

# IDENTIFICACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAPS) EN EL AIRE DE CÚCUTA-COLOMBIA: EFECTO GEN TÓXICO

ALFONSO QUIJANO PARRA<sup>1</sup>

 IVÁN MELÉNDEZ GÉLVEZ<sup>2</sup>

## RESUMEN

En los últimos tiempos ha tomado un gran auge en los países del tercer mundo, incluidos los de América Latina, el estudio de la exposición humana a las emisiones de combustión, incluyendo las partículas ultrafinas ( $PM_{2,5}$ ) y componentes mutagénicos y carcinógenos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). En este trabajo se identificó en la ciudad de Cúcuta un grupo de HAPs reconocidos por su afectación a la salud de la población; los HAPs encontrados fueron: metilcriseno, benzo[a]antraceno, benzo[j]fluoranteno, benzo[b] fluoranteno, benzo[a] pireno, dibenzo [a,l] pireno, dibenzo[a,e] pireno, benzo[c] fluoreno, benzo[k] fluoranteno, Indeno[1,2,3-cd] pireno, dibenzo[a,h]antraceno y benzo[g,h,i]perileno. Adicionalmente también se evaluó *in vitro* usando el ensayo cometa, el efecto genotóxico del material particulado  $PM_{2,5}$  extraído con acetona y diclorometano.

**PALABRAS CLAVE:**  $PM_{2,5}$ ; hidrocarburos aromáticos policíclicos; benzo(a)pireno; cromatografía de gases; ensayo cometa.

## IDENTIFICATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (PAHS) AIR-CUCUTA NORTE DE SANTANDER: GENOTOXIC EVALUATION.

## ABSTRACT

The study of human exposure to combustion emissions, including ultrafine particulate matter ( $PM_{2,5}$ ) has increased recently in the third world countries, including those in Latin America. This paper identifies a group of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the city of Cúcuta, Colombia. Those PAHs are recognized by their effects on human health. PAHs found were: Methylchrysene, Benzo [a] anthracene, Benzo [j] fluoranthene, Benzo [b] fluoranthene, Benzo [a] pyrene, dibenzo [a, l] pyrene, dibenzo [a, e] pyrene, Benzo [c] fluorene, benzo [k] fluoranthene, indeno [1,2,3 -cd] pyrene, dibenzo [a, h] anthracene and benzo [g, hi] perylene. The genotoxic effect of the particulate matter extracted with acetone and dichlorometane, was also evaluated *in vitro* using the comet assay.

**KEYWORDS:**  $PM_{2,5}$ ; PAHs; Benzo (a) pyrene; Gas Chromatography; Comet Assay.

- 1 PhD. Química (Cinética y Catálisis), Universidad Estatal de Moscú M V Lomonosov. Director Grupo de Investigación en Química Universidad de Pamplona (Norte de Santander).
- 2 Biólogo Universidad de Antioquia. MsC en Ciencias Básicas Biomédicas, Universidad de Antioquia. Director del grupo de investigación en Biología Molecular-Biomogen. Universidad de Pamplona. Profesor Asistente, Universidad de Pamplona, Norte de Santander, Colombia.



Autor de correspondencia Quijano-Parra, A. (Alfonso):  
Universidad de Pamplona, Avenida Santander N. 14-240  
casa 15, La Campiña, Pamplona (Norte de Santander)  
Tel: (097) 568 5303 Ext: 215  
Correo electrónico: alfonsoquijanoparra@gmail.com

Historia del artículo:

Artículo recibido: 14-IV-2013 / Aprobado: 17-II-2014

Disponible online: 12 de mayo 2014

Discusión abierta hasta mayo de 2015



## IDENTIFICAÇÃO DE HIDROCARBONETO DE POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HAPS) NO AR DE CÚCUTA- COLÔMBIA: EFEITO GEN TÓXICO

### RESUMO

Nos últimos tempos, o estudo de exposição humana às emissões de combustão, incluindo as partículas ultrafinas ( $PM_{2,5}$ ) e componente mutagênicos e carcinógeno como os compostos aromáticos policíclicos (HAPs) tiveram nos países do terceiro mundo um crescimento incluindo na América Latina. Neste trabalho identificou-se na cidade de Cúcuta, um grupo de hidrocarboneto de policíclicos aromáticos (HAPs), reconhecidos pela sua afetação à saúde da população; os HAPs encontrados foram: Metilcriseno, Benzo[a]antraceno, Benzo[j]fluoranteno, Benzo[b] fluoranteno, Benzo[a] Pireno, Dibenzo [a,l] pireno, Dibenzo[a,e] pireno, Benzo[c] fluoreno, Benzo[k] fluoranteno, Indeno[1,2,3-cd] pireno, Dibenzo[a,h]antraceno y Benzo[g,h,i]perileno. Mais também avaliou-se in vitro usando o teste cometa, o efeito genotóxico do material particulado  $PM_{2,5}$  extraído com Acetona e Diclorometano.

