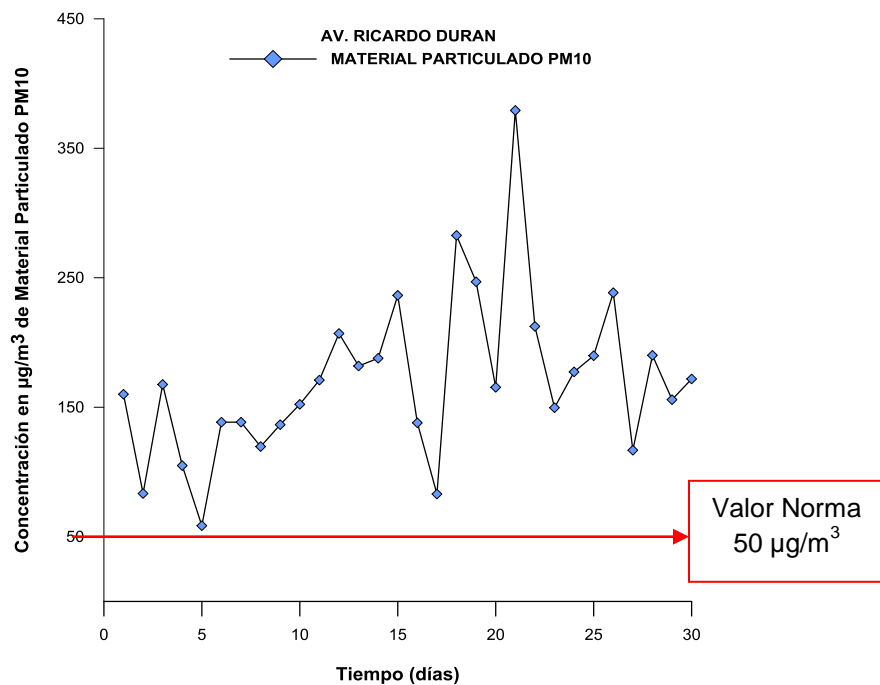


Figura 13. Concentraciones de Material Particulado PM10.
P3 Primera Etapa (19/08/2013 al 27/09/2013).

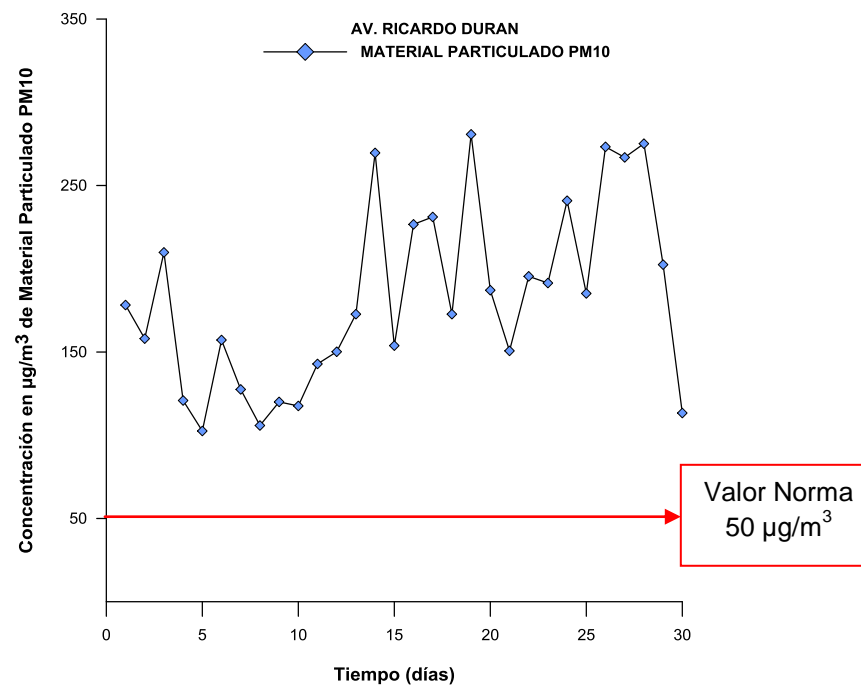


Figura 14. Concentraciones de Material Particulado PM10.
P3 Segunda Etapa. (30/09/2013 al 08/11/2013)



Durante la segunda etapa de monitoreo en el punto P3 la concentración promedio fue de 182,66 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, las concentraciones mínima y máxima registradas fueron de 102,54 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ y 280,73 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

En esta etapa el 100% de las concentraciones superan los 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ estipulados en el Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria, valor que se ha tomado para este estudio como referencia ya que el monitoreo se realizó por un periodo inferior a 365 días como lo establece la Normativa.

En la tabla 5 se presentan las concentraciones promedio, máxima y mínima de material particulado (PM10), registrada en cada etapa de monitoreo en los diferentes puntos.

Tabla 5. Concentraciones de Material Particulado (PM10) en la Zona Urbana del Cantón Cuenca en $\mu\text{g}/\text{m}^3$

Punto	Etapa 1			Etapa 2		
	Promedio ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Máxima ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Mínima ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Promedio ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Máxima ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Mínima ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
P1	93,80	215,33	18,28	127,56	311,83	43,72
P2	167,63	413,13	29,15	179,13	459,85	40,28
P3	171,36	379,22	58,49	182,66	280,73	102,54

4.2 RELACIÓN ENTRE EL MATERIAL PARTICULADO Y LAS CONDICIONES METEOROLÓGICAS.

Las figuras 15; 16; 17; 18; 19 y 20 resumen las concentraciones de material particulado PM10 registradas en los diferentes puntos de estudio durante las dos etapas, versus las condiciones meteorológicas: temperatura, humedad, velocidad del viento y precipitaciones.

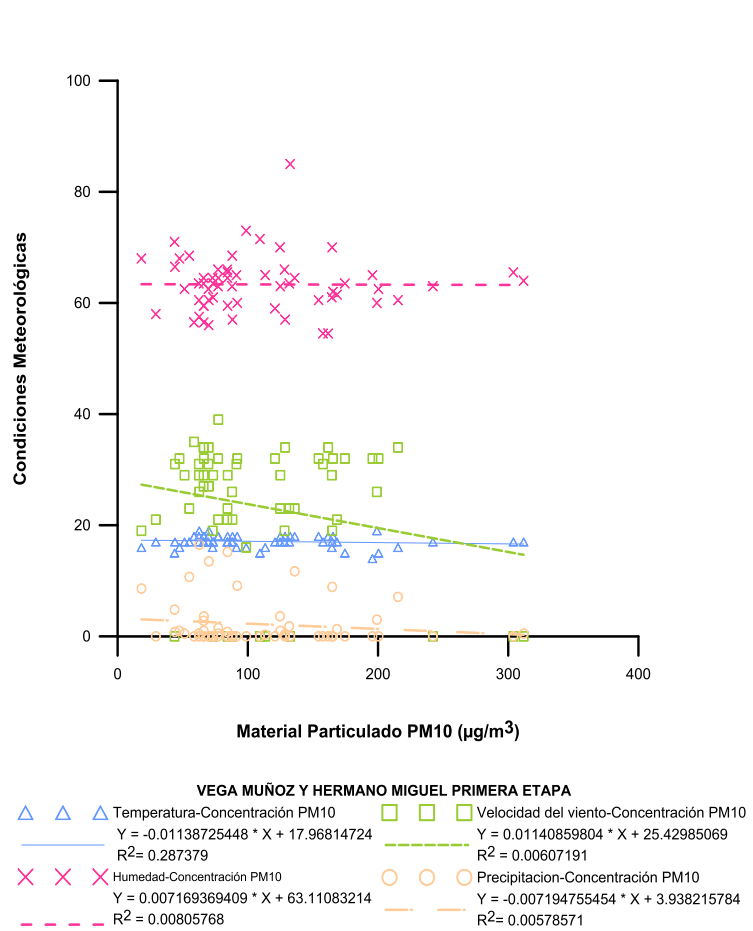


Figura 15. Evolución de la concentración de material particulado PM10 en función de las condiciones meteorológicas punto P1 (Primera Etapa)

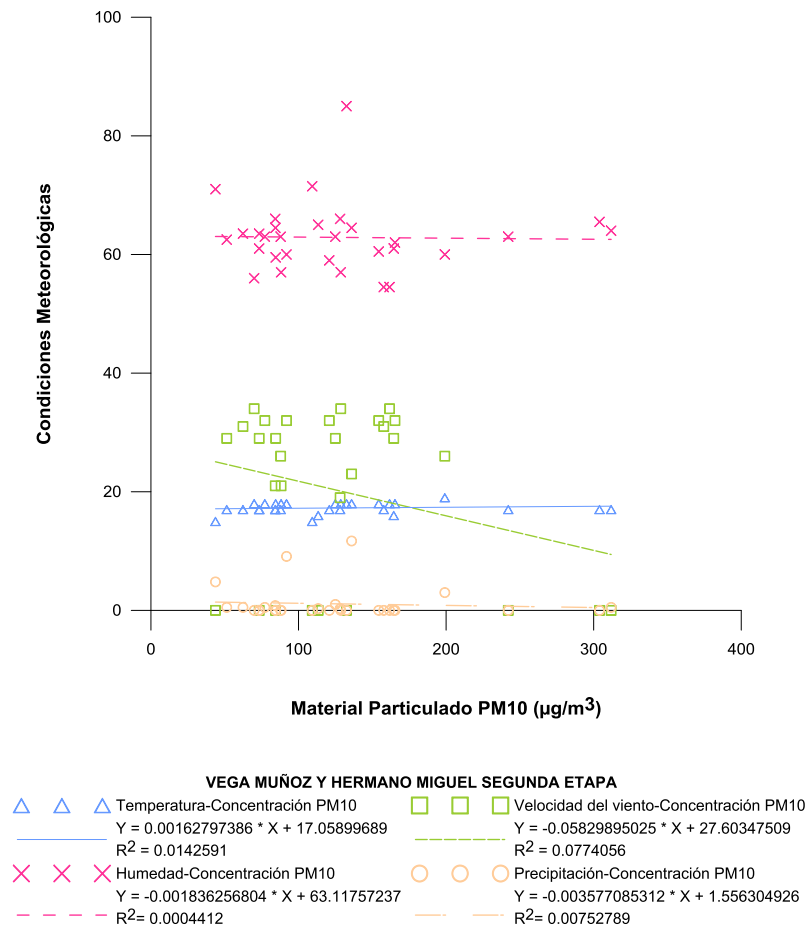


Figura 16. Evolución de la concentración de material particulado PM10 en función de las condiciones meteorológicas punto P1 (Segunda Etapa).

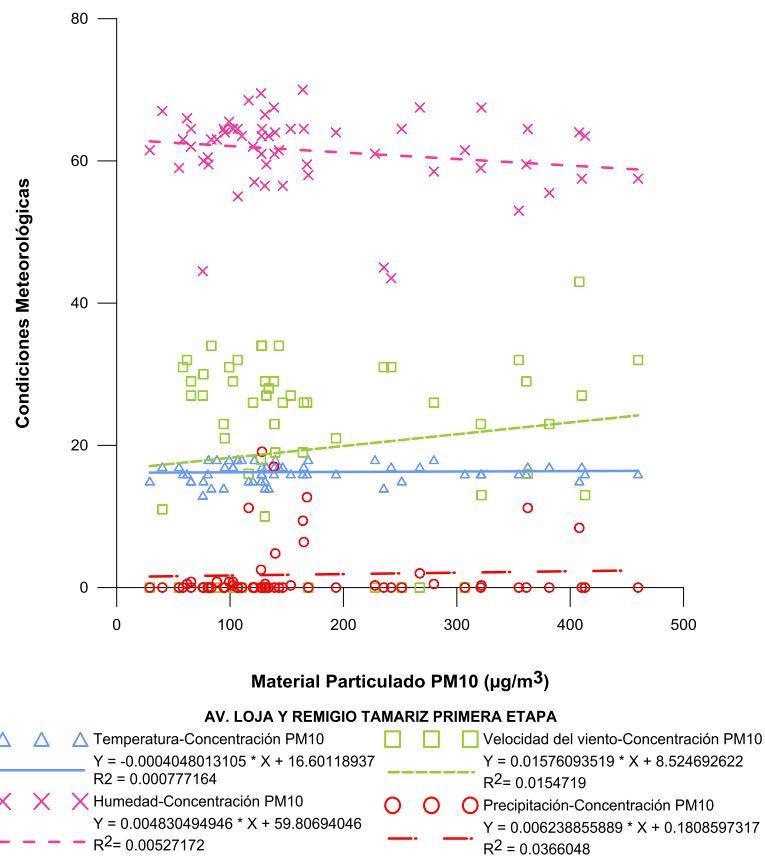


Figura 17. Evolución de la concentración de material particulado PM10 en función de las condiciones meteorológicas punto P2 (Primera Etapa).

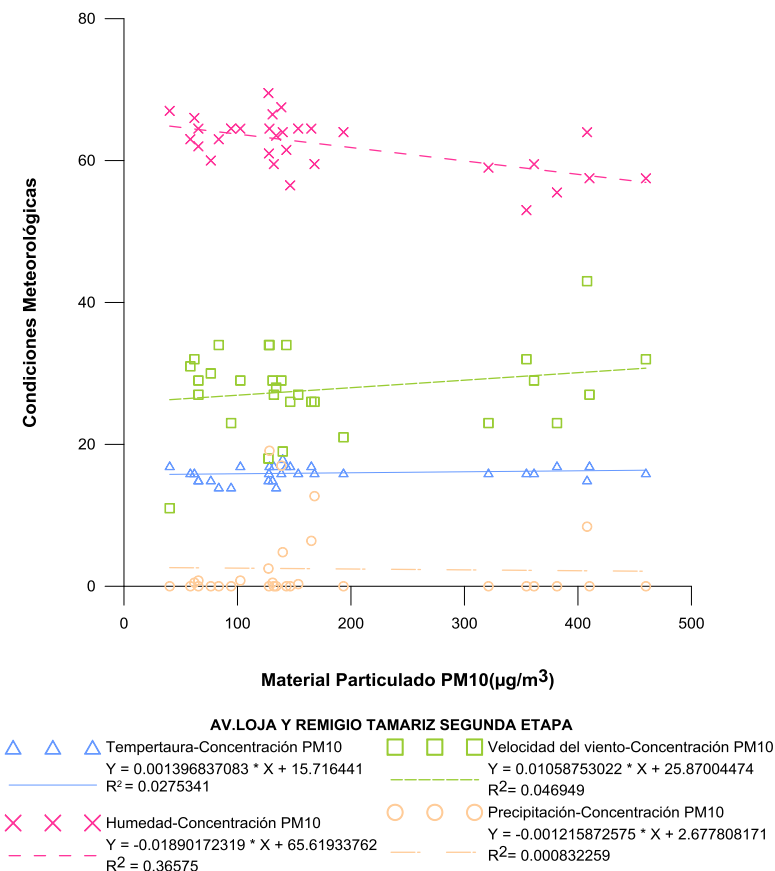


Figura 18. Evolución de la concentración de material particulado PM10 en función de las condiciones meteorológicas punto P2 (Segunda Etapa).

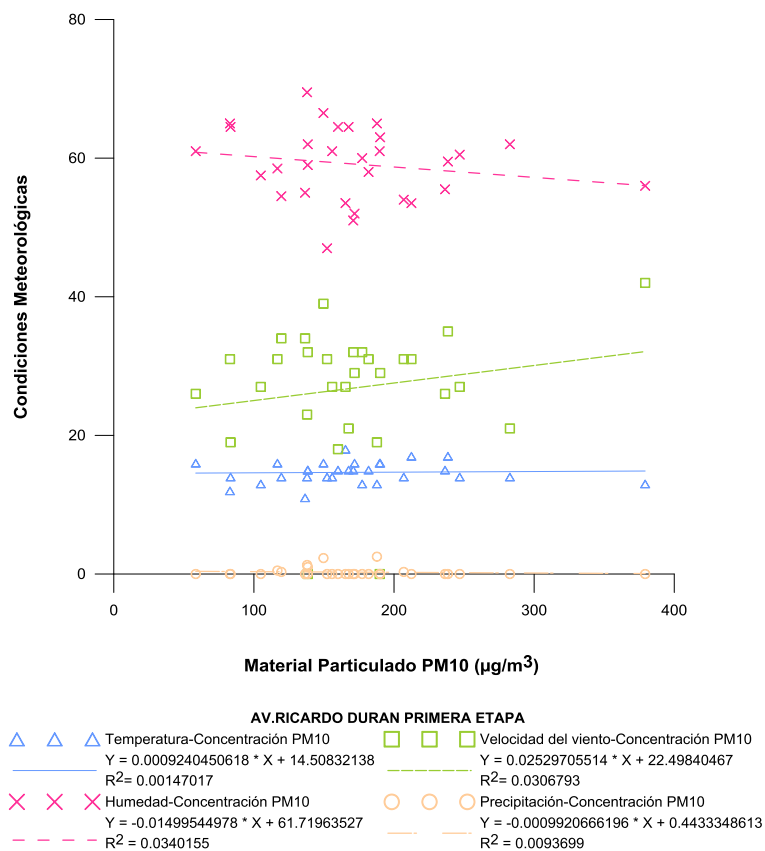


Figura 19. Evolución de la concentración de material particulado PM10 en función de las condiciones meteorológicas punto P3 (Primera Etapa).