**PALAVRAS-CHAVE:**  $PM_{2,5}$ ; Hidrocarboneto de Policíclicos Aromáticos; Benzo(a)pireno; Cromatografia de gases; Teste cometa.

### 1. INTRODUCCIÓN

Los contaminantes atmosféricos son sustancias que pueden afectar a los humanos, los animales, la vegetación y los materiales. Los tóxicos del aire son contaminantes que son conocidos o sospechosos de causar efectos adversos a la salud, incluyendo el cáncer, efectos inmunológicos, de desarrollo y neurológicos (USEPA, 2004). Varios de los contaminantes del aire difieren en sus características fisicoquímicas, pueden estar agrupados en cuatro categorías: contaminantes gaseosos (ozono,  $SO_2$ ,  $NO_x$ , CO, compuestos orgánicos volátiles), contaminantes orgánicos persistentes, metales pesados y material particulado ( $PM_{10}$  y  $PM_{2,5}$ ) (fino y ultrafino). Estos contaminantes pueden afectar el sistema respiratorio y causar efectos pulmonares y sistémicos que incluyen inflamación, reconstrucción de tejidos y carcinogénesis (Dagouassat, Lanone y Boczowski, 2012).

Las partículas de la fracción respirable ( $PM_{10}$  y  $PM_{2,5}$ ) tienen la capacidad de penetrar y depositarse en las regiones traqueo-bronquial y alveolar del tracto respiratorio (Vinitketkumnuen, *et al.*, 2002). En cuanto a los efectos sobre la salud humana, la fracción respirable del material particulado (PM) es la de mayor preocupación, ya que a largo plazo la exposición al PM se ha asociado con una mayor incidencia de enfermedades pulmonares, cardiovasculares y cáncer (Pope, *et al.*, 2002; Brunekreef y Holgate, 2002).

Las partículas respirables son una mezcla de contaminantes del aire que contienen varios metales como Pb, Cd, Cr, y muchos de estos compuestos son tóxicos (Shah, *et al.*, 2006). En las áreas urbanas los metales pesados provienen de las actividades industriales y las emisiones vehiculares (Wu, *et al.*, 2007; Zheng, *et al.*, 2010).

El  $PM_{2,5}$  contiene hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) mutagénicos y carcinogénicos que pueden causar daño oxidativo del ADN los cuales conducen a efectos cardiovasculares y reproductivos (Lewtas, 2007). El incremento en la morbi-mortalidad, especialmente de enfermedades cardiovasculares y de pulmón, están asociadas con el aumento de las partículas finas ambientales y el daño de estas se produce a través del estrés oxidativo (Zhang y Cui, 2001). El estrés oxidativo es asociado con niveles anormales de especies reactivas de oxígeno (ROS), que se considera están relacionados con procesos carcinogénicos (Milaeva, 2011). El daño oxidativo del ADN es muy importante en carcinogénesis. El 8-Oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxo-Gua) es una lesión mutagénica abundante escindida por la oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1); las excreciones de 8-OxoGua han sido asociadas con la exposición a la contaminación del aire (Loft, *et al.*, 2012). La exposición ambiental al PM ha sido asociada con incrementos en el riesgo de cáncer pulmonar a través de alteraciones en los procesos de la metilación. (Hou, *et al.*, 2011). La mutagenicidad y carcinogenicidad del aire urbano han sido asociadas con las emisiones de

combustión (Claxton y Woodall, 2007). Los productos de la combustión incompleta contienen productos químicos gaseosos cancerígenos, tales como benceno, aldehídos, alquenos (por ejemplo, 1,3-butadieno) y HAPs como el pireno (Claeys, *et al.*, 2004).

Estudios de distribución de las fuentes de la masa de partículas ultrafinas ( $PM_{2,5}$ ) comprueban que los vehículos diésel y la gasolina son una de las principales fuentes de emisión de PM (Maykut, *et al.*, 2003; Watson y Chow, 2001; Schauer, *et al.*, 1996; U.S. EPA, 2004). Investigaciones de caracterización del diésel demuestran que sus partículas contienen cantidades relativamente grandes de compuestos orgánicos mutagénicos (Lewtas, *et al.*, 1979). La 3-nitrobenzanthrone (3-NBA) se aisló del diésel y de partículas de aire y ha demostrado ser un potente mutágeno de acción directa (Enya, *et al.*, 1997) que también se puede formar en las reacciones atmosféricas (Arlt, 2005). En los humanos, la inhalación es la ruta más frecuente de acceso de los HAPs al organismo, es por esto que el tracto respiratorio y los pulmones están generalmente involucrados en los procesos de translocación del agente nocivo por la sangre y los tejidos (Hałatek, *et al.*, 2005).

Un estudio epidemiológico de cáncer sobre la exposición ocupacional a las emisiones de escape del diésel proporciona la mayor evidencia de la carcinogenicidad en los seres humanos (U.S. EPA, 2002). Los tipos de cáncer más comunes asociados con la exposición a gases de escape del diésel son: el pulmón, la vejiga y el tejido linfático (Bhatia, Lopipero y Smith, 1998; Lipsett y Campleman, 1999). Para la EPA la combustión del diésel constituye una fuente principal de cancerígenos para los seres humanos, los cuales llegan al organismo por inhalación (U.S. EPA, 2002). Se han realizado estudios para evaluar la población expuesta a HAPs utilizando los datos de monitoreo ambiental (Touma, Cox y Tikvart, 2006; McCarthy, *et al.*, 2009).

Además, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), identificó los HAPs más frecuentes y los clasificó como «los 16 HAPs prioritarios» (State of California EPA.(2008): naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, antraceno, fenantreno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(a)pireno, benzo(k)fluoranteno, benzo(b)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno, dibenzo(a,h)antraceno, indeno(1,2,3-c,d)pireno. Un subgrupo de

HAPs ha sido identificado por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) como carcinogénicos para los animales, y también son estudiados por la U.S. EPA como cancerígenos potenciales para los humanos. Estos compuestos deben ser monitoreados como rutina en los estudios ambientales de tóxicos orgánicos en el aire y son: benzo(a)antraceno (2B), criseno (2A), benzo(a)pireno (1), benzo(b)fluoranteno (2B), benzo(j)fluoranteno (2B), benzo(k)fluoranteno (2B), dibenzo(a,h)antraceno(2A), indeno(1,2,3-c,d)pireno(2B).

En el aire de la región nororiental de Colombia y la zona fronteriza con Venezuela (Cúcuta) no existe información sobre los niveles de genotoxicidad y se desconocen los HAPs presentes en el aire. En la presente investigación, las partículas ultrafinas ( $PM_{2,5}$ ) y los compuestos orgánicos volátiles se recogieron durante el periodo comprendido entre julio- diciembre de 2011 con un equipo de bajo volumen, cerca de una vía muy transitada en Cúcuta por vehículos que funcionan con diésel y gasolina. Los HAPs presentes en el  $PM_{2,5}$  de Cúcuta fueron extraídos con dos solventes de manera independiente (acetona y diclorometano) y se analizaron por cromatografía de gases con detector FID; la actividad genotóxica asociada con el aire de Cúcuta-Colombia, se evaluó *in vitro* utilizando el ensayo cometa.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. Muestreo

EL monitoreo del  $PM_{2,5}$  se realizó con un Partisol 2025 plus de la Ruprecht y Pataschnick, con un flujo de 16,6 L/min, siguiendo los lineamientos de la OMS y la EPA.

### 2.2. Sitio de muestreo

Se realizó el monitoreo de la fracción respirable  $PM_{2,5}$  en Cúcuta-Norte de Santander ubicada en la cordillera Oriental de Colombia con coordenadas geográficas 72° 25 de longitud Oeste y 7° 20 de latitud Norte, a una altitud de 300 msnm y una presión atmosférica de 650 mm de Hg; El equipo se instaló en la azotea del edificio de la Universidad de Pamplona ubicada en la diagonal Santander. Las muestras ambientales fueron obtenidas en muestreos de 24

horas para un total de 24 m<sup>3</sup> de volumen de aire muestreado cada tres días, se realizaron durante el período comprendido entre julio-diciembre del 2011.

Este sitio de muestreo del PM<sub>2,5</sub> tiene sus características particulares, ya que está ubicado en un sector mixto (residencial-comercial) y en una vía que presenta un alto flujo vehicular, que utiliza como combustible el diésel y la gasolina.

### 2.3. Medio de recolección

Se utilizaron filtros de Teflón® de 47 mm de diámetro, con un tamaño de poro de 2 micras. Los cuales se sometieron a una temperatura de 200 °C durante 24 horas, después de enfriarse se colocaron en un desecador y completamente fríos se pesaron y luego se adecuaron en el portafiltros del partisol. Después del monitoreo, los filtros que se encuentran en el portafiltros de los filtros usados, se almacenan en el laboratorio -20 °C hasta que se llevaron a cabo las extracciones.

### 2.4. Extracción de la materia orgánica de los filtros de PM<sub>2,5</sub>. Extracción por ultrasonido

Los HAPs presentes en la fracción orgánica de los filtros de PM<sub>2,5</sub> se extrae por ultrasonido, en un baño ultrasónico (Branson 1510, modelo 1510R-MT). Como solventes de extracción se utilizan por separado el diclorometano (200 ml) y la acetona (200 ml). Los filtros de PM<sub>2,5</sub> inicialmente se colocan en un vaso de precipitado con 20 ml del solvente para un periodo de extracción de 15 minutos a una temperatura de 23 °C-24 °C. Se recoge el extracto y se agregan de nuevo 20 ml del solvente y se realiza la extracción durante quince minutos; se recoge el extracto y se repite la operación hasta completar los 200 ml del solvente.