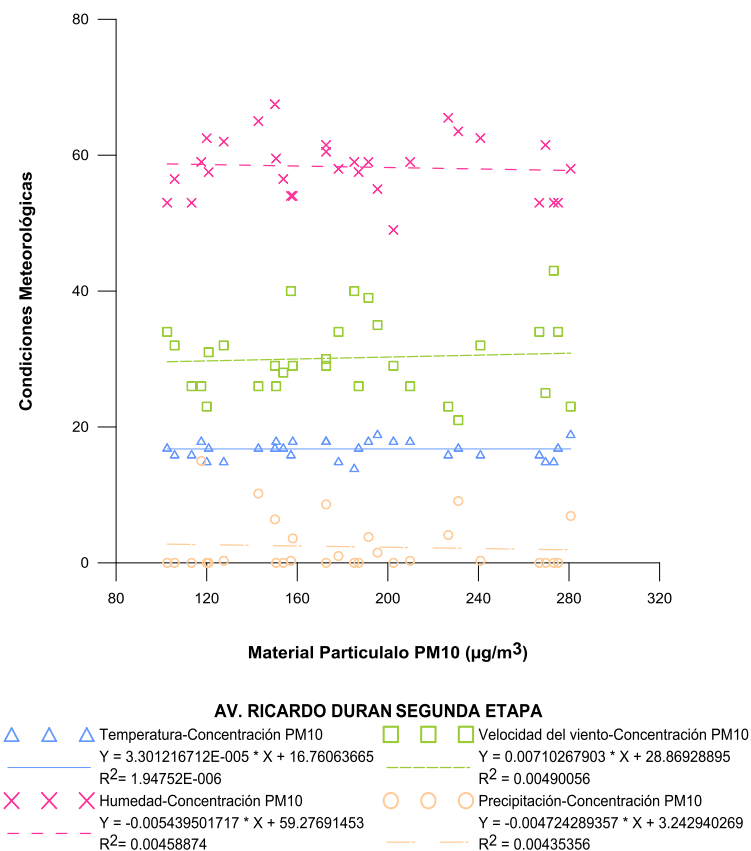


Figura 20. Evolución de la concentración de material particulado PM10 en función de las condiciones meteorológicas punto P3 (Segunda Etapa).



4.3 CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL PARTICULADO

Las Tablas 6 y 7 presentan las concentraciones de los cationes determinados en las muestras de PM10 recolectadas en los sitios de monitoreo, durante la primera y segunda fase respectivamente.

Tabla 6. Concentraciones de metales pesados presentes en las muestras de PM10 recolectadas en los puntos de monitoreo (Primera Etapa).

Puntos de monitoreo	Concentración de metales pesados (ng/m ³)						
	Fe	Zn	Mn	Cu	Ni	Cr	Cd
P1	1888,88	187,05	36,11	175,94	26,83	N.C.*	N.C.
P2	2801,83	220,33	57,38	22,22	N.C.	N.C.	N.C.
P3	3180,55	107,38	60,16	10,16	N.C.	N.C.	N.C.

Fuente: Resultados laboratorio CESEMIN

*N.C. = No cuantificado

Tabla 7. Concentraciones de metales pesados presentes en las muestras de PM10 recolectadas en los puntos de monitoreo (Segunda Etapa)

Puntos de Monitoreo	Concentración de metales pesados (ng/m ³)						
	Fe	Zn	Mn	Cu	Ni	Cr	Cd
P1	3981,11	274,05	75,88	22,22	N.C.*	N.C.	N.C.
P2	4777,77	137,00	118,5	25,88	N.C.	N.C.	N.C.
P3	4722,66	97,22	88,88	12,94	N.C.	N.C.	N.C.

Fuente: Resultados laboratorio CESEMIN

*N.C. = No cuantificado

Las figuras 21 y 22 presentan la variación de las concentraciones de metales presentes en las muestras de PM10, recolectadas en la ciudad de Cuenca durante la primera y segunda etapa en cada uno de los puntos de estudio.

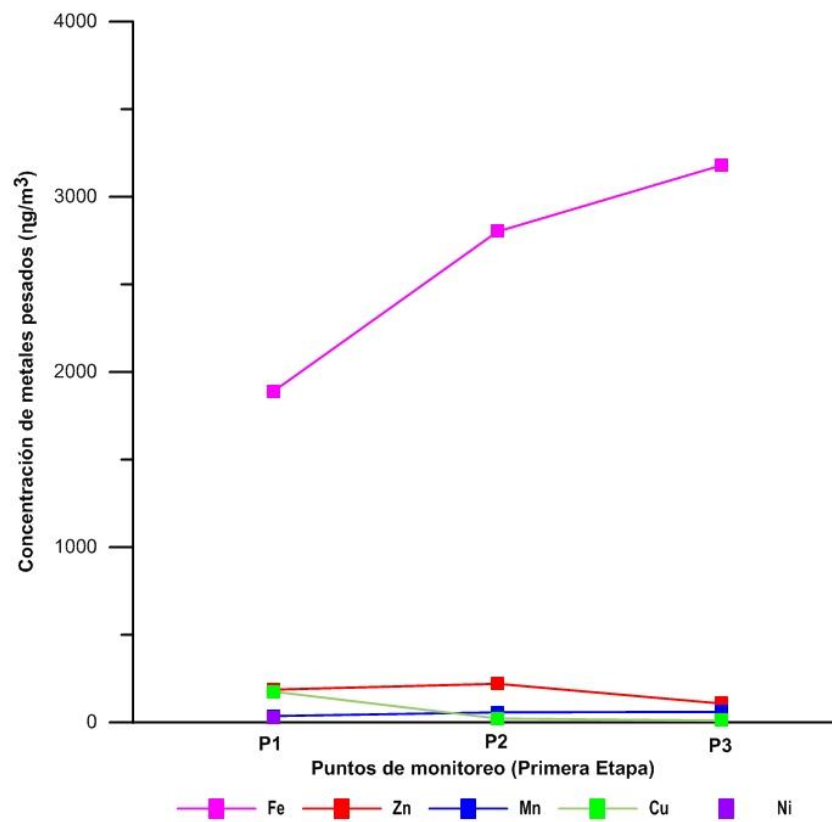


Figura 21. Variación de la concentración de metales presentes en las muestras de PM10 durante la primera etapa.

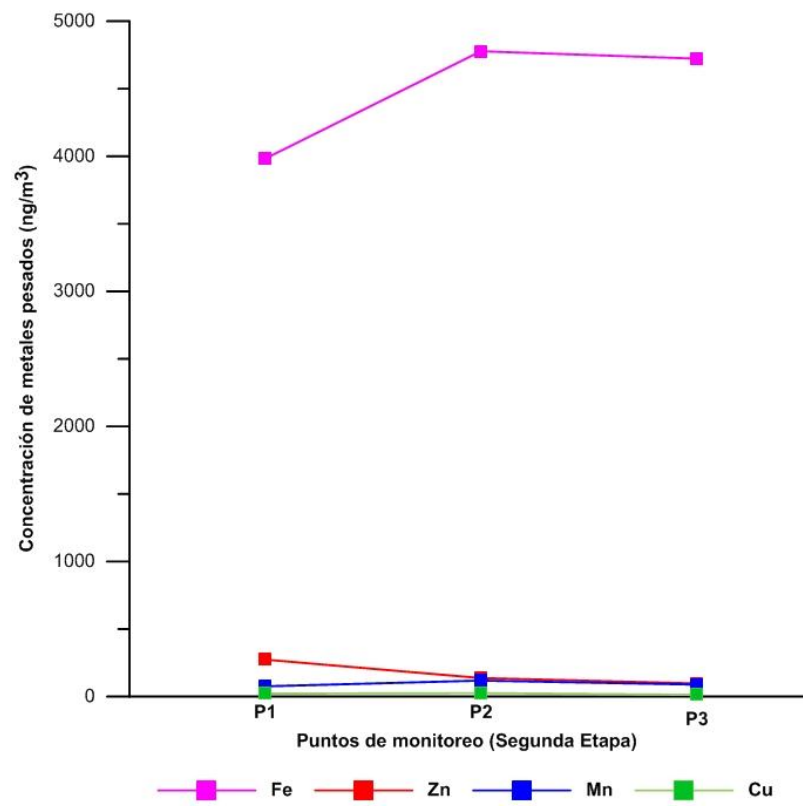


Figura 22. Variación de la concentración de metales presentes en las muestras de PM10 durante la segunda etapa.



De acuerdo a la figura 21, el elemento que se reporta con mayor concentración en los tres puntos de estudio es el Fe, con una variación de 1888,88 $\eta\text{g}/\text{m}^3$ en el punto P1 (Vega Muñoz y Hermano Miguel) y 3180,55 $\eta\text{g}/\text{m}^3$ en el punto P3 (Av. Ricardo Duran, vía a Baños). Los elementos Ni, Cr y Cd no fueron detectados por el equipo de absorción atómica en los puntos P1 y P3, al igual que los elementos Cr y Cd en el punto P1, debido a que el límite de detección de estos elementos de acuerdo al método es superior a los que pudieron haber existido en las muestras analizadas de material particulado PM10.

En la segunda etapa de monitoreo figura 22, el elemento que presenta las mayores concentraciones es el Fe, con una concentración mínima igual a 3981,11 $\eta\text{g}/\text{m}^3$ en el punto P1 (Vega Muñoz y Hermano Miguel) y una concentración máxima igual a 4777,77 $\eta\text{g}/\text{m}^3$ en el punto P2 (Av. Loja Remigio Tamariz). Los elementos Ni, Cr y Cd no fueron detectados por el equipo de absorción atómica en los puntos P1,P2 y P3, debido a que el límite de detección de estos elementos de acuerdo al método es superior a los que pudieron haber existido en las muestras analizadas de material particulado PM10.

Las Tablas 8 y 9 resumen las concentraciones de aniones (cloruros, nitratos y sulfatos presentes en las muestras de material particulado PM10.

Tabla 8. Concentraciones de aniones presentes en las muestras de PM10 recolectadas en los puntos de monitoreo (Primera Etapa)

Puntos de Monitoreo	Aniones ($\eta\text{g}/\text{m}^3$)		
	Cloruro	Nitrato	Sulfato
P1	2,88	19,94	28,66
P2	81,6	672,48	780,0
P3	229,77	710,77	781,95

Fuente: Resultados laboratorio Gruentec.



Tabla 9. Concentraciones de aniones presentes en las muestras de PM10 recolectadas en los puntos de monitoreo (Segunda Etapa)

Puntos de Monitoreo	Aniones(ng/m^3)		
	cloruro	nitrate	sulfato
P1	154,54	944,84	1323,31
P2	77,36	405,77	1030,56
P3	265,48	786,07	1008,75

Fuente: Resultados laboratorio Gruentec.

Las figuras 23 y 24 resumen las concentraciones de aniones (Cl^- , NO_3^- y SO_4^{2-}), determinados en las muestras de PM10 procedentes de los tres sitios de estudio, durante las dos etapas de monitoreo.

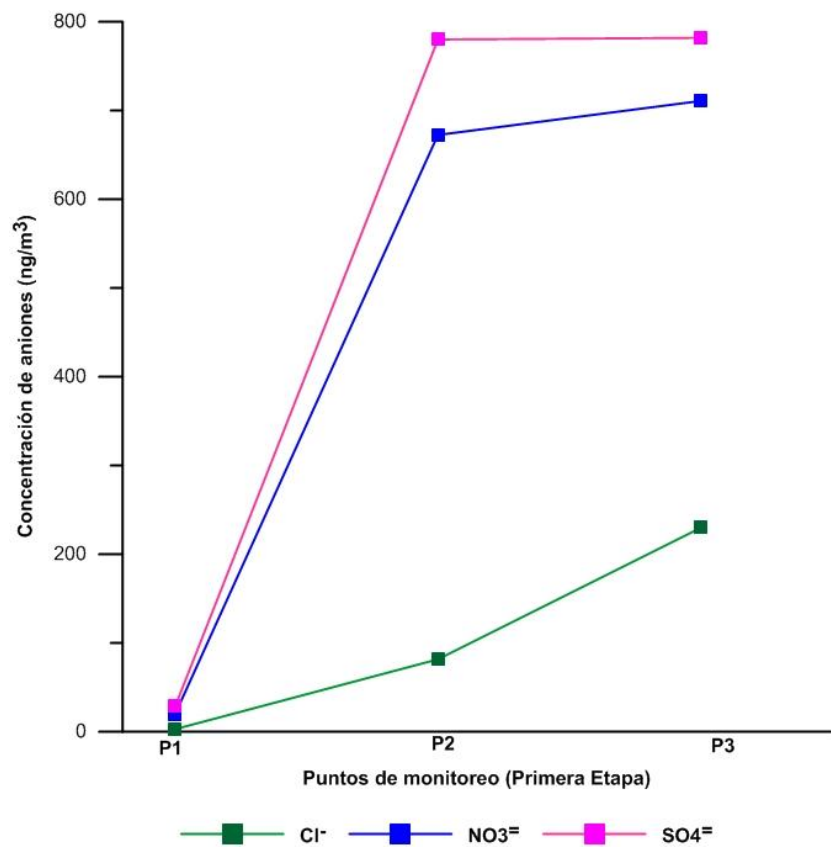


Figura 23. Variación de la concentración de aniones en las muestras de PM10 durante la primera etapa.

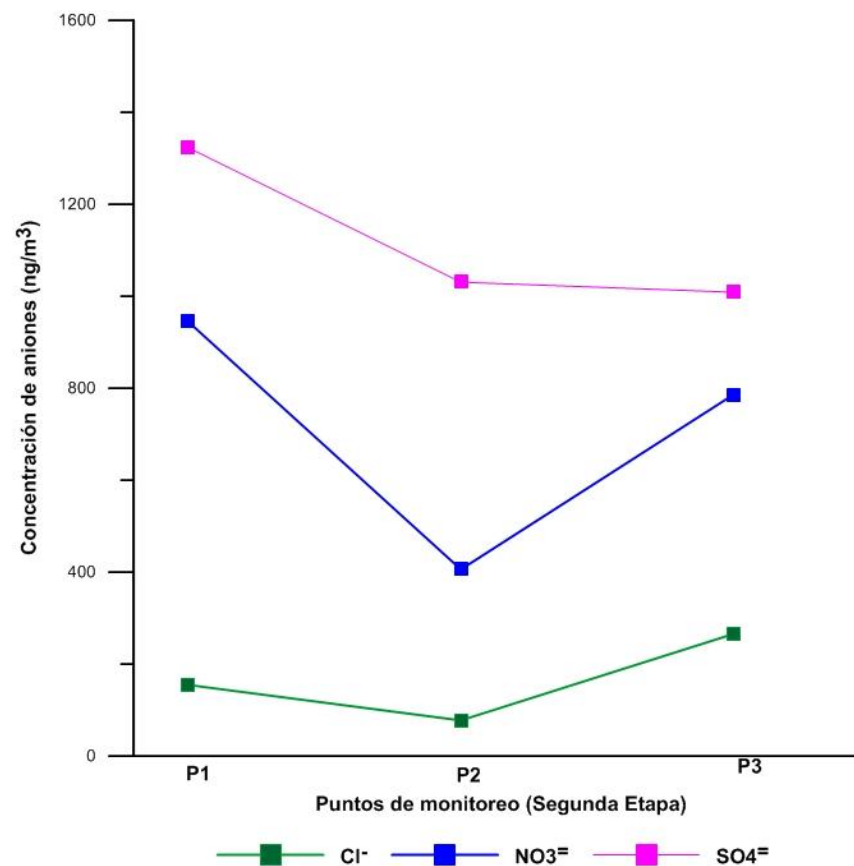


Figura 24. Variación de la concentración de aniones en las muestras de PM10 durante la segunda etapa.



Analizando la figura 23, los aniones sulfato presentan las mayores concentraciones en los tres puntos de estudio, registrándose un máximo 781,95 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en el punto P3 (Av. Ricardo Duran) y un mínimo en el punto P1 (Vega Muñoz y Hermano Miguel) con una concentración igual a 28,66 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

Los aniones nitrato registran valores de concentración superiores a los cloruros, registrándose el valor máximo en el punto P3 (Av. Ricardo Duran) con una concentración igual a 710,77 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ y una concentración mínima igual a 19,94 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en el punto P1 (Vega Muñoz y Hermano Miguel).

En la figura 24, las mayores concentraciones se registran para los aniones sulfato, seguido de los nitratos y finalmente los cloruros.

Durante la segunda etapa el Punto P1 (Vega Muñoz y Hermano Miguel) se registra las mayores concentraciones de nitratos y sulfatos, mientras que las mayores concentraciones de aniones cloruros se registran en el punto P3 (Av. Ricardo Durán).

4.4 ACTIVIDAD GENOTÓXICA DE LAS SOLUCIONES ACUOSOLUBLES DE MATERIAL PARTICULADO PM10, EN LA LÍNEA CELULAR (A549).

Previo a la ejecución del test de genotoxicidad es indispensable establecer el porcentaje de células viables, el presente estudio utilizó el test de viabilidad mediante el ensayo de doble tinción FDA-BrEt, la demostración de que el potencial citotóxico no está interviniendo en el efecto genotóxico es fundamental para cualquier estudio.



4.4.1 VIABILIDAD DE LAS SOLUCIONES ACUOSOLUBLES DE MATERIAL PARTICULADO PM10, EN LA LÍNEA CELULAR (A549).

La evaluación de la citotoxicidad de los tratamientos de PM10 ($0,82\text{m}^3/\text{ml}$; $1,25\text{m}^3/\text{ml}$ y $1,63\text{m}^3/\text{ml}$), junto con los controles positivo y negativo se realizó en la línea celular A549, este ensayo se valoró por quintuplicado, y los resultados se observan en el Anexo 4.

Las figuras 25, 26, 27, 28, 29 y 30 resumen los ensayos de viabilidad celular para cada dosis o tratamiento aplicado ($0,82\text{m}^3/\text{ml}$; $1,25\text{m}^3/\text{ml}$ y $1,63\text{m}^3/\text{ml}$), así como el respectivo control negativo y positivo.