### 2.5. Concentración de la materia orgánica

Una vez obtenido el extracto global (200 ml), se lo concentra en un evaporador rotatorio de vacío, marca Heidolph® modelo Laborota 400-1, a la temperatura de ebullición del solvente a 150 rpm; hasta aproximadamente 10 ml. Posteriormente el extracto se transfirió a dos via-

les cada uno de 5ml. El extracto global se utiliza para la determinación de los HAPs por cromatografía de gases (FID) y el otro para el ensayo cometa. El vial destinado para el ensayo cometa, se llevó a la sequedad y se disolvió en DMSO.

Las muestras de HAPs se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, con el fin de eliminar el agua residual y preparar la muestra para el análisis cromatográfico. Se guardaron en frasco ámbar, manteniéndolas refrigeradas a 4 °C.

### 2.6. Identificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)

Para identificar los HAPs presentes en el PM<sub>2,5</sub> del aire de Cúcuta extraídos con diclorometano y acetona se utilizó un equipo de cromatografía de gases marca Agilent Technologies® 6890A Plus Series II Hewlet-Packard® Plus con detector FID (*Flame Ionization Detector*). La columna utilizada es Agilent DB-EUPAH® 20m de longitud, 0,18 mm de diámetro, 0,25µm de diámetro interno (5 % *phenylmethylpolysiloxane*). Para la identificación de los HAPs se utilizó el patrón de 16 hidrocarburos de Restek (catálogo # 31841 EPA Method 8310 PAH Mixture). La identificación cualitativa de los HAPs presentes en el extracto global se realizó de acuerdo a las siguientes condiciones: detector FID a 320 °C Mezcla (mL/min): Aire 400 – H<sub>2</sub> 30 – N<sub>2</sub> 45. Se inyectó 1 µl, modo *splitless* a 320 °C. Temperatura inicial 45 °C por 0,8 min y se incrementa de la siguiente manera: 45 °C/min hasta 200 °C, 2,50 °C/min hasta 225 °C, 3 °C/min hasta 266 °C, 5 °C/min hasta 300 °C, 10 °C/min hasta 320 °C durante 4,50min. Tiempo de análisis por muestra 41,21 min. Gas de arrastre Helio, flujo 20 mL/min. Temperatura del inyector 250 °C.

**Detección del daño del DNA. Ensayo Cometa.** Es una técnica altamente sensible para evaluar el daño y la reparación del DNA en cualquier tipo de célula eucariota. Este, en su versión alcalina, permite detectar roturas de simple cadena y sitios sensibles al álcali que se originan durante la reparación dando lugar a la formación de la cola del cometa (Ayala Mayte, 2004). En general, el principio básico del ensayo es la migración del ADN en una matriz de agarosa bajo condiciones de electroforesis. Luego, al ser observada la célula en el microscopio, presenta la apariencia de un cometa, con una cabeza (región nuclear) y cola

(formada por fragmentos nucleares que han migrado en dirección del ánodo) por lo que este ensayo es también conocido como Ensayo Cometa, debido al patrón de migración del ADN que se produce en las células dañadas.

**Tratamiento.** Después de separar los linfocitos de la sangre total se tomaron 200  $\mu\text{l}$  y se les se adicionó el tratamiento o control. Las dosis analizadas fueron las siguientes: 50  $\mu\text{g}$ ; 100  $\mu\text{g}$  y 200  $\mu\text{g}$ . Para el control positivo se utilizó  $\text{H}_2\text{O}_2$  25mM y para el control negativo DMSO 12 %. Posteriormente se incubaron durante una hora a 37 °C. Se tomaron 75  $\mu\text{l}$  de agarosa de bajo punto de fusión (LMA) y se mezclaron con 10  $\mu\text{l}$  de células tratadas. Seguidamente, la mezcla anterior se adicionó a la lámina base e inmediatamente se colocó el cubre objeto y se llevó a incubación durante 6 min a 4 °C. Después de cumplidos los 6 min a 4 °C, se retiró el cubre objeto y se adicionan otros 75  $\mu\text{l}$  de LMA, se incubó durante 6 min a 4 °C. Terminado este tiempo se quitó el cubre objeto y se incubó durante una hora a 4°C en solución de lisis. A continuación, se lavaron las placas con PBS y se colocaron en una cámara de electroforesis durante 30 minutos sin conectar a la fuente. Posteriormente, se conectó la cámara durante 30 minutos a 300 miliamperios. Culminado el tiempo se procedió a retirar de la cámara las placas; las cuales se lavaron con solución neutralizante. Se dejaron secar, e inmediatamente, se adicionó 30  $\mu\text{l}$  de bromuro de etidio y se cubrió con un cubre objetos para la lectura de las células. Luego, se observó en el microscopio de fluorescencia Olympus U-RFKT50® con el objetivo de 25X y se midió la migración del ADN de 200 células. Para realizar las mediciones se utilizó el programa CometScore®.

Para determinar el daño genotóxico se establecieron intervalos, dependiendo del daño del control negativo, que para el estudio en mención fue de 41  $\mu\text{m}$ , por lo tanto, células que muestren daño entre 0 y 41  $\mu\text{m}$  se clasifican como células con tipo de daño 0; en la **Tabla 1** se muestran los diferentes intervalos y el tipo de daño.