Solución Acuosoluble PM10 Punto P1. (Primera Etapa)

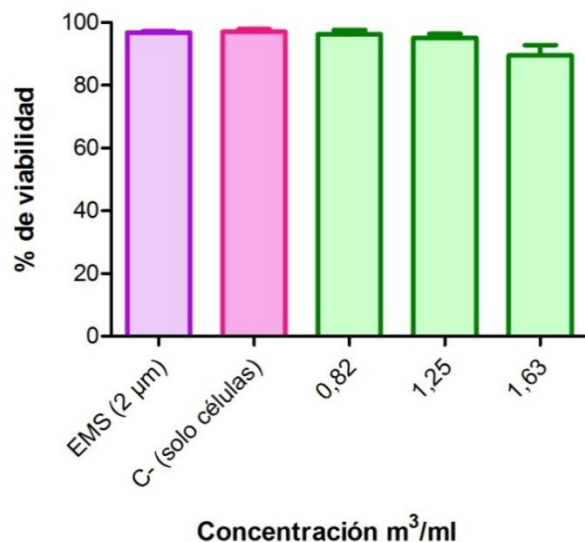


Figura 25. Viabilidad celular Punto P1 (Primera Etapa)

Las barras representan la media de las células epiteliales alveolares A549 vivas, obtenidas de cinco experimentos independientes, utilizando el test no paramétrico Oneway, el análisis de varianza Kruskal-Wallis y pos test Dunnett (**P>0,05).

Solución Acuosoluble PM10 Punto P1. (Segunda Etapa)

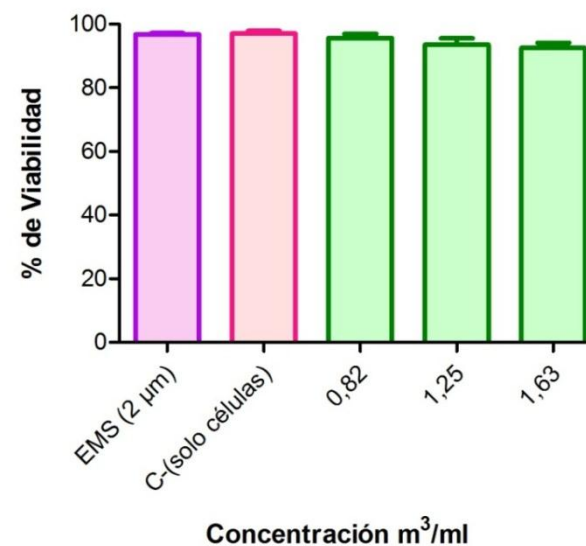
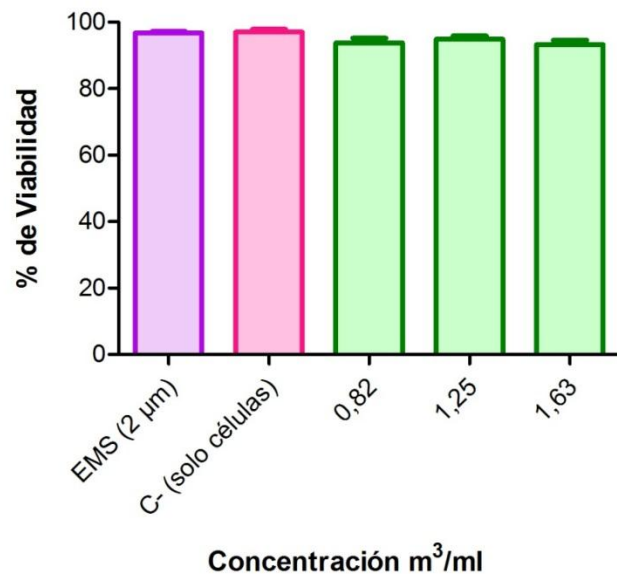


Figura 26. Viabilidad celular Punto P1 (Segunda Etapa)

Las barras representan la media de las células epiteliales alveolares A549 vivas, obtenidas de cinco experimentos independientes, utilizando el test no paramétrico Oneway, el análisis de varianza Kruskal-Wallis y pos test Dunnett (**P>0,05).

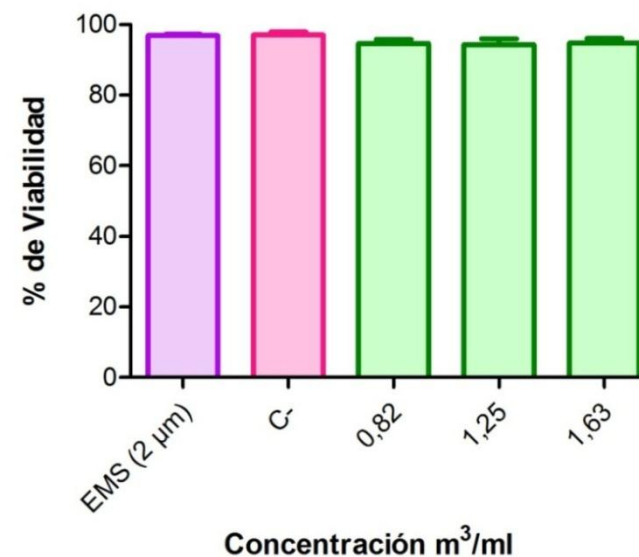


Solución Acu soluble PM10 Punto P2. (Primera Etapa)

**Figura 27.** Viabilidad celular Punto P2 (Primera Etapa)

Las barras representan la media de las células epiteliales alveolares A549 vivas, obtenidas de cinco experimentos independientes, utilizando el test no paramétrico Oneway, el análisis de varianza Kruskal-Wallis y pos test Dunnett (**P>0,05).

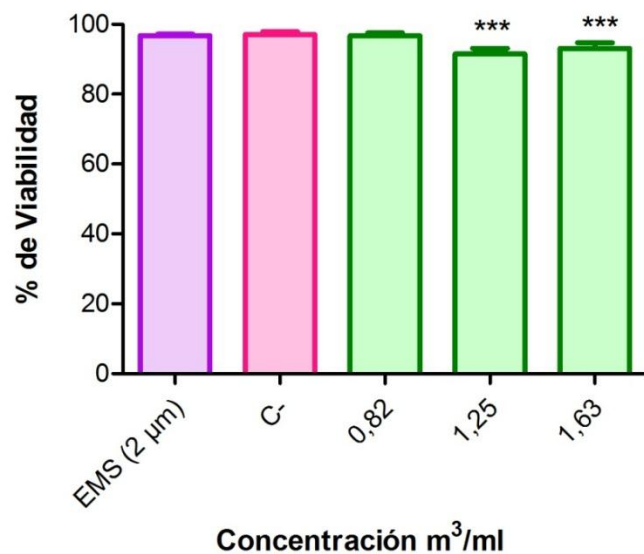
Solución Acu soluble PM10 Punto P2. (Segunda Etapa)

**Figura 28.** Viabilidad celular Punto P2 (Segunda Etapa)

Las barras representan la media de las células epiteliales alveolares A549 vivas, obtenidas de cinco experimentos independientes, utilizando el test no paramétrico Oneway, el análisis de varianza Kruskal-Wallis y pos test Dunnett (**P>0,05).

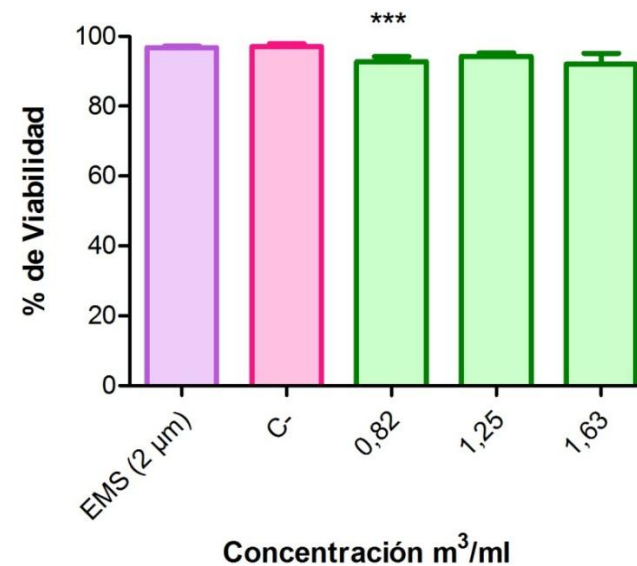


Solución Acu soluble PM10 Punto P3. (Primera Etapa)

**Figura 29.** Viabilidad celular Punto P3 (Primera Etapa)

Las barras representan la media de las células A549 vivas, obtenidas de cinco experimentos independientes, utilizando el test no paramétrico Oneway, el análisis de varianza Kruskal-Wallis y Mann-Whitney (***) $P < 0,05$).

Solución Acu soluble PM10 Punto P3. (Segunda Etapa)

**Figura 30.** Viabilidad celular Punto P3 (Segunda Etapa)

Las barras presentan la media de las células A549 vivas, obtenidas de cinco ensayos independientes utilizando el test no paramétrico Oneway, el análisis de varianza Kruskal-Wallis/Mann-Whitney (***) $P < 0,05$).



En la tabla 10, se pueden observar los resultados de viabilidad de las células epiteliales A549, con los diferentes tratamientos obtenidos en los tres puntos de estudio.

Tabla 10. Porcentaje de viabilidad de las células A549, tratadas con diferentes dosis de solución acuosa de PM10.

Dosis	% de viabilidad \pm Std.Desviación					
	P1 (I etapa)	P1 (II etapa)	P2 (I etapa)	P2 (II etapa)	P3 (I etapa)	P3 (II etapa)
C+(EMS)	96,83 \pm 1,10	96,83 \pm 1,10	96,83 \pm 1,10	96,83 \pm 1,10	96,83 \pm 1,10	96,83 \pm 1,10
C-(solo células)	97,01 \pm 2,67	97,01 \pm 2,67	97,01 \pm 2,67	97,01 \pm 2,67	97,01 \pm 2,67	97,01 \pm 2,67
0,82m³/ml	96,32 \pm 4,20	95,62 \pm 4,09	93,78 \pm 4,4	94,61 \pm 3,4	96,82 \pm 2,1	92,83 \pm 4,2
1,25m³/ml	95,09 \pm 4,20	93,55 \pm 6,1	94,87 \pm 3,1	94,23 \pm 5,2	91,52 \pm 5,1	94,30 \pm 2,9
1,63m³/ml	89,55 \pm 10,36	92,56 \pm 4,9	93,25 \pm 4,2	94,69 \pm 4,0	93,10 \pm 5,1	92,08 \pm 9,06

Los resultados de la tabla 10 se muestran como la media \pm SD (desviación estándar) de cinco experimentos independientes, cada uno de ellos realizado por duplicado. Al aplicar el análisis estadístico Kruskal-Wallis para determinar diferencias significativas entre los tratamientos en cada uno de los puntos de estudio se concluye que no existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados en los tres puntos de estudio. ($P > 0,05$). La tabla 12 presentada en los anexos resume la viabilidad de cada uno de los cinco ensayos.

4.4.2 LARGO DE COLA CON LAS SOLUCIONES ACUOSOLUBLES DE PM10.

Las figuras 31, 32, 33, 34, 35 y 36 muestran el daño en el DNA de las células A549, en base al largo de cola del cometa.



Solución Acuosoluble PM10 Punto P1. (Primera Etapa)

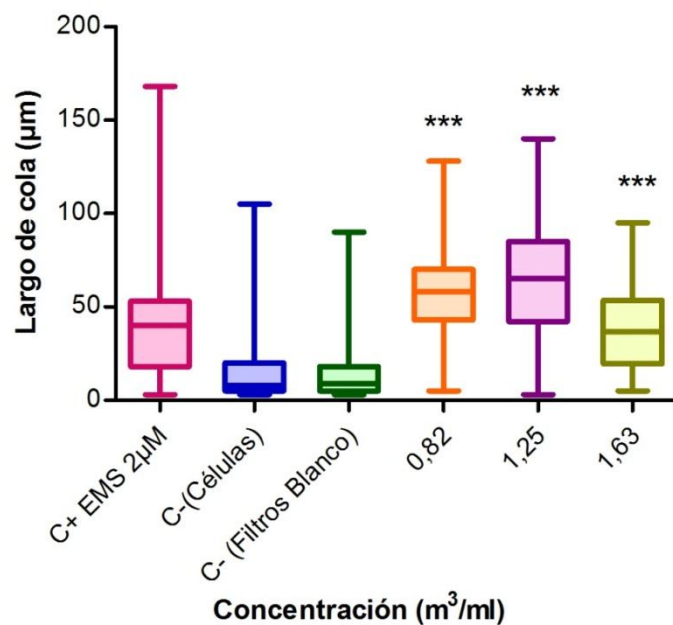


Figura 31. Efecto genotóxico en células epiteliales alveolares A549, tratadas con diferentes concentraciones de solución acuosa de PM10. Prueba de Kruskal-Wallis (** $P < 0,0001$). Punto P1 (Primera Etapa).

Solución Acuosoluble PM10 Punto P1. (Segunda Etapa)

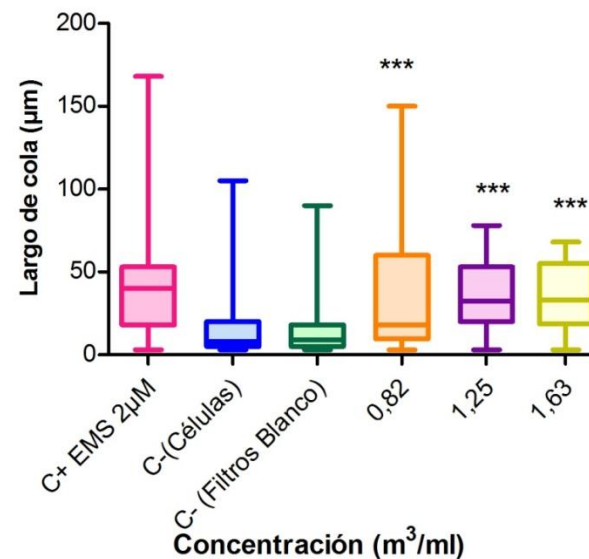


Figura 32. Efecto genotóxico en células epiteliales alveolares A549, tratadas con diferentes concentraciones de solución acuosa de PM10. Prueba de Kruskal-Wallis (** $P < 0,0001$). Punto P1 (Segunda Etapa).



Solución Acuosoluble PM10 Punto P2. (Primera Etapa)

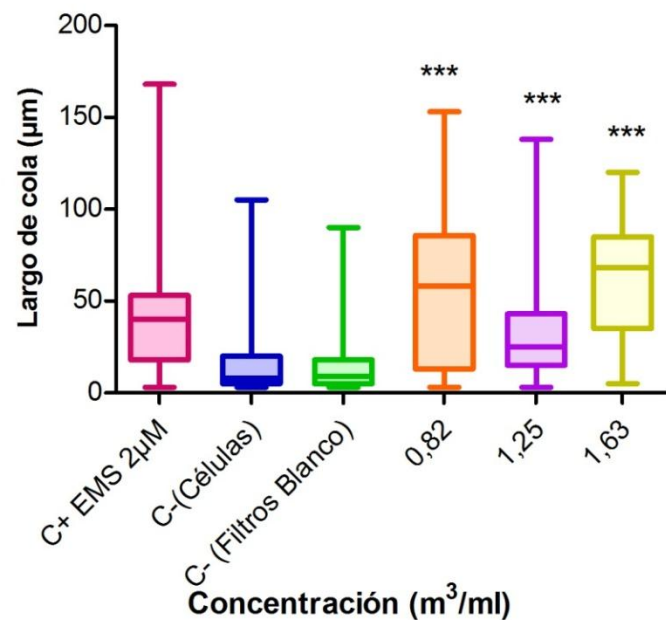


Figura 33. Efecto genotóxico en células epiteliales alveolares A549, tratadas con diferentes concentraciones de solución acuosa de PM10. Prueba de Kruskal-Wallis (**P < 0,0001). Punto P2 (Primera Etapa).

Solución Acuosoluble PM10 Punto P2. (Segunda Etapa)

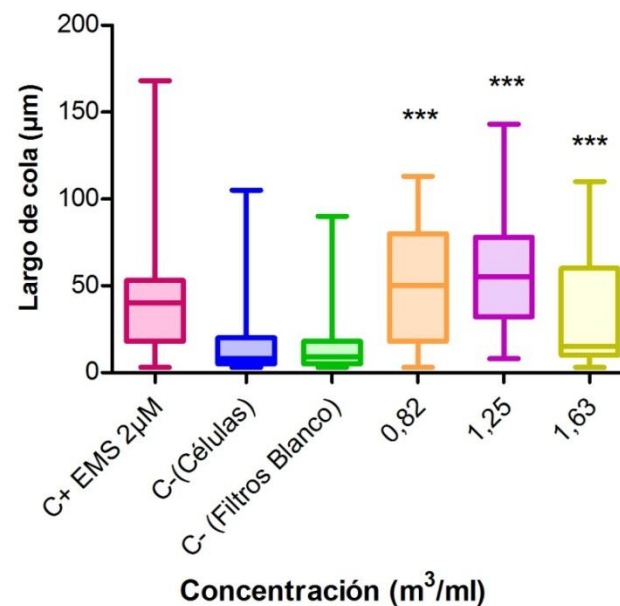


Figura 34. Efecto genotóxico en células epiteliales alveolares A549, tratadas con diferentes concentraciones de solución acuosa de PM10. Prueba de Kruskal-Wallis (**P < 0,0001). Punto P2 (Segunda Etapa).



Solución Acuosoluble PM10 Punto P3. (Primera Etapa)

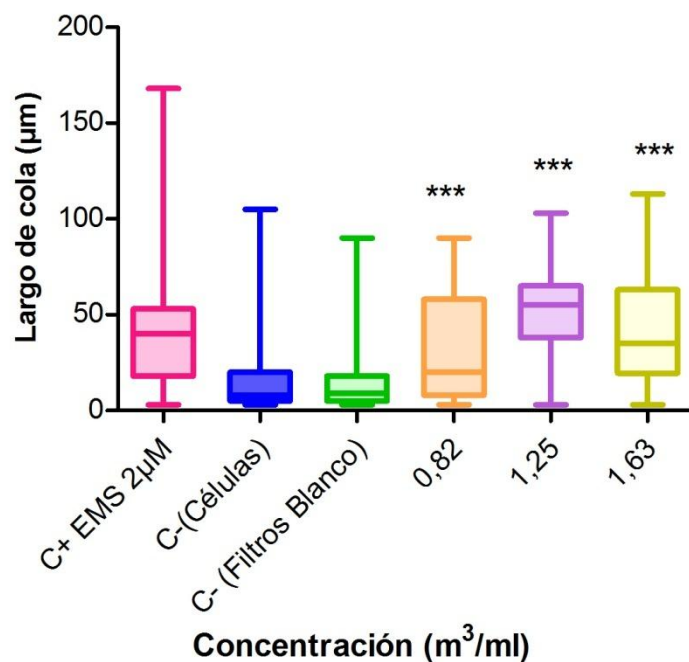


Figura 35. Efecto genotóxico en células epiteliales alveolares A549, tratadas con diferentes concentraciones de solución acuosoluble de PM10. Prueba de Kruskal-Wallis(***P<0,0001). Punto P3 (Primera Etapa).

Solución Acuosoluble PM10 Punto P3. (Segunda Etapa)

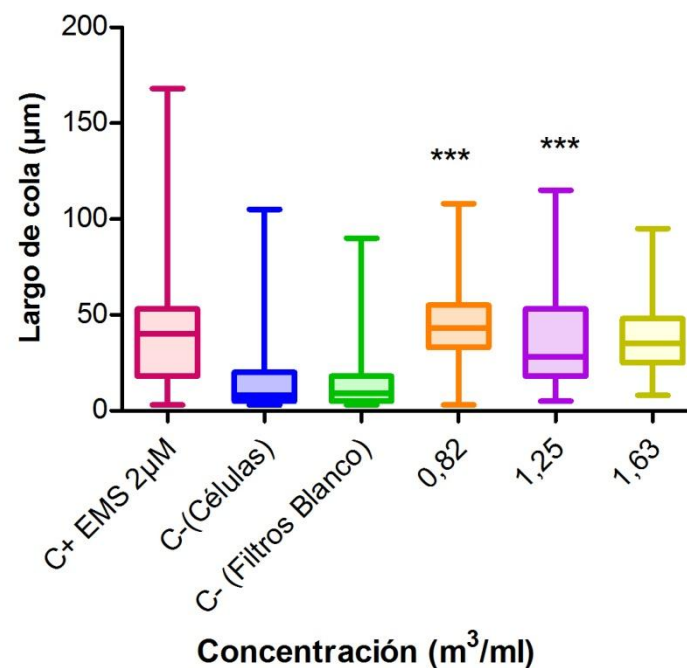


Figura 36. Efecto genotóxico en células epiteliales alveolares A549, tratadas con diferentes concentraciones de solución acuosoluble de PM10. Prueba de Kruskal-Wallis(***P<0,0001). Punto P3 (Segunda Etapa).



De acuerdo al análisis estadístico se puede apreciar que no existen diferencias significativas entre los controles negativos ($p>0.05$).

Los resultados se muestran como la media de tres experimentos, utilizando el test paramétrico ANOVA y pos test de Dunnett, con respecto a los controles negativos.

4.4.3 DETERMINACIÓN DE LA CATEGORÍA DE DAÑO CELULAR.

La tabla 11 presenta las categorías de daño celular en cada uno de los sitios de estudio, de acuerdo a las diferentes dosis aplicadas.

Tabla 11. Genotoxicidad (expresada en longitud de cola, μm) de tres experimentos, en células epiteliales alveolares A549, expuestos a diferentes dosis de material particulado PM10 de la ciudad de Cuenca.

Puntos de estudio	Tratamiento	Promedio \pm DS	Tipo de daño			
			I	II	III	IV
Punto P1 (Primera Etapa)	EMS (2 μM)	41 \pm 32	15	13	18	4
	C-(solo células)	18 \pm 21,5	36	6	7	1
	C-(Filtros Blanco)	18 \pm 22,7	39	2	8	1
	0,82m ³ /ml	56 \pm 22,1	5***	7	31	7
	1,25m ³ /ml	63 \pm 30,9	6	7	22	15
	1,63m ³ /ml	38 \pm 21,0	13***	15	21	1
Punto P1 (Segunda Etapa)	EMS (2 μM)	41 \pm 32,3	15	13	18	4
	C-(solo células)	18 \pm 21,5	36	6	7	1
	C-(Filtros Blanco)	18 \pm 22,7	39	2	8	1
	0,82m ³ /ml	35 \pm 32,9	27***	6	11	6
	1,25m ³ /ml	36 \pm 19,8	11***	20	19	0
	1,63m ³ /ml	35 \pm 18,8	12***	20	18	0
Punto P2 (Primera Etapa)	EMS (2 μM)	41 \pm 32,3	15	13	18	4
	C-(solo células)	18 \pm 21,5	36	6	7	1
	C-(Filtros Blanco)	18 \pm 22,7	39	2	8	1



	0,82m ³ /ml	55±38,2	15	4	17	14
	1,25m ³ /ml	31±19,8	17***	20	12	1
	1,63m ³ /ml	62±30,20	6***	8	21	15
Punto P2 (Segunda Etapa)	EMS (2μM)	41±32,3	15	13	18	4
	C-(solo células)	18±21,5	36	6	7	1
	C-(Filtros Blanco)	18±22,7	39	2	8	1
	0,82m ³ /ml	49±30,5	13***	11	17	9
	1,25m ³ /ml	58±33,4	6***	13	20	11
	1,63m ³ /ml	34±29,5	27***	4	15	4
Punto P3 (Primera Etapa)	EMS (2μM)	41±32,32	15	13	18	4
	C-(solo células)	18±21,5	36	6	7	1
	C-(Filtros Blanco)	18±22,7	39	2	8	1
	0,82m ³ /ml	31±26,0	25	7	17	1
	1,25m ³ /ml	53±21,1	4	12	30	4
	1,63m ³ /ml	42±27,8	12***	17	15	6
Punto P3 (Segunda Etapa)	EMS (2μM)	41±32,2	15	13	18	4
	C-(solo células)	18±21,5	36	6	7	1
	C-(Filtros Blanco)	18±22,7	39	2	8	1
	0,82m ³ /ml	44±19,8	5***	17	25	3
	1,25m ³ /ml	37±24,0	13***	19	16	2
	1,63m ³ /ml	38±18,4	8***	21	19	2

Todos los valores provienen de 50 datos, obtenidos de cada uno de tres experimentos. Se utilizó la prueba de Dunnett para determinar el nivel de significancia entre el tratamiento y los controles negativos. Los valores se expresan como la media \pm la desviación estándar ($X \pm DS$) y las pruebas se consideraron significativas con una ($***p < 0,0001$).

El Anexo 5 presenta un resumen del análisis estadístico (ANOVA), realizado entre los controles y las dosis aplicadas para determinar diferencias significativas.



CAPITULO V: DISCUSIÓN

5.1 COMPARACIÓN CON RESPECTO A LA NORMA ECUATORIANA.

En los puntos de monitoreo P1, P2 y P3 en donde se analizaron las concentraciones de PM10, no es posible realizar comparaciones con la normativa, ya que la misma establece un período anual de monitoreo, sin embargo para tener un valor de referencia si se compara con la concentración máxima permisible de $50\mu\text{g}/\text{m}^3$ que establece la Legislación Ambiental como promedio anual, se tiene que las concentraciones promedio de PM10 en los sitios de monitoreo superan el patrón establecido en la normativa nacional.

5.2 CONDICIONES METEOROLÓGICAS

Inicialmente se estudiaron las condiciones meteorológicas durante el período de investigación (11/01/2013 - 06/11/2013).

En la primera y segunda etapa del monitoreo en el punto P1 (Vega Muñoz y Hermano Miguel), se registraron temperaturas promedio de $16,9^{\circ}\text{C}$ y $17,26^{\circ}\text{C}$ respectivamente. Por otro lado la velocidad y la precipitación durante la investigación en el punto P1 en la primera etapa presentó valores de $26,5 \text{ km/h}$ y $3,26 \text{ mm}$ diarios, mientras que en la segunda etapa la velocidad del viento y la precipitación registró valores de $20,16 \text{ km/h}$ y $1,1 \text{ mm}$ diarios respectivamente.

En el punto de monitoreo P2 (Av. Loja y Remigio Tamariz) se registró una temperatura promedio de $16,53^{\circ}\text{C}$ y $15,96^{\circ}\text{C}$ durante la primera y segunda etapa de monitoreo respectivamente, la velocidad del viento y la precipitación promedio en este punto durante la primera etapa fue de $11,16 \text{ km/h}$ y $1,22 \text{ mm}$ diarios y en la segunda etapa se reportó un valor promedio de velocidad del viento igual a $27,76 \text{ km/h}$ y una precipitación promedio de $2,46 \text{ mm}$ diarios.



Finalmente en el punto P3 (Av. Ricardo Duran), la temperatura promedio registrada durante la primera etapa fue de 14,66°C y 16,76°C en la segunda etapa, la velocidad promedio del viento en las dos etapas de monitoreo presentaron valores de 26,83Km/h y 30,16 Km/h, en cuanto a la precipitación se obtuvieron promedios de 0,27mm diarios en la primera etapa y 2,38 mm diarios en la segunda etapa.

5.3 RELACIÓN ENTRE EL MATERIAL PARTICULADO Y LAS CONDICIONES METEOROLÓGICAS.

Se procedió a graficar los valores de concentración de material particulado PM10 corregidos, de las muestras tomadas en los puntos de monitoreo P1, P2 y P3 durante la primera y segunda etapa, con su respectiva regresión para hallar comportamientos de la concentración versus las condiciones meteorológicas (temperatura, humedad, velocidad del viento y precipitaciones). Figuras 15,16, 17, 18,19 y 20.

Se puede apreciar mediante el análisis de modelos de regresión lo siguiente: para el punto P1 durante la primera fase de monitoreo, se observa una tendencia lineal de concentración, la cual permite diagnosticar que no existe una relación entre la concentración de PM10 y las variables meteorológicas (temperatura, humedad, velocidad del viento y precipitación), los coeficientes de determinación para los diferentes comportamientos oscilan entre ($R^2=0,0057$) y ($R^2=0,28$) es decir no son elevados, lo cual hace que se tenga un resultado no significativo. Durante la segunda fase de monitoreo en el punto P1 se hallan condiciones muy similares a la anterior con coeficientes de determinación que varían entre ($R^2=0,0004$) y ($R^2=0,07$), es decir no existe relación entre las variables meteorológicas y la concentración, por tal motivo es imposible predecir un cambio en una de las variables como resultado de un cambio en la otra.

Mediante el análisis de los modelos de regresión en el punto P2 (Av. Loja y remigio Tamariz), se observa una tendencia lineal con coeficientes de determinación



que varían entre ($R^2=0,00077$) y ($R^2=0,015$) para la primera etapa y ($R^2= 0,00083$) y ($R^2=0,36$) en la segunda etapa. En el punto P3 (Av. Ricardo Duran) durante las dos etapas de monitoreo se registran condiciones muy similares a los dos puntos anteriores con coeficientes de determinación muy bajos que oscilan entre ($R^2=0,0014$) y ($R^2=0,030$) en la primera etapa y ($R^2=1,94E-06$) y ($R^2=0,0043$) en la segunda etapa, lo cual permite diagnosticar que no existe una buena correlación entre las variables concentración y condiciones meteorológicas.

El análisis de X2 (Chi Cuadrado) de las concentraciones de material particulado PM10 con las condiciones meteorológicas en los tres puntos de estudio reportan valores de Sig. Asintótica (bilateral) superiores a 0,05; por tal motivo se acepta la hipótesis de que las variables son independientes y se concluye que no hay dependencia entre las variables.

Los mayores niveles de concentración se registran en el punto P3 correspondiente a la Av. Ricardo Duran (sector del colegio Rafael Borja), con promedios iguales a $171,36\mu\text{g}/\text{m}^3$ en la primera etapa y $182,66\mu\text{g}/\text{m}^3$ en la segunda etapa, seguida del punto P2 localizado en la Av. Loja y Remigio Tamariz, finalmente el punto P3 referente a la calle Vega Muñoz y Hermano Miguel, registra las menores concentraciones de material particulado PM10.

Uno de los informes de la calidad del aire de Cuenca desarrollado por parte de Red de monitoreo EMOV (Empresa Municipal de Movilidad) de la alcaldía de la ciudad, afirma que los aumentos de las concentraciones de PM10 se deben a una combinación de un potencial incremento de emisiones y de condiciones meteorológicas menos favorables, lo que corrobora en parte lo fundamentado anteriormente. (Alcaldía de Cuenca, 2010).

Investigaciones anteriores desarrolladas por el Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca en una publicación denominada Evaluación del riesgo de exposición a sustancias tóxicas procedentes de la contaminación atmosférica en la ciudad de Cuenca, concluye que a medida que aumenta la humedad el material



Particulado sedimenta y baja la concentración en el aire de las partículas. Además manifiesta que la presencia de la humedad genera cierta cohesión entre las partículas más gruesas, las que sedimentan evitando que sean levantadas por el viento, en esa misma investigación se concluye que las concentraciones de material particulado se ven influenciadas por la lluvia y la humedad. (Jachero., 2010).

En la presente investigación si bien las concentraciones de material particulado PM10 registradas en los puntos P1, P2 y P3, no dependen de las condiciones meteorológicas, se podría asumir que las variaciones en la concentración de PM10 estarían asociadas al incremento de emisiones vehiculares, que a su vez dependerán del número de automotores que circulen por el área de evaluación. Esta aseveración se considera única y exclusivamente bajo las condiciones que se han presentado en los diferentes puntos de evaluación.

5.4 EVALUACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL MATERIAL PARTICULADO PM10.

El análisis químico de las muestras de PM10 detectó la presencia de iones sulfato (SO_4^-), cloruro (Cl^-) y nitrato (NO_3^-), metales hierro (Fe), zinc (Zn), manganeso (Mn), cobre (Cu), y níquel (Ni), corroborando lo concluido por Jachero et al. (2008), Cheung et al. (2011) y Capó (2002).

Las concentraciones más elevadas de metales pesados en el material particulado PM10 de la ciudad de Cuenca durante la primera etapa de monitoreo en los tres puntos de estudio se registraron para el Fe, con valores que oscilan entre $1888,88 \text{ ng/m}^3$ en el punto P1 y $3180,55 \text{ ng/m}^3$ en el punto P3, las concentraciones más bajas corresponden a Ni con un valor igual $26,83 \text{ ng/m}^3$ en el punto P1.

No fue posible detectar concentraciones de Cr y Cd en las muestras de PM10 ya que el equipo empleado para el análisis presenta límites de detección superiores a los que posiblemente pudieran encontrarse en las muestras. (Tabla 6).



Durante la segunda etapa de monitoreo en el punto P1, P2 y P3 las concentraciones máximas de metales pesados se registran para el Fe con valores que varían entre $3981,11\text{ng/m}^3$ en el punto P1 y $4722,66\text{ng/m}^3$ en el punto P3, las mínimas concentraciones se registran para el Cu con valores que fluctúan entre $12,94\text{ng/m}^3$ en el punto P3 y $25,88\text{ng/m}^3$ en el punto P2. De forma similar a la etapa anterior, las concentraciones de los metales Ni, Cr y Cd en esta etapa no pudieron ser determinadas. (Tabla 7). Las concentraciones de Fe y Mn tendieron a aumentar en las segundas etapas de monitoreo, durante los meses de febrero-abril en el punto P1, mayo-julio en el punto P2 y septiembre-noviembre en el punto P3, en coincidencia con los meses donde se registran mayores concentraciones de Material particulado PM10.

Mientras que las concentraciones registradas para los metales Mn, Zn, Cu y Ni en las dos etapas oscilan entre $26,83$ y $274,05\text{ng/m}^3$.

Jachero, et al. (2010) han reportado que las mayores concentraciones de metales pesados, en las muestras de material particulado PM10 de la ciudad de Cuenca corresponden a Fe y Al, con valores superiores a los 100ng/m^3 , en tanto que las concentraciones de metales como Ni, Cr, Pb, Mn, Zn y Cu oscilan entre 1 y 10ng/m^3 .

Actualmente no existe legislación Ecuatoriana que limite las concentraciones máxicas de metales pesados en aire ambiente, para la protección de la salud humana por inhalación de estas partículas, salvo para Cadmio. Entonces se procedió a comparar las concentraciones registradas con respecto a los estándares estipulados por la OMS (Organización Mundial de la Salud), en los casos en los que se dispone y los criterios de toxicología que presenta la agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades de los Estados Unidos (ASTDR).

Así la ASTDR estipula como valores guías de concentración de metales en aire ambiente los siguientes: para el caso del Cr la concentración debe oscilar entre $0-30\text{ng/m}^3$, para el Cu el límite estipulado es de $1-200\text{ng/m}^3$, para el Ni el valor fluctúa entre $7-12\text{ng/m}^3$, para el Zn el valor guía oscila entre $100-1700\text{ng/m}^3$, y para el Fe no se reportan valores guía.



La OMS reporta como valor guía para Cd en aire ambiente una concentración de 5ng/m^3 , para el Mn un valor guía de 150ng/m^3 .

El Ni, en el punto P1 excede los niveles de la ASTDR durante la primera etapa de monitoreo. En cuanto al Fe no se dispone de valores guía en el aire ambiente.

Las variaciones de las concentraciones de metales pesados en las muestras de material particulado PM10, estarían condicionadas al uso de suelo donde se realizó el monitoreo y la elevada densidad del tráfico, esto se fundamenta dado que al evaluar la relación entre las variables climáticas y las concentraciones de metales pesados asociados al PM10, no se pueden predecir cuál serían los cambios en una de las variables como resultado de un cambio en la otra.

Las concentraciones más elevadas de aniones, en las muestras de material particulado PM10 recolectadas en la ciudad de Cuenca, corresponden al ion sulfato, seguido de nitratos y finalmente de iones cloruro.