**Análisis estadístico.** Se determinó homogeneidad de varianzas usando la prueba de Levene. Si el comportamiento de los datos es paramétrico se aplica Análisis de varianza (ANOVA). Si los datos son no paramétricos se utilizan las pruebas de Mann-Whitney y Wilcoxon. Se utilizó la Prueba de Dunnett para determinar el nivel de importancia entre

**Tabla 1.** Intervalos y clase de daño para las células analizadas

Intervalo en $\mu\text{m}$	Tipo de daño	Clase de daño
0 – 41	0	No daño
42 – 83	1	Daño bajo
84 – 125	2	Daño medio
>126	3	Daño alto

el tratamiento y control, así como la Prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Los valores se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar ( $X \pm DS$ ) y las pruebas se consideraron significativas con una  $p \leq 0,05$ .

## 2.7. Identificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) por cromatografía de gases/FID

Para tener una referencia de los posibles HPAs presentes en el aire de la ciudad de Cúcuta, primero se inyectó un patrón que contiene 16 Hidrocarburos aromáticos policíclicos puros.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el  $\text{PM}_{2,5}$  del aire de Cúcuta se han hallado los siguientes metales pesados reportados en el estudio de Gutiérrez, Quijano y Quijano P. (2012) son: Cd, Cr, Pb, Zn y Fe. Estos metales provienen de las fuentes móviles que utilizan el diésel y la gasolina como combustible, lo que corrobora la apreciación de (Fukino, *et al.*, 1982) que atribuye los mutágenos presentes en el aire a las fuentes móviles.

En la **Figura 1** se puede observar el perfil cromatográfico del extracto global de los compuestos orgánicos presentes en el  $\text{PM}_{2,5}$  de la ciudad de Cúcuta utilizando como solvente de extracción diclorometano.

Como se observa en este cromatograma los HAPs encontrados en las muestras del  $\text{PM}_{2,5}$  del aire de Cúcuta extraídos con diclorometano son: 5 metilcriseno, benzo[j]fluoranteno (2B), benzo[a]pireno (1), dibenzo [a,l]pireno y dibenzo[a,e]pireno.

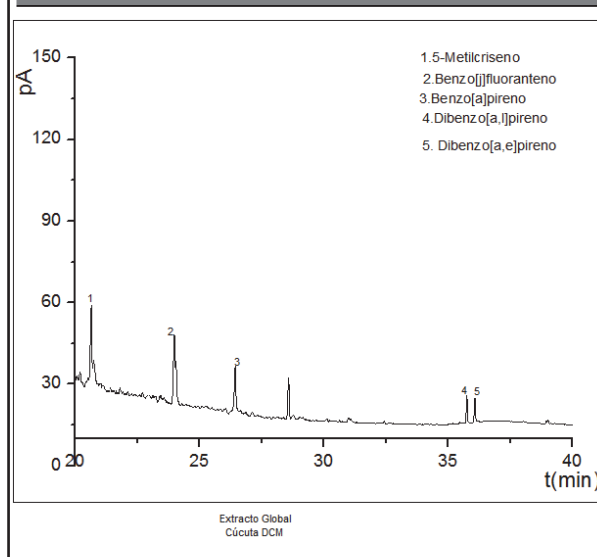
El perfil cromatográfico de los HAPs presentes en el  $PM_{2.5}$  de la ciudad de Cúcuta extraídos con Acetona se muestra en la **Figura 2**.

Como se observa en este cromatograma los HAPs encontrados en las muestras del  $PM_{2.5}$  del aire de Cúcuta extraídos con acetona son: benzo[c]fluoreno, benzo[a]antraceno (2B), benzo[b]fluoranteno (2B), benzo[k]fluoranteno (2B), benzo[a]pireno (1), Indeno[1,2,3-cd] pireno (2B), dibenzo[a,h]antraceno (2A) y benzo[g,h,i]perileno (3).

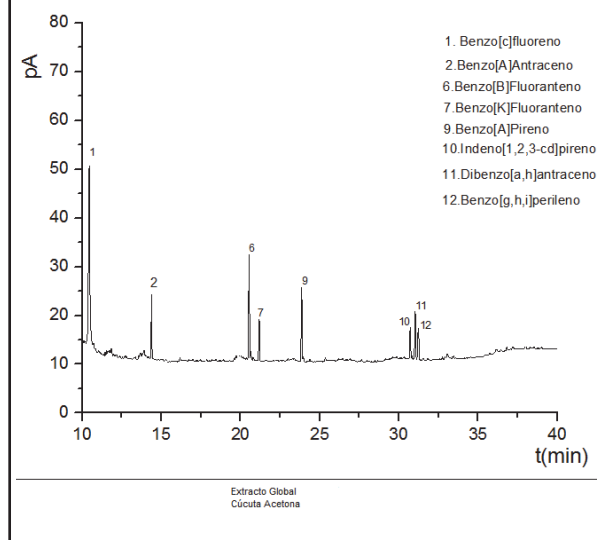
Al comparar el DCM y la acetona como solventes de la extracción de la materia orgánica del  $PM_{2.5}$  (HAPs) se concluye que la acetona es mejor solvente ya que permite la identificación de otros HAPs no extraídos con el DCM.