Al realizar una comparación con los resultados obtenidos en un estudio similar realizado por la Corporación para el Mejoramiento del Aire de Quito – CORPAIRE, en el año 2006, se observa una relación similar entre los resultados, encontrándose en el polvo sedimentable de la ciudad de Quito un mayor porcentaje de iones sulfato, seguido de iones nitratos y finalmente iones cloruros (sulfatos 15.1%, nitratos 7%, cloruros 0,4%), en áreas con alto tráfico vehicular, representando los iones un total del 25 % de los componentes presentes en el material particulado de esta ciudad.

Los metales hallados en las muestras de PM10 del aire de la ciudad de Cuenca como el Ni, Cu y V de acuerdo a investigaciones anteriores son señalados como genotóxicos (Moreno, 2003; Gutiérrez, M. et al., 2006); estos metales pueden promover la formación de lesiones oxidativas, Sahagún (2009), menciona que estudios referentes a citotoxicidad y potencial proinflamatorio en las vías respiratorias han sido asociados con estrés oxidativo, efectos atribuidos al potencial oxidante de componentes solubles, como los metales de transición asociados a las partículas atmosféricas, el hierro elemento determinado en mayor proporción en el



aire ambiente de la ciudad de Cuenca es señalado como un irritante local para los pulmones y el tracto gastrointestinal, si es inhalado. Los informes indican que la exposición prolongada a una mezcla de polvo de hierro y otros metales puede afectar a la función pulmonar, Gunnar, (2001). El cinc otro de los metales encontrados en la caracterización del PM de la ciudad de Cuenca, se encuentra incluido en el grupo D, no clasificable respecto a su actividad cancerígena, por la USEPA (IRIS, 2000), ya que tanto la evidencia obtenida en personas como en animales se considera inadecuada. Moreno, (2003).

En cuanto al manganeso Gunnar, (2001) manifiesta que la absorción de manganeso a través de la piel puede considerarse despreciable, sin embargo la intoxicación crónica por manganeso puede tener manifestaciones nerviosas o pulmonares.

Estudios previos implican a los metales de transición como mediadores de inflamación y citotoxicidad a través de mecanismos de oxidación; las partículas atmosféricas contienen metales ionizables los cuales producen ROS en solución acuosa, de forma similar a los hallazgos encontrado por Frampton et al., (1999).

Otras evidencias señalan que los metales de transición y otros productos químicos asociados a las partículas atmosféricas pueden también ejercer efecto pro-inflamatorio en el sistema respiratorio y generar ROS (por ejemplo el Fe, Ni, Cu, Co y Cr) puede desempeñar un importante papel en este efecto. Li, N et al., (2008).

Al aplicar el análisis estadístico para pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis para determinar si existen diferencias significativas entre las medias de las concentraciones de cada uno de los metales pesados determinados en los tres sitios de estudio se concluye no significativo dado que el valor de $p > 0,05$.



5.5 ACTIVIDAD GENOTÓXICA DE LAS SOLUCIONES ACUOSOLUBLES DE PM10.

El objetivo principal de esta investigación fue determinar si el extracto acuoso de PM10 recolectado del aire ambiente de la ciudad de Cuenca ocasiona lesiones en el DNA de las células epiteliales alveolares A549, es decir determinar si el PM10 causa genotoxicidad en un estudio in vitro. El análisis químico de las muestras se centró en la determinación de metales pesados y aniones.

El daño celular ocasionado por los extractos acuoso de PM10 se valoró en células del epitelio alveolar A549, utilizando el ensayo del cometa alcalino.

Esta línea celular es utilizada ampliamente para evaluación del daño del DNA inducido por la contaminación ambiental. Gutiérrez, M et al. (2006).

Como se indicó anteriormente previo al ensayo de genotoxicidad es indispensable evaluar citotoxicidad, con la finalidad de observar la habilidad de las células para soportar los rigores de los agentes tóxicos presentes en el PM10.

5.5.1 VIABILIDAD DE: SOLUCIÓN ACUOSOLUBLE DE PM10.

En la figura 25, se detalla el porcentaje de viabilidad de las células epiteliales A549, expuestas por 24 horas a dosis de 0,82; 1,25 y 1,63 m^3/ml de solución acuoso de material particulado PM10, recolectado en el Punto P1 (Primera Etapa). El análisis estadístico demuestra que no existen diferencias significativas entre las dosis aplicadas y el control negativo. Así también se puede observar que a medida que aumenta la dosis del extracto acuoso de PM10, la viabilidad disminuye. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test no paramétrico Oneway: el análisis de varianza de Kruskal-Wallis ya que este constituye la versión no paramétrica más acertada del análisis de varianza clásico, para conocer a cerca de la existencia de una diferencia significativa entre cada una de las dosis y su



control negativo. Los resultados obtenidos de sig. asintótica al aplicar el estadígrafo de Kruskal-Wallis, en el punto P1 para determinar diferencias significativas entre dosis aplicadas y el tratamiento negativo fueron superiores a 0,05.

Los resultados obtenidos del ensayo de viabilidad con FDA-BrEt, en el punto P1 (Segunda etapa) se muestran en la figura 22, la misma que indica que los porcentajes de viabilidad de las células A549, expuestas a las diversas dosis de PM10 superan los 80%. El análisis estadístico demuestra que a dosis de (0,82; 1,25 y 1,63 m³/ml), no existen diferencias significativas con respecto al control negativo (P>0,05).

De manera similar a lo ocurrido con la viabilidad en la primera etapa, en la segunda etapa a medida que aumenta la dosis de la solución acuosoluble de PM10, disminuye el porcentaje de viabilidad celular.

Los resultados obtenidos del ensayo de viabilidad con las soluciones acuosolubles de PM10 procedentes del punto P2 en la primera y segunda etapa se presentan en las figuras 27 y 28 respectivamente, el análisis estadístico no paramétrico Onewey: análisis de varianza Kruskal-Wallis concluye que tanto en la primera etapa como en la segunda etapa las dosis aplicadas a las células A549, no presentan diferencias significativas (P>0,05).

La figura 29 detalla el porcentaje de viabilidad de las células expuestas por 24 horas a diferentes concentraciones de solución acuosoluble de PM10 procedente del punto P3 (primera etapa), el análisis estadístico con el test de kruskal-Wallis/Mann-Whitney señala que a dosis de 1,25 y 1,63m³/ml existe diferencia significativa con respecto al control negativo (P<0,05).

La figura 30 resumen el porcentaje de viabilidad celular con la aplicación de las soluciones acuosolubles de PM10 procedentes del punto P3 (segunda etapa), el análisis estadístico con el test de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney, demuestra que a las dosis de 0,82m³/ml, existen diferencias significativas con respecto al control negativo. (P<0,05).



Los resultados de viabilidad de las células epiteliales A549, con todas las dosis probadas son superiores al 89% en todos los casos.

No existen diferencias significativas entre los valores medios del porcentaje de viabilidad celular registrados con los extractos acuosolubles de PM10 durante las dos etapas en cada uno de los tres puntos de estudio ($P > 0,05$).

5.5.2 LARGO DE COLA CON LA SOLUCIÓN ACUOSOLUBLE DE PM10 EN EL PUNTO P1.

En la figura 31 se puede apreciar que el extracto acuosoluble de PM10, recolectado en el punto P1 durante la primera etapa, induce daño genotóxico en las células epiteliales A549, esto se atribuye por el largo de cola de los cometas. El análisis estadístico mediante el test de Kruskal-Wallis y post test de Dunnett, demuestran que a dosis de 0,82; 1,25 y 1,63 m³/ml existen diferencias significativas respecto a los controles negativos (sólo células y blanco del extracto acuosoluble de los papeles filtro) (** $P < 0.0001$).

La figura 32 indica la migración del DNA con la aplicación de la solución acuosoluble de PM10 en el punto P1 durante la segunda etapa, el estadígrafo de Kruskal-Wallis y Dunnett muestran que a partir de la dosis de 0,82 m³/ml existen diferencias significativas con respecto a los controles negativos.

También gracias al análisis del test de Dunnett se puede establecer que no existen diferencias significativas entre los controles negativos.

5.5.3 LARGO DE COLA CON LA SOLUCIÓN ACUOSOLUBLE DE PM10 EN EL PUNTO P2.

Los derivados del extracto acuosoluble de PM10 en el punto P2 durante la primera etapa del monitoreo figura 33 presentan un efecto genotóxico.



El análisis estadístico a través de la prueba de Kruskal-Wallis y post test de Dunnett, demuestran que a dosis de 0,82, 1,25 y 1,63m³/ml, existen diferencias significativas con respecto a los controles negativos, con un valor de sig. Asintótica inferior a 0,05 (**P<0,0001).

Los tratamientos probados de PM10 resultantes del monitoreo de la segunda etapa en el punto P2 figura 34 demuestran ser genotóxicos, ya que al aplicar el análisis estadístico referente al test de Kruskal-Wallis y post test de Dunnett, se obtienen valores de sig. Asintótica inferiores a 0,05 (**P<0,0001), lo cual indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados con respecto a los controles negativos.

5.5.4 LARGO DE COLA CON LA SOLUCIÓN ACUOSOLUBLE DE PM10 EN EL PUNTO P3.

En la figura 35 se observa que las concentraciones de 1,25; y 1,63m³/ml, resultan ser genotóxicas, esta aseveración se demuestra ya que al aplicar el análisis estadístico con el test de Kruskal-Wallis y post test de Dunnett, se obtienen valores de sig. Asintótica inferiores a 0,05 (**P<0,0001), lo que demuestra que existen diferencias significativas entre las dosis mencionadas anteriormente con respecto a los controles negativos.

A pesar de que en el punto P3 se determinaron las mayores concentraciones de PM10, no significa que en este se tenga que reportar mayor número de daño celular, en estudios previos se indica que concentraciones iguales de PM de diferentes zonas tiene diferente potencial genotóxico, por ello es más relevante la caracterización del PM10, que la concentración, siendo por lo tanto la composición un elemento crucial en la evaluación sobre los efectos en la salud. (Gutiérrez, et al., 2006).



La figura 36, muestra que las dosis de 0,82; 1,25 y 1,63 m³/ml de la solución acuosoluble de PM₁₀ inducen actividad genotóxica, siendo altamente significativo con respecto a los controles negativos (**P<0,0001).

Oyarzún, (2010) concluye que los efectos a corto plazo por la exposición a PM₁₀ y PM_{2,5} son aumento en la morbilidad respiratoria, disminución en la función pulmonar, inflamación mononuclear, interferencia en fagocitosis y depuración mucociliar, así también el investigador indica que los efectos a largo plazo por la exposición a PM₁₀ y PM_{2,5} son bronquitis crónica, genotoxicidad y aumento de la frecuencia de cáncer pulmonar.

5.6 CATEGORÍA DE DAÑO CELULAR.

La exposición de las células epiteliales alveolares A549, a diferentes dosis de extracto acuosoluble de PM₁₀ obtenido de la ciudad de Cuenca, indujeron baja genotoxicidad en el DNA de las células en el ensayo in vitro, los resultados mostraron que los metales presentes en las muestras de PM₁₀ pudieron contribuir con la capacidad de daño en el DNA de las células, como fue reportado en estudios previos realizados por Gutiérrez., M. et al. (2006); esta conclusión está en contraste con los resultados de otros estudios de genotoxicidad con extractos orgánicos y acuosolubles de material particulado. (Gutiérrez, M; et al. 2006).

Como se observa en la tabla 11, en el punto P1 de la primera etapa las células que muestran daño espontaneo no superan una longitud de cola de 18µm y la mayoría de las células (72%-78%) están en el rango I, mostrando que la mayoría de las células tienen algo de daño pero bajo, del 4% al 12% de las células presenta daño tipo II que corresponde a un daño medio, del 14% al 16% de las células presentan daño tipo III y apenas el 2% de las células resultaron totalmente dañadas. De igual manera con la dosis de 0,82 m³/ml de la solución acuosoluble de PM₁₀ se observa que el 10% de las células tienen daño tipo I; 14% daño tipo II; 62% daño tipo III y 14% daño tipo IV.



Con la aplicación de la dosis de $1,25\text{m}^3/\text{ml}$, el 12% de las células presenta daño tipo I; el 14% daño tipo II; el 44% daño tipo III y el 30% daño tipo IV.

Con la dosis de $1,63\text{m}^3/\text{ml}$; se tiene que el 26% de las células presenta daño tipo I, 30% daño tipo II; 42% daño tipo III y 2% daño tipo IV.

Al analizar el tipo de daño celular, en el punto P1 de la primera etapa, se observa que las dosis de 0,82 y $1,63\text{m}^3/\text{ml}$ de la categoría I producen daño en el DNA de las células A549, ya que estas presentan diferencias significativas con respecto a los controles negativos, $p < 0,0001$ de acuerdo al test de Kruskal-Wallis y pos test de Dunnett, sin embargo el daño ocasionado en las categorías II, III y IV no es significativo, de acuerdo a los datos proporcionados por el estadígrafo de Dunnett para determinar significancia entre los tratamientos y los controles negativos.

Por lo fundamentado anteriormente se establece que la genotoxicidad registrada en el punto P1 de la primera etapa es de tipo I, es decir genotoxicidad baja.

Al analizar el daño celular ocasionado por los tratamientos recolectados en el punto P1 durante la segunda etapa de monitoreo, se observa que al exponer las células a la dosis de $0,82\text{m}^3/\text{ml}$ el 54% de las mismas presenta daño tipo I; el 12% daño tipo II; el 22% daño tipo III y el 12% daño tipo IV. Con la dosis de $1,25\text{m}^3/\text{ml}$ el 22% tiene daño tipo I; el 40% daño tipo II; el 38% daño tipo III y ninguna de las células mostró daño tipo IV. Con la aplicación del tratamiento de $1,63\text{m}^3/\text{ml}$ se obtuvo que el 24 % de las células presentan daño tipo I, el 40% daño tipo II, el 36% daño tipo III y no se registran células con daño tipo IV.

El daño celular ocasionado por la aplicación de la solución acuosoluble de PM10 en el punto P1 de la segunda etapa, es de tipo I. Los valores obtenidos para la categoría I con las tres dosis ($0,82$ $1,25$ y $1,63\text{m}^3/\text{ml}$), resultaron ser significativos respecto a los controles negativos ($p < 0,001$). Los valores obtenidos para las categorías II, III y IV no son significativos, según la prueba estadística de Kruskal-Wallis y test de Dunnett para varias muestras independientes.



Los extractos acuosolubles de PM10 recolectados durante las dos etapas en el punto P1 inducen genotoxicidad, con un daño celular tipo I denominado genotoxicidad baja (<20um).

Los extractos acuosolubles de PM10 procedentes del punto P2 durante la primera etapa del monitoreo generan daño celular; así al aplicar la dosis de 0,82m³/ml el 30% de las células presentan daño tipo I; el 8 % daño tipo II; el 34% daño tipo III y el 28% daño tipo IV. El tratamiento de 1,25 m³/ml provocó en el 34% de las células un daño tipo I; el 40% presentan daño tipo II, el 24% daño tipo III y el 2% daño tipo IV. La dosis 1,63m³/ml el 12% de las células presento daño tipo I, el 16% daño tipo II; el 42% daño tipo III y el 30% daño tipo IV.

El daño genotóxico inducido por la dosis 0,82m³/ml de PM10, en punto P2 durante la segunda etapa se establece en las siguientes categorías; 26% de las células presenta daño tipo I, 22% daño tipo II, 34% daño tipo III y 18% daño tipo IV.

La dosis de 1,25m³/ml indujo que el 12% de las células presenten daño tipo I; el 26% daño tipo II; 40% daño tipo III y el 22% daño tipo IV. Finalmente el tratamiento de 1,63m³/ml ocasionó que el 54% de las células presenten daño tipo I, el 8% daño tipo II; 30 % daño tipo 3 y el 8% daño tipo IV.

Al analizar estadísticamente las longitudes de los cometas generados, por la aplicación de los extractos de PM10 del punto P2 primera etapa sobre las células en cada una de las cuatro categorías de daño celular, se aprecia en la tabla 11 que existen diferencias significativas entre las dosis de 1,25m³/ml y 1,63 m³/ml respecto con los tratamientos negativos en la categoría de daño tipo I. Las categorías II, III y IV no reportan diferencias significativas entre las dosis aplicadas y los controles negativos.



De manera similar a la anterior el daño genotóxico reportado para las dosis de PM10 procedente del punto P2 durante el monitoreo en la segunda etapa, muestra que las dosis de 0,82; 1,25 y 1,63m³/ml presentan diferencias significativas con respecto al control negativo en la categoría de daño tipo I. Las categorías tipo II, III, IV presentan valores de daño genotóxico no significativos con respecto a los controles negativos.

Las células A549, al ser expuestas a la solución acuosoluble de PM10 recolectado en el punto P3 de la primera etapa, muestran que con la dosis de 0,82m³/ml el 50% de las células presentan daño tipo I, el 14% daño tipo II, el 34% daño tipo III y el 2% daño tipo IV. Al aplicar la dosis de 1,25 m³/ml; el 8% presenta daño tipo I; el 24% daño tipo II; el 60% daño tipo III y el 8% daño tipo IV, finalmente con el tratamiento de 1,63m³/ml el 24% de las células presentó daño tipo I; el 34% daño tipo II; el 30% daño tipo III y el 12% daño tipo IV.

En cuanto a las dosis de solución acuosoluble de PM10, provenientes del punto P3 segunda etapa se tiene que con el tratamiento de 0,82 m³/ml el 10% de las células presentó daño tipo I; el 34% daño tipo II; el 50% daño tipo III y el 6% daño tipo IV. La aplicación de la dosis de 1,25 m³/ml, indujo que el 26% de las células presenten daño tipo I; el 38% daño tipo II; el 32% daño tipo III y el 4% daño tipo IV.

Posteriormente la dosis de 1,63m³/ml, género que el 16% de las células presente daño tipo I; el 42% daño tipo II; el 38% daño tipo III y el 4% daño tipo IV.

La solución acuosoluble de PM10 recolectada en el punto P3 durante la primera etapa del monitoreo generó toxicidad en las células epiteliales alveolares A549, sin embargo esta genotoxicidad se la clasifica dentro de la categoría I, es decir genotoxicidad baja, ya que el análisis estadístico en esta categoría presentó diferencias significativas entre la concentración de 1,63m³/ml respecto con los controles negativos, según el test de Kruskal-Wallis y posterior test de Dunnett. La genotoxicidad generada con los tratamientos en las categorías II, III y IV resultó no significativa respecto de los controles negativos.



En el punto P3 durante la segunda etapa se registró daño celular tipo I es decir genotoxicidad baja, dado que las dosis de 0,82; 1,25 y 1,63m³/ml presentaron diferencias significativas respecto a los controles negativos en esta categoría. Las categoría de daño celular II, III y IV no fueron significativas respecto a los controles negativos.

5.7 IDENTIFICACIÓN DEL RIESGO.

Investigaciones anteriores han reportado marcadas diferencias entre la genotoxicidad y las características químicas del material particulado de diferentes localidades, evaluados tanto en ensayos acelulares como en cultivos celulares, sugiriendo que la composición química del material particulado heterogéneo se debe muy probablemente a las fuentes locales, (Sahagún, 2009).

La Investigación previa desarrollada por el Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca referente a la Evaluación del Riesgo de Exposición a Sustancias Tóxicas procedentes de la Contaminación Atmosférica en la ciudad de Cuenca concluye que la composición química del PM10 de la ciudad es muy diversa y que los componentes analizados son en su mayoría de origen antropogénico, variando con la ubicación de la zona y la época de monitoreo (Jachero, 2008), la presencia de metales en las partículas atmosféricas contribuye a la diferencia en el potencial de oxidación que presentan en el DNA. (Sahagún, 2009).

El aire ambiente de la ciudad de Cuenca tiene como parte de su composición metales pesados y aniones, esto podría explicar los resultados obtenidos en esta investigación referentes al daño celular, ya que la presencia de los metales en los análisis realizados en las muestras de PM10 de la ciudad, registraron presencia de (Fe, Zn, Mn, Cu, Ni) y aniones (Cl⁻, NO₃⁻, SO₄⁼).



Es de anotar que varios metales pesados han sido asociados en investigaciones previas con estrés oxidativo, efectos atribuidos al potencial oxidante de componentes solubles, como los metales de transición asociados a las PA, que catalizan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y conllevan al subsecuente desequilibrio de sistemas antioxidantes, a la inducción de citosinas y factores de transcripción y que finalmente culminan en inflamación, daño celular y/u oxidación de macromoléculas y apoptosis Sahagún (2009), otros estudios concluyen que el material particulado fracción respirable induce genotoxicidad en linfocitos humanos, lo cual puede ser uno de los factores de riesgo que contribuyen al aumento del índice de cáncer en la población expuesta, debido a que puede inducir mutaciones en el genoma de las células expuestas, además puede ingresar hasta el núcleo de las células. (Beleño, H et al.2013).

En la tabla 11 se observa que todas las dosis de solución acuosa de PM10 procedentes de los tres sitios de muestreo inducen daño de bajo nivel (tipo I) en el DNA de las células epiteliales alveolares A549 ($p < 0,0001$).

Esto indica que los genotóxicos que llegan a la población de la ciudad de Cuenca, podrían penetrar hasta el núcleo de las células humanas y dañar su DNA, a pesar de que el estudio se realizó en células epiteliales alveolares *en ensayos in vitro*, no se puede dar respuesta definitiva sobre la genotoxicidad del PM10 en humanos.

Recordemos que los agentes genotóxicos interaccionan con el DNA y ocasionan lesiones, las mismas que pueden ser reparadas eficiente o ineficientemente, además hay que recordar que los componentes de mezclas complejas pueden interactuar unos con otros para producir sinergia, efectos antagónicos o aditivos.



CAPITULO VI:

CONCLUSIONES

- El punto con mayores concentraciones de material particulado PM10, se localiza en el punto P3 (Av. Ricardo Duran), al Sur-este de la ciudad de Cuenca.
- Al analizar la dependencia entre las variables meteorológicas y la concentración del material particulado PM10 en los tres puntos de estudio se tiene un resultado no significativo ($p > 0,05$); por lo tanto no hay dependencia entre las variables, asumiendo que las concentraciones de PM podrían depender de otras variables como el flujo vehicular, las actividades desarrolladas próximas a cada sitio de estudio y las características propias del área de evaluación.
- El aire ambiente de la ciudad de Cuenca, tiene como parte de su composición metales pesados (Fe, Zn, Mn, Cu, Ni) y aniones (Cl^- , NO_3^- ; $\text{SO}_4^{=}$).
- No existen diferencias significativas entre las concentraciones de metales pesados registrados en cada uno de los puntos de estudio.
- La solución acuosoluble de PM10 procedente de los tres sitios de monitoreo del cantón Cuenca indujo genotoxicidad sobre las células epiteliales alveolares A549.
- La genotoxicidad ocasionada, por los extractos acuosolubles de PM10 sobre las células A549, podría atribuirse en parte a la presencia de metales y aniones en la muestras de MP, sin embargo sería necesario ampliar la caracterización del MP de la ciudad de Cuenca, referente a la presencia de HAPs (hidrocarburos aromáticos policíclicos), los mismos que son de interés por su potencial mutagénico.
- La genotoxicidad inducida en las células epiteliales A549, en los tres sitios de estudio es de tipo I, es decir baja.
- La extrapolación de los resultados puede conducir a la hipótesis sobre el riesgo de la exposición de la población a la contaminación del aire de la Ciudad de Cuenca, dado que en el presente estudio, se demostró que los



extractos acuosolubles de PM10 causan o inducen genotoxicidad en concentraciones de 0,82, 1,25 y 1,63 m³/ml. Estos resultados concuerdan con otras investigaciones realizadas por otros autores.



RECOMENDACIONES

- Caracterizar químicamente el extracto acuoso soluble, para identificar cuáles son exactamente los químicos que lesionan el DNA de las células.
- Trabajar con los extractos insolubles para determinar genotoxicidad en las células epiteliales alveolares y establecer con mayor evidencia el tipo de daño ocasionado por el PM10 de la ciudad de Cuenca.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alcaldía de Cuenca, Red de Monitoreo EMOV EP, *Informe de la calidad del aire*, 2010.
- Aldabe, J. (2011). *Caracterización físico-química del material particulado en la Comunidad Foral de Navarra*. Alley.
- Angulo, L., Huertas, J., Restrepo, G. (2011). *Caracterización de Partículas Suspendidas (PST) y partículas Respirables (PM10) producidas en Áreas de explotación carbonífera a cielo abierto*. Información tecnológica, 22(4), 23-34.
- Arciniegas Suárez, C. A. (2012). "Diagnóstico y control de material particulado: partículas suspendidas totales y fracción respirable PM10. Journal Luna Azul (34): 195-213.
- Balcarce, E. (2009). *Manual de procedimientos para determinación de material particulado*. Gobierno de Chile, Ministerio de Salud.
- Beleño, H., Quijano, P., & Meléndez, G. (2013). *Actividad mutagénica y genotóxica del material particulado PM 2.5 en Cúcuta, Colombia*. Revista MVZ Córdoba, 18.
- BéruBé, K., Balharry, D., Sexton, K., Koshy, L., and Jones, T. (2007). *Combustion derived nanoparticles: mechanisms of pulmonary toxicity*. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 34(10), 1044-1050.
- California Environmental Protection Agency. Air Resources Board (ed.): *Particulate Matter Program*.
- Capó, M. (2002). *Principios de ecotoxicología. Diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente*. Madrid McGraw-Hill.
- Carballo, M., Cortada, C., Gadano, A. (2005). *Riesgos y Beneficios en el Consumo de Plantas Medicinales*, *Theoria*, Vol. 14 (2): 95-108.
- Carmona, E. (2009). *Evaluación genotóxica de algunos metales pesados en Drosophila melanogaster mediante los ensayos SMART de alas y Cometa*. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Carvalho, T. C., Peters, J. I., & Williams III, R. O. (2011). *Influence of particle size on regional lung deposition—What evidence is there* *International Journal of Pharmaceutics*, 406(1), 1-10.



- Castañeda, V. (2006). *Desarrollo de la tecnología de “Fitoremediación” Para mejorar la calidad del aire en el Área Metropolitana San Salvador (AMPSS)*. Salvador. Universidad Dr. José Matías Delgado.
- Cheung, K., Daher, N., Kam, W., Shafer, M.M., Ning, Z., Schauer, J.J., and Sioutas, C. (2011). *Spatial and temporal variation of chemical composition and mass closure of ambient coarse particulate matter ($PM_{10-2.5}$) in the Los Angeles area*. *Atmospheric Environment* 45, 2651-2662.
- Díaz Suárez, V., and Páez Pérez, C. (2011). *Contaminación por material particulado en Quito y caracterización química de las muestras*. *Revista Acta Nova* 3.
- Eldon D., Bradley F. (2006). *Ciencia Ambiental*. México McGraw-Hill
- EPA (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos), n/d. *Particulate Matter (PM)*. Descargado de <http://www.epa.gov/airquality/particlepollution/index.html> el 06 de mayo de 2013.
- Frampton, M. W., Ghio, A. J., Samet, J. M., Carson, J. L., Carter, J. D., & Devlin, R. B. (1999). *Effects of aqueous extracts of PM10 filters from the Utah Valley on human airway epithelial cells*. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 277(5), L960-L967.
- Flores, M. (2006). *Contaminación del Aire: Análisis de Plomo en el aire en la zona urbana de Cuenca*. Cuenca: Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca, Comisión de Gestión ambiental de la I. Municipalidad de Cuenca.
- Gamboa, T. (2009). *Tesis Genotoxicidad en Poblaciones Infantiles Expuestas a Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HPA's) en la atmósfera del Estado de Tabasco*. México. Universidad Nacional Autónoma de México.
- García, M., Carreras, H. (2008). *Análisis de la genotoxicidad de material particulado recolectado en dos ciudades de la provincia de Córdoba, Argentina, mediante el ensayo de micronúcleos*. [Versión electrónica]. *Journal especializado en Químico – Biológicas*, 17(1), 33-40. Consultado en Diciembre 12, 2012 en <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=29917104>



- García, N., Carrillo G., Astudillo A., Vázquez V. (2006). Niveles de Material Particulado en diferentes zonas de la Ciudad de Cuenca. Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca.
- Gunnar, N. Metales: *propiedades químicas y toxicidad*. [En línea] En: Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. 4ª Edición. Organización Internacional del Trabajo. Capítulo 63. pp. 63.39-63.44 (2001).
- Gutiérrez M., Roubicek D., Cebrian M., De Vizcaya A., Cedeño M., Ostrosky P. (2006). *Effect of Chemical Composition on the Induction of DNA Damage by Urban Airborne Particulate Matter*. México.
- Heredia, D., Paéz, D.(2008). *Monitoreo de las emisiones de combustión en fuentes fijas en Industrias del cantón Rumiñahui*. Sangolquí. Escuela Politécnica del Ejército.
- HOFFMAN, D., RATTNER, B., BURTON, A., & CAIRNS, J. (2002). Handbook of Ecotoxicology
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. INEC <http://www.inec.gob.ec/>
- Jachero, L. Moscoso, D. (2009). *Evaluación del Riego de Exposición a sustancias tóxicas procedentes de la contaminación atmosférica en la ciudad de Cuenca*. Cuenca- Ecuador. Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca.
- Li, N., Xia, T., & Nel, A. E. (2008). *The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles*. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(9), 1689-1699.
- Martínez Florez, K., Souza Arroyo, V., Buzio Ortiz, L., Gómez Quiroz, L. E., & Gutiérrez Ruiz, M. C. (2013). Cadmio: *efectos sobre la salud. Respuesta celular y molecular*. *Acta Toxicológica Argentina*, 21(1).
- Ministerio del Ambiente. (2002). Texto Unificado de la Legislación Ambiental Secundaria.
- Moreno, M.D. (2003). *Toxicología Ambiental Evaluación de riesgo para la salud humana*. España: Editorial McGraw-Hill.
- Nordberg, G., & Nordberg, G. metales: propiedades químicas y toxicidad productos químicos.



- Olivos, M., (2004). *Importancia Ambiental de Componentes Orgánicos y Macromolecular Acuoso-solubles en las Partículas Atmosféricas de la ZMVM*.
- *Instituto Politécnico Nacional Centro Interdisciplinario de Investigación y estudios sobre el Medio Ambiente y Desarrollo (CIEMAD)*. México.
- Oyarzún G, M., (2010). *Contaminación aérea y sus efectos en la salud*. Revista chilena de enfermedades respiratorias, 26(1), 16-25.
- Parra, A. Q., Vargas, M. J. Q., & Martínez, J. A. H. (2010). *Caracterización fisicoquímica del material particulado-fracción respirable PM2.5 en Pamplona-Norte de Santander-Colombia*. Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas, 8(1), 53-66.
- Pérez, Y., Segura, Y., and Osornio-Vargas, A. R. *Daño a ADN desnudo por partículas contaminantes del aire*.
- Pope, C., Dockery, D., *Health Effects of Fine Particulate Air Pollution: Lines that Connect*. J. of the Air & Waste Management Association., 56:6, 709-742.
- Kumar, V., Abbas, A. K., & Fausto, N. (2010). Robbins y Cotran. *Patología estructural y funcional* (10ma ed.). España. Elsevier.
- Sahagún, M., 2009. "Efecto genotóxico de la partículas Atmosféricas Urbanas". Tesis de Pregrado. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigaciones y Estudios sobre Medio Ambiente y Desarrollo (CIEMAD).

ANEXOS

ANEXO 1

Registro Fotográfico de la Investigación

Punto P2



Muestras de PM10



Extracto acuoso de PM10



Ensayo de viabilidad celular y ensayo del cometa





ANEXO 2

Informes del análisis de metales pesados en las muestras de material particulado del aire ambiente de la ciudad de Cuenca.



C E S E M I N
 Centro de Servicios y Análisis de Metales
 Metálicos y No Metálicos
UNIVERSIDAD DE CUENCA



REPORTE DE RESULTADOS MG0025

CLIENTE: ANA LUCIA ASTUDILLO
MUESTRA: FILTROS CON MATERIAL PARTICULADO
FECHA: 2013-03-06

ANÁLISIS QUÍMICO

MUESTRA	Cu μg*	Cd μg*	Cr μg*	Fe μg*	Mn μg*	Ni μg*	Zn μg*
Material Particulado	31,67	N.C.	N.C.	340	6,5	4,83	33,67

μg* = microgramos

N.C.= No cuantificado (límite de cuantificación de Cd de acuerdo al método 4 μg; límite de cuantificación de Cr de acuerdo al método 5μg)

OBSERVACIONES:

- Método: Analysis of Metallic Air Pollulants. Analytical Methods. Perkin Elmer 1996. (Digestión ácida y lectura por absorción atómica).

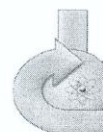
Responsable Análisis

Directora

cc. archivo



CESEMIN
Centro de Servicios y Análisis de Minerales
Metálicos y No Metálicos
UNIVERSIDAD DE CUENCA



REPORTE DE RESULTADOS RMG0139 -0140-0141

CLIENTE: ING. ANA LUCÍA ASTUDILLO

MUESTRA: FILTROS CON MUESTRAS DE AIRE (3 MUESTRAS)

FECHA: 2013-08-02

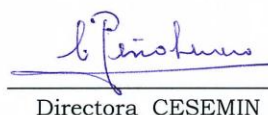
ANÁLISIS QUÍMICO

MUESTRA	Fe ug*	Cu ug	Zn ug	Mn ug	Cd ug	Ni ug	Cr ug
Sector Tecnológico Mes Mayo-Julio	860,00	4,66	24,66	21,33	N.D.	N.D.	N.D.
Sector Tecnológico Mes Abril-Mayo	504,33	4,00	39,66	10,33	N.D.	N.D.	N.D.
Sector Vega Muñoz Mes Febrero-Abril	716,6	4,00	49,33	13,66	N.D.	N.D.	N.D.

OBSERVACIONES:

- *ug: microgramos
- N.D.: No Detectado. Límite de detección de Cadmio, de acuerdo al método: 0,038ug/ml. Límite de detección de Níquel, de acuerdo al método: 0,100 ug/ml. Límite de detección de Cromo, de acuerdo al método: 0,101ug/ml.
- Método: Analysis of Metallic Air Pollutants, Analytical Methods for Atomic Absorption Spectroscopy, Perkin Elmer 1996. Digestión ácida de los filtros y lectura por Espectrofotometría de Absorción Atómica
- Fecha de recepción de muestras: 2013-07-17


 Responsable análisis


 Directora CESEMIN

cc. archivo



CESEMIN
Centro de Servicios y Análisis de Minerales
Metálicos y No Metálicos
UNIVERSIDAD DE CUENCA



REPORTE DE RESULTADOS RRMG0219-0220

CLIENTE: ING. ANA LUCÍA ASTUDILLO

MUESTRA: FILTROS CON MUESTRAS DE AIRE (2 MUESTRAS)

FECHA: 2013-11-27

ANÁLISIS QUÍMICO

MUESTRA	Fe ug*	Cu ug	Zn ug	Mn ug	Cd ug	Ni ug	Cr ug
Av. RD ETAPA I	572,50	1,83	19,33	10,83	N.D.	N.D.	N.D.
Av. RD ETAPA II	850,08	2,33	17,5	16,00	N.D.	N.D.	N.D.

OBSERVACIONES:

- *ug: microgramos
- N.D.: No Detectado. Límite de detección de Cadmio, de acuerdo al método: 0,038ug/ml. Límite de detección de Níquel, de acuerdo al método: 0,100 ug/ml. Límite de detección de Cromo, de acuerdo al método: 0,101ug/ml. Las muestras tratadas se aforaron a 50ml.
- Método: Analysis of Metallic Air Pollutants, Analytical Methods for Atomic Absorption Spectroscopy, Perkin Elmer 1996. Digestión ácida de los filtros y lectura por Espectrofotometría de Absorción Atómica
- Fecha de recepción de muestras: 2013-11-12
- El CESEMIN no realiza el muestreo, los análisis se efectúan sobre la muestra entregada por el Cliente. Los datos sobre la muestra, incluido el nombre, fueron proporcionados por el Cliente y son de su entera responsabilidad


 Responsable Área de Metales


 Directora CESEMIN

cc. archivo



Informes del análisis de aniones en las muestras de material particulado de la ciudad de Cuenca.



REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: Dra. Ana Lucía Astudillo
Av. Ricardo Durán s/n (Cuenca)
Telf: 07-2892171

Atn: Dra. Ana Lucía Astudillo

Proyecto: Análisis en filtros que contienen Material particulado

Muestra Recibida: 12-Mar-13

Tipo de Muestra: 2 muestras de filtros

Análisis Completado: 08-Abr-13

Número reporte Grüntec: 1303080-EMI001-2

Rotulación Muestra:	Filtros Usados	Filtros BLANCO	Método Adaptado de Referencia
Fecha de Muestreo:	N/D	N/D	
No. Reporte Grüntec:	1303080-EMI001	1303080-EMI002	

Aniones en peso seco:			
Cloruro mg/Kg	52	5.7	EPA 300.1
Nitrato mg/Kg	359	59	EPA 300.1
Sulfato mg/Kg	516	9.0	EPA 300.1

Nota=Los resultados se calcularon en base al peso de los filtros: 0.3316 gramos.

N/D= No Disponible

Ing. Isabel Estrella

Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opciones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien ha realizado este informe 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

San Juan de Cumbayá- Eloy Alfaro 57-157 y Belisario Quevedo, P.O. Box 17-22-20064 Quito- Ecuador
Telfs: 601-4371 / 603-9221/600-5273 - E-mail: info@gruentec.com - www.gruentec.com

REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: Dr. Ana Lucía Astudillo
Av. Ricardo Durán s/n (Cuenca)
Telf:07-2892171

Atn: Dr. Ana Lucía Astudillo

Proyecto: Muestras correspondientes al sitio Vega Muñoz y Hermano Miguel Mes Febrero-Abril

Muestra Recibida: 21-Oct-13

Tipo de Muestra: 2 Muestras de filtros

Análisis Completado: 15-Nov-13

Número reporte Grüntec: 1310195-EMI001-2

Rotulación Muestra:	Filtros BLANCO Punto 1. Vega Muñoz y Hermano Miguel Mes Febrero-Abril	Filtros Usados Punto 1. Vega Muñoz y Hermano Miguel Mes Febrero-Abril	Método Adaptado de Referencia
Fecha de Muestreo:	N/D	N/D	
No. Reporte Grüntec:	1310195-EMI001	1310195-EMI002	

Aniones en peso húmedo:			
Cloruro mg/kg	18 ^{a)}	1987 ^{b)}	EPA 300.1
Nitrato mg/kg	22 ^{a)}	12148 ^{b)}	EPA 300.1
Sulfato mg/kg	<1 ^{a)}	17014 ^{b)}	EPA 300.1

a) Los cálculos se realizan en base al peso de los filtros 0.063g.

b) Los cálculos se realizan en base al peso de la muestra 0.014g.

N/D: No Disponible



Ing. Isabel Estrella
Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opciones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien ha realizado este informe 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.

REPORTE DE ANÁLISIS

Ciente: Dr. Ana Lucía Astudillo
Av. Ricardo Durán s/n (Cuenca)
Telf:07-2892171

Atn: Dr. Ana Lucía Astudillo

Proyecto: Muestras correspondientes al TECN. Mes Abril-Mayo

Muestra Recibida: 21-Oct-13

Tipo de Muestra: 2 Muestras de filtros

Análisis Completado: 15-Nov-13

Número reporte Grüntec: 1310196-EMI001-2

Rotulación Muestra:	Filtros BLANCO Punto 2. Avenida Loja y Remigio Tamariz TECN (Fase I) Mes Abril-Mayo	Filtros Usados Punto 2. Avenida Loja y Remigio Tamariz TECN (Fase I) Mes Abril-Mayo	Método Adaptado de Referencia
Fecha de Muestreo:	N/D	N/D	
No. Reporte Grüntec:	1310196-EMI001	1310196-EMI002	

Aniones en peso húmedo:			
Cloruro mg/kg	129 ^{a)}	680 ^{b)}	EPA 300.1
Nitrato mg/kg	562 ^{a)}	5604 ^{b)}	EPA 300.1
Sulfato mg/kg	28 ^{a)}	6500 ^{b)}	EPA 300.1

N/D: No Disponible

a) Los cálculos se realizan en base al peso de los filtros. 0.064g.

b) Los cálculos se realizan en base al peso de la muestra 0.0216g.



Ing. Isabel Estrella

Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opciones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien ha realizado este informe 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.

REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: Dr. Ana Lucía Astudillo
Av. Ricardo Durán s/n (Cuenca)
Telf:07-2892171

Atn: Dr. Ana Lucía Astudillo

Proyecto: Muestras correspondientes al TECN. Mes Mayo-Julio

Muestra Recibida: 21-Oct-13

Tipo de Muestra: 2 Muestras de filtros

Análisis Completado: 15-Nov-13

Número reporte Grüntec: 1310197-EMI001-2

Rotulación Muestra:	Filtros BLANCO Punto 3. Avenida Loja y Remigio Tamariz TECN (Fase II) Mes Mayo-Julio	Filtros Usados Punto 3. Avenida Loja y Remigio Tamariz TECN (Fase II) Mes Mayo-Julio	Método Adaptado de Referencia
Fecha de Muestreo:	N/D	N/D	
No. Reporte Grüntec:	1310197-EMI001	1310197-EMI002	

Aniones en peso húmedo:			
Cloruro mg/kg	90 ^{a)}	686 ^{b)}	EPA 300.1
Nitrato mg/kg	341 ^{a)}	3598 ^{b)}	EPA 300.1
Sulfato mg/kg	5 ^{a)}	9138 ^{b)}	EPA 300.1

N/D: No Disponible

a) Los cálculos se realizan en base al peso de los filtros 0.064g.

b) Los cálculos se realizan en base al peso de la muestras 0.0203g.



Ing. Isabel Estrella

Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opciones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien ha realizado este informe 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.

REPORTE DE ANÁLISIS

Ciente: Ana Lucía Astudillo
Av. Ricardo Durán s/n (Cuenca)
Telf:07-2892171

Atn: Dr. Ana Lucía Astudillo

Proyecto: Muestras correspondientes a la Avenida Ricardo Durán

Muestra Recibida: 16-Dic-13

Tipo de Muestra: 4 Muestras de filtros

Análisis Completado: 02-Ene-14

Número reporte Grüntec: 1312184-EMI001-4

Rotulación Muestra:	Avenida Ricardo Durán (AVRD) Etapa I	Avenida Ricardo Durán (AVRD) Etapa I (BLANCO)	Método Adaptado de Referencia
Fecha de Muestreo:	N/D	N/D	
No. Reporte Grüntec:	1312184-EMI001	1312184-EMI003	

Aniones en peso húmedo:			
Cloruro mg/kg	2121 ^{a)}	20 ^{b)}	EPA 300.1
Nitrato mg/kg	6561 ^{a)}	79 ^{b)}	EPA 300.1
Sulfato mg/kg	7218 ^{a)}	8.4 ^{b)}	EPA 300.1

a) Los cálculos se realizaron en base al peso de las muestra, 0.0195gr

b) Los cálculos se realizaron en base al peso de los filtros de 0.063gr.

N/D: No Disponible



Ing. Isabel Estrella

Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opciones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien ha realizado este informe 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.

REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: Ana Lucía Astudillo
Av. Ricardo Durán s/n (Cuenca)
Telf:07-2892171

Atn: Dr. Ana Lucia Astudillo

Proyecto: Muestras correspondientes a la Avenida Ricardo Durán

Muestra Recibida: 16-Dic-13

Tipo de Muestra: 4 Muestras de filtros

Análisis Completado: 02-Ene-14

Número reporte Grüntec: 1312184-EMI001-4

Rotulación Muestra:	Avenida Ricardo Durán (AVRD) Etapa II	Avenida Ricardo Durán (AVRD) Etapa II (BLANCO)	Método Adaptado de Referencia
Fecha de Muestreo:	N/D	N/D	
No. Reporte Grüntec:	1312184-EMI002	1312184-EMI004	

Aniones en peso húmedo:			
Cloruro mg/kg	1817 ^{a)}	297 ^{b)}	EPA 300.1
Nitrato mg/kg	5380 ^{a)}	70 ^{b)}	EPA 300.1
Sulfato mg/kg	6904 ^{a)}	36 ^{b)}	EPA 300.1

a) Los cálculos se realizaron en base al peso de las muestra, 0.0263gr.

b) Los cálculos se realizarón en base al peso de los filtros de 0.064gr.

N/D: No Disponible



Ing. Isabel Estrella

Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opciones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien ha realizado este informe 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.



ANEXO 3

Técnica SCGE o ensayo del cometa.

La parte de siembra y aplicación del tratamiento es similar a la descrita para el protocolo de Viabilidad. Pasadas las 24 horas de incubación los tubos se homogenizaran y se centrifugaran durante 5 min a 400 x g y el pellet obtenido se suspende en 100 μ L del medio de cultivo.

Para el análisis del cometa se tomaran 25 μ L de las 100 μ L preparadas en el procedimiento anterior y 150 μ L de agarosa de bajo punto de fusión (LMP 0,5%) y esta mezcla se colocará en cada laminilla que contendrá previamente agarosa de un punto de fusión normal (NMP 0,5%), estas laminas se cubrirán inmediatamente con cubre objetos. Se prepararán dos laminillas por cada microtubo de siembra.

Después de preparar todas las laminillas estas se trasladarán a un refrigerador durante 10 min para fijar la agarosa. Luego se retirará el portaobjetos de cada laminilla y se colocarán 300 μ L de agarosa (LMP), para nuevamente ser cubiertas con el portaobjeto y refrigeradas a 4°C durante 10min adicionales.

Posterior a esta actividad se introducirán las laminillas en una solución de lisis: (1ml de tritón X-100, y 99ml de solución Lisis madre). La solución de lisis madre fue preparada a partir de agua desionizada, NaCl, EDTA, tris base e NaOH a pH 10. El coupling que contenía la solución de lisis con las laminillas fue refrigerado por un período de 24 horas a 4°C.

Posteriormente se realizó la corrida electroforética, para esto se dejó reposar durante 20min en el buffer de electroforesis pH>13 que contiene: (300 mM NaOH , 1 mM EDTA, se tendrá la precaución de que el buffer cubra completamente las laminillas.

Terminado este tiempo se realizará la corrida electroforética en forma horizontal. Una vez terminada la corrida las laminillas se lavarán sucesivamente con un buffer de neutralización pH 7,5 (0,4 M Tris), para neutralizar los álcalis presentes. Para su posterior análisis se deshidratarán con etanol 96%.



Para observar el daño al DNA producido por las soluciones acuosolubles de PM10, las laminillas fueron hidratadas con agua desionizada fría y teñidas con Bromuro de etidio y analizadas con microscopio de fluorescencia. Se analizó la migración del DNA (Longitud de la cola del cometa), evaluando 100 células al azar de cada diapositiva, para un total de 100 células por muestra.

ANEXO 4

Resultados de la actividad citotóxica frente a línea celular A549 del extracto acuosoluble de PM10 a diferentes concentraciones en un tiempo de exposición de 24 horas.

Tratamientos		% de Viabilidad				
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5
Punto P1 Primera Etapa	C+	95,77	96,46	97,53	96,22	95,45
	C+	96,00	97,26	99,01	98,00	96,6
	C-	97,57	98,56	92,85	95,95	96,42
	C-	99,51	98,94	99,20	99,01	92,12
	0,82	94,63	95,80	96,07	98,50	99,51
	0,82	99,51	85,53	97,00	100,00	96,66
	1,25	99,55	94,56	98,03	95,88	91,52
	1,25	97,01	87,20	99,53	97,53	90,04
	1,63	94,98	79,16	90,64	93,66	97
	1,63	94,69	66,20	95,66	83,50	100
Punto P1 Segunda Etapa	C+	95,77	96,46	97,53	96,22	95,45
	C+	96,00	97,26	99,01	98,00	96,6
	C-	97,57	98,56	92,85	95,95	96,42
	C-	99,51	98,94	99,20	99,01	92,12
	0,82	99,51	96,20	96,01	99,50	87,66
	0,82	96,27	95,54	96,00	100,00	89,54
	1,25	86,82	92,11	97,50	97,53	85,32
	1,25	83,18	97,51	97,53	98,50	99,53
	1,63	80,18	91,78	95,12	94,11	95,96
	1,63	92,83	92,19	90,00	97,77	95,67
Punto P2 Primera Etapa	C+	95,77	96,46	97,53	96,22	95,45
	C+	96,00	97,26	99,01	98,00	96,6
	C-	97,57	98,56	92,85	95,95	96,42
	C-	99,51	98,94	99,20	99,01	92,12
	0,82	97,06	94,44	95,30	93,13	84,18



	0,82	97,04	94,53	98,14	96,01	87,96
	1,25	95,78	95,19	90,36	99,50	96,13
	1,25	93,16	90,09	93,50	96,03	99
	1,63	90,49	88,13	97,01	98,08	88,55
	1,63	92,47	90,19	99,01	97,80	90,77
Punto P2 Segunda Etapa	C+	95,77	96,46	97,53	96,22	95,45
	C+	96,00	97,26	99,01	98,00	96,6
	C-	97,57	98,56	92,85	95,95	96,42
	C-	99,51	98,94	99,20	99,01	92,12
	0,82	99,25	91,97	93,75	96,75	87,62
	0,82	97,30	91,05	96,33	95,52	96,56
	1,25	99,51	80,56	93,45	96,56	93,26
	1,25	94,25	94,83	95,69	99,55	94,66
	1,63	99,26	86,30	94,54	98,04	96,06
	1,63	92,11	90,24	95,81	97,00	97,54
Punto P3 Primera Etapa	C+	95,77	96,46	97,53	96,22	95,45
	C+	96,00	97,26	99,01	98,00	96,6
	C-	97,57	98,56	92,85	95,95	96,42
	C-	99,51	98,94	99,20	99,01	92,12
	0,82	97,35	95,38	96,58	98,00	97,05
	0,82	98,77	91,90	95,69	98,01	99,5
	1,25	94,79	85,20	91,55	94,14	82,64
	1,25	97,85	86,66	94,78	96,96	90,64
	1,63	97,80	92,20	84,57	95,56	86,48
	1,63	97,78	87,66	96,31	98,54	94,06
Punto P3 Segunda Etapa	C+	95,77	96,46	97,53	96,22	95,45
	C+	96,00	97,26	99,01	98,00	96,6
	C-	97,57	98,56	92,85	95,95	96,42
	C-	99,51	98,94	99,20	99,01	92,12
	0,82	99,27	97,63	93,15	89,75	89,02
	0,82	93,06	95,14	94,68	91,98	84,61
	1,25	96,22	89,97	90,83	99,50	94,9
	1,25	92,40	94,03	96,69	96,03	92,38
	1,63	94,25	89,21	91,28	95,00	96,19
	1,63		69,54	94,73	99,04	99,48

* Los valores se expresan como porcentaje (%) de células viables

ANEXO 5.



Tablas de análisis ANOVA, mediante el software GraphPad Prism 5 para establecer diferencias significativas entre las dosis de 0,82; 1,25 y 1,63 m³/ml de la solución acuosoluble de PM10 y los controles negativos para la categorización del tipo de daño celular.