Mediante el ensayo cometa se analizó el daño inducido por extractos del material particulado  $PM_{2.5}$  de la ciudad de Cúcuta a un total de 200 células por tratamiento en tres experimentos independientes. El indicativo del daño genotóxico en cada célula es la ruptura de su ADN, la cual se manifiesta como un cometa, de tal manera que a mayor daño la longitud de la cola del cometa será mayor. Para mostrar que el daño en el ADN en las células es debido al tratamiento y no a factores que conducen a la muerte celular, se determinó la viabilidad celular después del tratamiento y se encontró que siempre se mantenía por encima del 95 % (**Tabla 2** y **Tabla 3**). Además se establecieron categorías de daño para mostrar que este no se distribuye uniformemente en todas las células, lo cual puede ser una ventaja, debido a que la exposición no necesariamente afecta a todas las células, disminuyendo así el riesgo. Como se observa en las **Tabla 2** y **Tabla 3**, las células que muestran daño espontáneo, no superan una longitud de cola de  $43 \mu m$  y la mayoría de células (80 %) están en el intervalo 0, mostrando que la mayoría de células no tiene daño o muestran algo de daño, pero muy bajo. Solamente un 8 % de las células muestran daño tipo 1 y ninguna de las células muestran daño 2 o 3. De igual manera con la dosis de  $50 \mu g$  de  $PM_{2.5}$  se puede observar que el 37 % de las células tienen daño tipo 0, 53 % daño tipo 1, 10 % daño tipo 2 y 1 % daño tipo 3. De acuerdo con las **Tablas 2** y **3**, a medida que se incrementó la concentración de extracto, el tipo de daño se va incrementando hasta llegar a un daño alto como es el caso de la dosis de

**Figura 1.** Cromatograma de la materia orgánica del  $PM_{2.5}$  del aire de Cúcuta, extraída con diclorometano



**Figura 2.** Hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en el aire de Cúcuta, extraídos con acetona



$150 \mu g$ , en la cual el 65 % de las células muestran daño alto, el 11 % daño medio y el 4 % daño bajo. También se observa en la **Tabla 3** que las dosis que indujeron mayor frecuencia de células con daño en el DNA, también mostraron mayor longitud de migración del ADN (cola). Esto podría indicar que los genotóxicos

**Tabla N.2.** Genotoxicidad (expresado en longitud de cola,  $\mu\text{m}$ ), en linfocitos humanos, expuestos a diferentes dosis material particulado fracción respirable  $\text{PM}_{2.5}$  extraído con diclorometano en la ciudad de Cúcuta

Tratamiento	Promedio de daño $\pm$ DS	Tipo de daño				% de células dañadas	% de Viabilidad
		0	1	2	3		
DMSO 1 %	38 $\pm$ 8	135	15	0	0	11	98
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 25mM	187 $\pm$ 15	5	15	50	80	97	95
50 $\mu\text{g}$	70 $\pm$ 9	88	53	9	0	41	96
100 $\mu\text{g}$	103 $\pm$ 13	15	19	100	16	90	97
150 $\mu\text{g}$	135 $\pm$ 15	7	10	22	109	95	98

Todos los valores provienen de 150 datos, obtenidos de tres experimentos independientes. Los rangos para los tipos de daño, se obtuvieron de la siguiente manera: De 0 a 41  $\mu\text{m}$ , tipo de daño 0 = no daño; de 42 a 83  $\mu\text{m}$ , tipo de daño 1= daño bajo; de 84 a 125  $\mu\text{m}$ , tipo de daño 2 = daño medio y mayor a 126  $\mu\text{m}$ , tipo de daño 3 = daño alto. Además se determinó el porcentaje de células dañadas y la viabilidad celular después de 1h de tratamiento.

**Tabla N.3.** Genotoxicidad (expresado en longitud de cola,  $\mu\text{m}$ ), en linfocitos humanos, expuestos a diferentes de dosis material particulado fracción respirable  $\text{PM}_{2.5}$  extraído con acetona en la ciudad de Cúcuta

Tratamiento	Promedio de daño $\pm$ DS	Tipo de daño				% de células dañadas	% de viabilidad
		0	1	2	3		
DMSO 1 %	38 $\pm$ 8	135	15	0	0	11	98
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 25mM	187 $\pm$ 15	5	15	50	80	97	95
50 $\mu\text{g}$	70 $\pm$ 9	88	53	9	0	41	96
100 $\mu\text{g}$	103 $\pm$ 13	15	19	100	16	90	97
150 $\mu\text{g}$	135 $\pm$ 15	7	10	22	109	95	98

que producen más daño en el ADN, también afectan más el número de células. Es de resaltar que cuando se analiza la genotoxicidad del  $\text{PM}_{2.5}$  extraído con acetona (**Tabla 3**), esta muestra un incremento ligeramente superior a la genotoxicidad encontrada cuando se hizo la extracción con diclorometano (**Tabla 2**). Estos resultados se pueden atribuir al hecho de que cuando se realizó la extracción con acetona se obtuvieron más compuestos y que estos inducen mayor genotoxicidad.