Table Analyzed	P1 Primera Etapa Categ I		
Kruskal-Wallis test			
P value	P<0.0001		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	87,90		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
C+ vs C-	84,79	Yes	***
C+ vs Blanco	82,29	Yes	***
C+ vs 0,82	-23,64	No	ns
C+ vs 1,25	32,68	No	ns
C+ vs 1,63	-29,02	No	ns
C- vs Blanco	-2,495	No	ns
C- vs 0,82	-108,4	Yes	***
C- vs 1,25	-52,11	No	ns
C- vs 1,63	-113,8	Yes	***
Blanco vs 0,82	-105,9	Yes	***
Blanco vs 1,25	-49,61	No	ns
Blanco vs 1,63	-111,3	Yes	***
0,82 vs 1,25	56,32	No	ns
0,82 vs 1,63	-5,378	No	ns
1,25 vs 1,63	-61,70	No	ns

Table Analyzed	P1 Primera Etapa Categ II		
Kruskal-Wallis test			
P value	0,0412		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	*		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	11,57		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
C+ vs C-	9,636	No	ns
C+ vs Blanco	20,46	No	ns
C+ vs 0,82	-18,96	No	ns
C+ vs 1,25	-17,14	No	ns
C+ vs 1,63	8,607	No	ns
C- vs Blanco	10,83	No	ns
C- vs 0,82	-28,60	No	ns
C- vs 1,25	-26,77	No	ns
C- vs 1,63	-1,029	No	ns
Blanco vs 0,82	-39,43	No	ns
Blanco vs 1,25	-37,60	No	ns
Blanco vs 1,63	-11,86	No	ns
0,82 vs 1,25	1,825	No	ns
0,82 vs 1,63	27,57	No	ns
1,25 vs 1,63	25,74	No	ns



Table Analyzed	P1 Primera Etapa Categ III		
Kruskal-Wallis test			
P value	0,0003		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	23,02		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
C+ vs C-	-38,37	No	ns
C+ vs Blanco	-56,04	No	ns
C+ vs 0,82	-58,03	Yes	**
C+ vs 1,25	-68,87	Yes	***
C+ vs 1,63	-24,20	No	ns
C- vs Blanco	-17,67	No	ns
C- vs 0,82	-19,66	No	ns
C- vs 1,25	-30,50	No	ns
C- vs 1,63	14,18	No	ns
Blanco vs 0,82	-1,990	No	ns
Blanco vs 1,25	-12,83	No	ns
Blanco vs 1,63	31,84	No	ns
0,82 vs 1,25	-10,84	No	ns
0,82 vs 1,63	33,83	No	ns
1,25 vs 1,63	44,68	No	ns

Table Analyzed	P1 Primera Etapa Categ IV		
Kruskal-Wallis test			
P value	P<0.0001		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	28,21		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
C+ vs C-	24,42	No	ns
C+ vs Blanco	42,42	No	ns
C+ vs 0,82	46,98	Yes	***
C+ vs 1,25	25,17	Yes	*
C+ vs 1,63	32,92	No	ns
C- vs Blanco	18,00	No	ns
C- vs 0,82	22,57	No	ns
C- vs 1,25	0,7500	No	ns
C- vs 1,63	8,500	No	ns
Blanco vs 0,82	4,568	No	ns
Blanco vs 1,25	-17,25	No	ns
Blanco vs 1,63	-9,500	No	ns
0,82 vs 1,25	-21,82	Yes	*
0,82 vs 1,63	-14,07	No	ns
1,25 vs 1,63	7,750	No	ns



Table Analyzed	P1 Segunda Etapa Catg I		
Kruskal-Wallis test			
P value	P<0.0001		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	67,11		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
C+ vs C-	107,8	Yes	***
C+ vs Blanco	104,6	Yes	***
C+ vs 0,82	40,93	No	ns
C+ vs 1,25	24,34	No	ns
C+ vs 1,63	-6,513	No	ns
C- vs Blanco	-3,252	No	ns
C- vs 0,82	-66,87	Yes	***
C- vs 1,25	-83,46	Yes	**
C- vs 1,63	-114,3	Yes	***
Blanco vs 0,82	-63,62	Yes	**
Blanco vs 1,25	-80,21	Yes	**
Blanco vs 1,63	-111,1	Yes	***
0,82 vs 1,25	-16,59	No	ns
0,82 vs 1,63	-47,44	No	ns
1,25 vs 1,63	-30,86	No	ns

Table Analyzed	P1 Segunda Etapa Catg II		
Kruskal-Wallis test			
P value	0,8918		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	ns		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	1,677		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
C+ vs C-	10,99	No	ns
C+ vs Blanco	23,66	No	ns
C+ vs 0,82	9,543	No	ns
C+ vs 1,25	2,771	No	ns
C+ vs 1,63	1,122	No	ns
C- vs Blanco	12,67	No	ns
C- vs 0,82	-1,443	No	ns
C- vs 1,25	-8,215	No	ns
C- vs 1,63	-9,864	No	ns
Blanco vs 0,82	-14,12	No	ns
Blanco vs 1,25	-20,89	No	ns
Blanco vs 1,63	-22,54	No	ns
0,82 vs 1,25	-6,772	No	ns
0,82 vs 1,63	-8,421	No	ns
1,25 vs 1,63	-1,649	No	ns



Table Analyzed	P1 Sesunda Etapa Categ III		
Kruskal-Wallis test			
P value	0,0105		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	*		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	14,97		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
C+ vs C-	-26,19	No	ns
C+ vs Blanco	-39,96	No	ns
C+ vs 0,82	-50,02	Yes	**
C+ vs 1,25	-21,16	No	ns
C+ vs 1,63	-28,57	No	ns
C- vs Blanco	-13,77	No	ns
C- vs 0,82	-23,83	No	ns
C- vs 1,25	5,028	No	ns
C- vs 1,63	-2,383	No	ns
Blanco vs 0,82	-10,06	No	ns
Blanco vs 1,25	18,79	No	ns
Blanco vs 1,63	11,38	No	ns
0,82 vs 1,25	28,86	No	ns
0,82 vs 1,63	21,45	No	ns
1,25 vs 1,63	-7,411	No	ns

Table Analyzed	P1 Segunda Etapa Categ IV		
Kruskal-Wallis test			
P value	0,0072		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	**		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	4		
Kruskal-Wallis statistic	12,04		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
C+ vs C-	12,50	No	ns
C+ vs Blanco	19,25	No	ns
C+ vs 0,82	11,68	Yes	*
C- vs Blanco	6,750	No	ns
C- vs 0,82	-0,8250	No	ns
Blanco vs 0,82	-7,575	No	ns



Table Analyzed	P2Primera Etapa Catg I		
Kruskal-Wallis test			
P value	P<0.0001		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	84,71		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
C+ vs C-	103,3	Yes	***
C+ vs Blanco	100,3	Yes	***
C+ vs 0,82	67,36	Yes	*
C+ vs 1,25	-2,950	No	ns
C+ vs 1,63	-21,28	No	ns
C- vs Blanco	-2,971	No	ns
C- vs 0,82	-35,89	No	ns
C- vs 1,25	-106,2	Yes	***
C- vs 1,63	-124,5	Yes	***
Blanco vs 0,82	-32,92	No	ns
Blanco vs 1,25	-103,2	Yes	***
Blanco vs 1,63	-121,6	Yes	***
0,82 vs 1,25	-70,31	Yes	**
0,82 vs 1,63	-88,64	Yes	*
1,25 vs 1,63	-18,33	No	ns

Table Analyzed	P2 Primera Etapa Catg II		
Kruskal-Wallis test			
P value	0,7512		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	ns		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	2,667		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
C+ vs C-	10,41	No	ns
C+ vs Blanco	22,11	No	ns
C+ vs 0,82	4,364	No	ns
C+ vs 1,25	-0,1994	No	ns
C+ vs 1,63	11,69	No	ns
C- vs Blanco	11,70	No	ns
C- vs 0,82	-6,042	No	ns
C- vs 1,25	-10,60	No	ns
C- vs 1,63	1,283	No	ns
Blanco vs 0,82	-17,74	No	ns
Blanco vs 1,25	-22,30	No	ns
Blanco vs 1,63	-10,42	No	ns
0,82 vs 1,25	-4,563	No	ns
0,82 vs 1,63	7,324	No	ns
1,25 vs 1,63	11,89	No	ns



Table Analyzed	P2 Primera Etapa Catg III		
Kruskal-Wallis test			
P value	P<0.0001		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	41,06		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
C+ vs C-	-27,84	No	ns
C+ vs Blanco	-40,60	No	ns
C+ vs 0,82	-47,17	Yes	**
C+ vs 1,25	7,810	No	ns
C+ vs 1,63	-66,73	Yes	***
C- vs Blanco	-12,76	No	ns
C- vs 0,82	-19,33	No	ns
C- vs 1,25	35,65	No	ns
C- vs 1,63	-38,89	No	ns
Blanco vs 0,82	-6,575	No	ns
Blanco vs 1,25	48,41	No	ns
Blanco vs 1,63	-26,13	No	ns
0,82 vs 1,25	54,98	Yes	**
0,82 vs 1,63	-19,56	No	ns
1,25 vs 1,63	-74,54	Yes	***

Table Analyzed	P2 Primera Etapa Catg IV		
Kruskal-Wallis test			
P value	0,0004		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	22,70		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
C+ vs C-	39,00	No	ns
C+ vs Blanco	64,25	No	ns
C+ vs 0,82	28,07	No	ns
C+ vs 1,25	31,67	No	ns
C+ vs 1,63	44,33	Yes	***
C- vs Blanco	25,25	No	ns
C- vs 0,82	-10,93	No	ns
C- vs 1,25	-7,333	No	ns
C- vs 1,63	5,330	No	ns
Blanco vs 0,82	-36,18	No	ns
Blanco vs 1,25	-32,58	No	ns
Blanco vs 1,63	-19,92	No	ns
0,82 vs 1,25	3,595	No	ns
0,82 vs 1,63	16,26	No	ns
1,25 vs 1,63	12,66	No	ns



Table Analyzed	P2 Segunda Etapa Catg I		
Kruskal-Wallis test			
P value	P<0.0001		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	85,09		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
C+ vs C-	113,4	Yes	***
C+ vs Blanco	109,9	Yes	***
C+ vs 0,82	-12,30	No	ns
C+ vs 1,25	-8,175	No	ns
C+ vs 1,63	52,78	No	ns
C- vs Blanco	-3,488	No	ns
C- vs 0,82	-125,7	Yes	***
C- vs 1,25	-121,6	Yes	***
C- vs 1,63	-60,62	Yes	**
Blanco vs 0,82	-122,2	Yes	***
Blanco vs 1,25	-118,1	Yes	***
Blanco vs 1,63	-57,13	Yes	**
0,82 vs 1,25	4,124	No	ns
0,82 vs 1,63	65,07	Yes	*
1,25 vs 1,63	60,95	No	ns

Table Analyzed	P2 Segunda Etapa Catg II		
Kruskal-Wallis test			
P value	0,3070		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	ns		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	5,992		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
C+ vs C-	9,797	No	ns
C+ vs Blanco	21,40	No	ns
C+ vs 0,82	8,563	No	ns
C+ vs 1,25	-9,565	No	ns
C+ vs 1,63	6,752	No	ns
C- vs Blanco	11,60	No	ns
C- vs 0,82	-1,234	No	ns
C- vs 1,25	-19,36	No	ns
C- vs 1,63	-3,045	No	ns
Blanco vs 0,82	-12,83	No	ns
Blanco vs 1,25	-30,96	No	ns
Blanco vs 1,63	-14,65	No	ns
0,82 vs 1,25	-18,13	No	ns
0,82 vs 1,63	-1,811	No	ns
1,25 vs 1,63	16,32	No	ns



Table Analyzed	P2 Segunda Etapa Catg III		
Kruskal-Wallis test			
P value	P<0.0001		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	43,81		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
C+ vs C-	-29,19	No	ns
C+ vs Blanco	-41,97	No	ns
C+ vs 0,82	-88,99	Yes	***
C+ vs 1,25	-56,67	Yes	***
C+ vs 1,63	-53,18	Yes	**
C- vs Blanco	-12,79	No	ns
C- vs 0,82	-59,80	Yes	*
C- vs 1,25	-27,48	No	ns
C- vs 1,63	-23,99	No	ns
Blanco vs 0,82	-47,02	No	ns
Blanco vs 1,25	-14,70	No	ns
Blanco vs 1,63	-11,21	No	ns
0,82 vs 1,25	32,32	No	ns
0,82 vs 1,63	35,81	No	ns
1,25 vs 1,63	3,491	No	ns

Table Analyzed	P2 Segunda Etapa Catg IV		
Kruskal-Wallis test			
P value	P<0.0001		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	34,45		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
C+ vs C-	28,21	No	ns
C+ vs Blanco	45,71	No	ns
C+ vs 0,82	43,76	Yes	***
C+ vs 1,25	15,54	No	ns
C+ vs 1,63	37,21	Yes	**
C- vs Blanco	17,50	No	ns
C- vs 0,82	15,55	No	ns
C- vs 1,25	-12,67	No	ns
C- vs 1,63	9,000	No	ns
Blanco vs 0,82	-1,946	No	ns
Blanco vs 1,25	-30,17	No	ns
Blanco vs 1,63	-8,500	No	ns
0,82 vs 1,25	-28,22	Yes	***
0,82 vs 1,63	-6,554	No	ns
1,25 vs 1,63	21,67	No	ns



Table Analyzed	P3 Primera Etapa Catg I		
Kruskal-Wallis test			
P value	P<0.0001		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	67,03		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
C+ vs C-	101,5	Yes	***
C+ vs Blanco	98,55	Yes	***
C+ vs 0.82	69,16	Yes	**
C+ vs 1.25	0,04831	No	ns
C+ vs 1.63	-9,579	No	ns
C- vs Blanco	-2,960	No	ns
C- vs 0.82	-32,36	No	ns
C- vs 1.25	-101,5	No	ns
C- vs 1.63	-111,1	Yes	***
Blanco vs 0.82	-29,40	No	ns
Blanco vs 1.25	-98,51	No	ns
Blanco vs 1.63	-108,1	Yes	***
0.82 vs 1.25	-69,11	No	ns
0.82 vs 1.63	-78,74	Yes	**
1.25 vs 1.63	-9,628	No	ns

Table Analyzed	P3 Primera Etapa Catg II		
Kruskal-Wallis test			
P value	0,5262		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	ns		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	4,163		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
C+ vs C-	10,60	No	ns
C+ vs Blanco	23,25	No	ns
C+ vs 0.82	-1,506	No	ns
C+ vs 1.25	-10,08	No	ns
C+ vs 1.63	4,936	No	ns
C- vs Blanco	12,64	No	ns
C- vs 0.82	-12,11	No	ns
C- vs 1.25	-20,68	No	ns
C- vs 1.63	-5,668	No	ns
Blanco vs 0.82	-24,75	No	ns
Blanco vs 1.25	-33,33	No	ns
Blanco vs 1.63	-18,31	No	ns
0.82 vs 1.25	-8,575	No	ns
0.82 vs 1.63	6,442	No	ns
1.25 vs 1.63	15,02	No	ns



Table Analyzed	P3 Primera Etapa Catg III		
Kruskal-Wallis test			
P value	0,0019		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	**		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	19,08		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
C+ vs C-	-33,09	No	ns
C+ vs Blanco	-47,72	No	ns
C+ vs 0.82	-59,13	Yes	**
C+ vs 1.25	-52,89	Yes	**
C+ vs 1.63	-43,96	No	ns
C- vs Blanco	-14,64	No	ns
C- vs 0.82	-26,05	No	ns
C- vs 1.25	-19,80	No	ns
C- vs 1.63	-10,88	No	ns
Blanco vs 0.82	-11,41	No	ns
Blanco vs 1.25	-5,168	No	ns
Blanco vs 1.63	3,761	No	ns
0.82 vs 1.25	6,243	No	ns
0.82 vs 1.63	15,17	No	ns
1.25 vs 1.63	8,929	No	ns

Table Analyzed	P3 Primera Etapa Catg IV		
Kruskal-Wallis test			
P value	0,0017		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	**		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	19,24		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
C+ vs C-	14,00	No	ns
C+ vs Blanco	24,00	No	ns
C+ vs 0.82	24,00	No	ns
C+ vs 1.25	22,65	Yes	**
C+ vs 1.63	18,76	Yes	**
C- vs Blanco	10,00	No	ns
C- vs 0.82	10,00	No	ns
C- vs 1.25	8,654	No	ns
C- vs 1.63	4,763	No	ns
Blanco vs 0.82	0,0000	No	ns
Blanco vs 1.25	-1,346	No	ns
Blanco vs 1.63	-5,237	No	ns
0.82 vs 1.25	-1,346	No	ns
0.82 vs 1.63	-5,237	No	ns
1.25 vs 1.63	-3,891	No	ns



Table Analyzed	P3 Segunda Etapa Catg I		
Kruskal-Wallis test			
P value	P<0.0001		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	98,16		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
C+ vs C-	88,57	Yes	***
C+ vs Blanco	86,05	Yes	***
C+ vs 0,82	6,633	No	ns
C+ vs 1.25	-24,05	No	ns
C+ vs 1.63	-28,89	No	ns
C- vs Blanco	-2,518	No	ns
C- vs 0,82	-81,93	Yes	**
C- vs 1.25	-112,6	Yes	***
C- vs 1.63	-117,5	Yes	***
Blanco vs 0,82	-79,42	Yes	*
Blanco vs 1.25	-110,1	Yes	***
Blanco vs 1.63	-114,9	Yes	***
0,82 vs 1.25	-30,69	No	ns
0,82 vs 1.63	-35,52	No	ns
1.25 vs 1.63	-4,833	No	ns

Table Analyzed	P3 Segunda Etapa Catg II		
Kruskal-Wallis test			
P value	P<0.0001		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	27,55		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
C+ vs C-	14,15	No	ns
C+ vs Blanco	31,46	No	ns
C+ vs 0,82	-40,22	No	ns
C+ vs 1.25	22,73	No	ns
C+ vs 1.63	-10,30	No	ns
C- vs Blanco	17,31	No	ns
C- vs 0,82	-54,38	Yes	*
C- vs 1.25	8,579	No	ns
C- vs 1.63	-24,45	No	ns
Blanco vs 0,82	-71,68	No	ns
Blanco vs 1.25	-8,726	No	ns
Blanco vs 1.63	-41,75	No	ns
0,82 vs 1.25	62,95	Yes	***
0,82 vs 1.63	29,93	No	ns
1.25 vs 1.63	-33,03	No	ns



Table Analyzed	P3 Segunda Etapa Catg III		
Kruskal-Wallis test			
P value	0,0016		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	**		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	19,49		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
C+ vs C-	-31,27	No	ns
C+ vs Blanco	-48,01	No	ns
C+ vs 0,82	3,817	No	ns
C+ vs 1.25	-40,53	No	ns
C+ vs 1.63	9,708	No	ns
C- vs Blanco	-16,73	No	ns
C- vs 0,82	35,09	No	ns
C- vs 1.25	-9,258	No	ns
C- vs 1.63	40,98	No	ns
Blanco vs 0,82	51,82	No	ns
Blanco vs 1.25	7,475	No	ns
Blanco vs 1.63	57,71	No	ns
0,82 vs 1.25	-44,35	Yes	*
0,82 vs 1.63	5,891	No	ns
1.25 vs 1.63	50,24	Yes	*

Table Analyzed	P3 Segunda Etapa Catg IV		
Kruskal-Wallis test			
P value	0,0018		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	**		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	6		
Kruskal-Wallis statistic	19,20		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
C+ vs C-	12,67	No	ns
C+ vs Blanco	18,67	No	ns
C+ vs 0,82	15,03	Yes	*
C+ vs 1.25	7,000	No	ns
C+ vs 1.63	19,82	Yes	**
C- vs Blanco	6,000	No	ns
C- vs 0,82	2,361	No	ns
C- vs 1.25	-5,667	No	ns
C- vs 1.63	7,150	No	ns
Blanco vs 0,82	-3,639	No	ns
Blanco vs 1.25	-11,67	No	ns
Blanco vs 1.63	1,150	No	ns
0,82 vs 1.25	-8,028	No	ns
0,82 vs 1.63	4,789	No	ns
1.25 vs 1.63	12,82	No	ns