Según la **Tabla 2** y la **Tabla 3**, todas las dosis de  $\text{PM}_{2.5}$  analizadas producen daño en el ADN de linfocitos humanos. Esto indica que la mayoría de los mutágenos que llegan a la población en las partículas del aire pueden penetrar hasta el núcleo de células humanas y dañar su ADN. Estos resultados concuerdan con estudios que se han realizado en Colombia y en otros países (U.S. EPA. 2002; Arlt, 2005; Meléndez,

Martínez y Quijano, 2012). Estos hallazgos indican que parte de la genotoxicidad mostrada por el aire de Cúcuta, es ocasionada por los HAPs encontrados, dado que existe suficiente evidencia que correlaciona la presencia de estos compuestos y el riesgo para la salud humana. Por ejemplo, el benzo (a) pireno está clasificado según la EPA (*State of California EPA*, 2008), en el grupo 1 como carcinógeno para humanos; el dibenzo (a,h) antraceno se clasifica en el grupo 2A como probablemente carcinogénicos para humanos; el benzo (a) antraceno, el benzo (b) fluoranteno y el indeno (1,2,3 cd) pireno se clasifican en el grupo 2B como posiblemente carcinogénicos para humanos; el benzo (g,h,i) perileno se clasifica en el grupo 3 no clasificable como carcinogénico para humanos. La EPA y la Agencia Internacional para la Investigación

sobre el Cáncer (IARC, 2010), destacan al dibenzo [a,h] pireno como posible carcinógeno.

Teniendo en cuenta que se observó daño genotóxico en linfocitos humanos, se puede concluir que: 1) el material particulado fracción respirable  $PM_{2,5}$  en una zona de alto flujo vehicular de Cúcuta-Norte de Santander puede ser uno de los factores de riesgo que contribuyen al aumento del índice de cáncer en la población expuesta, debido a que pueden inducir mutaciones en el genoma de las células expuestas y además pueden penetrar hasta el núcleo de linfocitos humanos y causar daño genotóxico en su ADN. 2) El aire de Cúcuta muestra genotoxicidad, la cual probablemente se debe a los HAPs: benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, indeno[1,2,3-cd]pireno y dibenzo[a,h]antraceno, así como a los metales Cd, Cr, Pb, Zn y Fe, encontrados en la materia orgánica del  $PM_{2,5}$  de esta localidad, esta genotoxicidad está relacionada con las emisiones de los motores diésel que circulan por la ciudad de Cúcuta.

En la extracción de HAPs con Acetona se logra detectar en la ciudad de Cúcuta, el benzo[g,h,i]perileno que es un indicador de HAPs emitidos por los escapes de los motores de diésel y de gasolina.

## AGRADECIMIENTOS

A la Rectoría de la Universidad de Pamplona por su apoyo financiero a este proyecto y a la colaboración prestada por el personal adscrito al Laboratorio de Control de Calidad de la Universidad de Pamplona.

## REFERENCIAS

- Arlt, V.M. (2005). 3-Nitrobenzanthrone, a Potential Human Cancer Hazard in Diesel Exhaust and Urban Air Pollution: A Review of the Evidence. *Mutagenesis*, 20(6), pp. 399–410.
- Ayala Mayte, C. (2004). Uso del Ensayo Cometa para evaluar el efecto de la temperatura sobre la reparación del daño genético inducido por peróxido de hidrógeno y la radiación ultravioleta A en células sanguíneas humanas. *Acta Farm. Bonaerense*, 23(3), pp. 277-84
- Bhatia, R.; Lopipero, P. and Smith, A. (1998). Diesel Exhaust Exposure and Lung Cancer. *Epidemiology*, 9(1), pp. 84–91.
- Brunekreef, B. and Holgate, S. T. (2002). Air Pollution and Health. *The Lancet*, 360(9361), pp. 1233–1242
- Claeys, M.; Graham, B.; Vas, G.; Wang, W.; Vermeylen, R.; Pashynska, V.; Cafmeyer, J.; Guyon, P.; Andreae, M.O.; Artaxo, P. and Maenhaut, W. (2004). Formation of Secondary Organic Aerosol through Photooxidation of Isoprene. *Science*, 303(5661), pp. 1173–1176.
- Claxton, L. D.; Woodall, G. M. Jr. (2007). A Review of the Mutagenicity and Rodent Carcinogenicity of Ambient Air. *Mutation Research*, 636(1-3), pp. 36-94.
- Dagouassat, M.; Lanone, S. and Boczkowski, J. (2012). Interaction of Matrix Metallo Proteinases with Pulmonary Pollutants. *European Respiratory Journal*, 39(4), pp. 1021-1032.
- Enya, T.; Suzuki, H.; Watanabe, T.; Hirayama, T.; Hisamatsu, Y. (1997). 3-Nitrobenzanthrone, a Powerful Bacterial Mutagen and Suspected Human Carcinogen Found in Diesel Exhaust and Airborne Particles. *Environmental Science and Technology Letters*, 31(10), pp. 2772–2776.
- Fukino, H.; Mimura, S.; Inoue, K. y Yamane, Y. (1982). Mutagenicity of Airborne Particles. *Mutation Research*, 102(3), pp. 237–247.
- Gutiérrez J.J.H.; Quijano Vargas, M.J.; Quijano Parra, A. (2012). Monitoreo y caracterización fisicoquímica del material particulado  $PM_{2,5}$  en Cúcuta-Norte de Santander-Colombia. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 10(1), pp. 24-38.
- Hałatek, T.; Ziniczuk-Walczak, H.; Szymczak, M.; Rydzynski, K. (2005). Neurological and Respiratory Symptoms in Shipyard Welders Exposed to Manganese. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 18(3), pp. 265-274.
- Hou, L.; Zhang, X.; Tarantini, L.; Nordio, F.; Bonzini, M.; Angelici, L.; Marinelli, B.; Rizzo, G.; Cantone, L.; Apostoli, P.; Bertazzi, P. A. and Baccarelli, A. (2011). Ambient PM Exposure and DNA Methylation in Tumor Suppressor Genes: A Cross-Sectional Study. *Particle and Fibre Toxicology*, 30, pp. 8-25.
- IARC (2010). Some Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. *IARC Monograph Evaluation Carcinogenic Risk to Human* 92, p. 8533.
- Lewtas, J.; Huisinigh, R.; Bradow, R.; Jungers, L.; Claxton, L.; Zweidinger, R. (1979). Application of Bioassay to the Characterization of Diesel Particle Emissions, in: M.D. Waters, S. Nesnow, J. Lewtas Huisinigh, et al. (Eds.), *Application of Short-term Bioassays in the Fractionation and Analysis of Complex Environmental Mixtures*, Plenum Press, New York, pp. 383–418.



- Lewtas, J. (2007). Air Pollution Combustion Emissions: Characterization of Causative Agents and Mechanisms Associated with Cancer, Reproductive, and Cardiovascular Effects. *Mutation Research*, 636(1-3), pp. 95–133.
- Lipsett, M. and Campleman, S. (1999). Occupational Exposure to Diesel Exhaust and Lung Cancer: A Meta-analysis. *American Journal Public Health*, 89(7), pp. 1009–1017.
- Loft, S.; Danielsen, P.; Løhr, M.; Jantzen, K.; Hemmingse, J. G.; Roursgaard, M.; Karotki, D. G. and Møller, P. (2012). Urinary excretion of 8-oxo-7,8-dihydroguanine as biomarker of oxidative damage to DNA. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 518(2), pp. 142–150.
- Maykut, N. N.; Lewtas, J.; Kim, E. and Larson, T. V. (2003). Source Apportionment of PM<sub>2.5</sub> at an Urban Improve Site in Seattle, WA. *Environmental Science and Technology*, 37(22), pp. 5135–5142.
- Meléndez-Gélvez, I.; Martínez-Montañez, M. L.; Quijano-Parra, A. (2012). Actividad mutagénica y genotóxica en el material particulado fracción respirable MP<sub>2.5</sub>, en Pamplona, Norte de Santander, Colombia. *Iatreia*, 25(4), pp. 347–356.
- Milaeva, E.R. (2011). Metal-based Antioxidants-Potential Therapeutic Candidates for Prevention the Oxidative Stress-Related Carcinogenesis: Mini-Review. *Current Topics in Medical Chemistry* 11(21), pp. 2703–2713.
- McCarthy, M. C.; O'Brien, T. E.; Charrier, J. G. and Hather, H. R. (2009). Characterization of the Chronic Risk and Hazard of Hazardous Air Pollutants in the United States Using Ambient Monitoring Data. *Environmental Health Perspective* 17, pp. 790–796.
- Pope III, C. A.; Burnett, R. T.; Thun, M. J.; Calle, E. E.; Krewski, D.; Ito, K. and Thurston, G. D. (2002). Lung Cancer, Cardiopulmonary Mortality and Long-Term Exposure to Fine Particulate Air Pollution. *Journal of American Medical Association*, 287(9), pp. 1132–1141.
- Schauer, J. J.; Rogge, W. F.; Hildemann, L. M.; Mazurek, M. A.; Cass, G. R.; Simoneit, B. R. T. (1996). Source Apportionment of Airborne Particulate Matter Using Organic Compounds as Tracers. *Atmospheric Environmental*, 30(22), pp. 3837–3855.
- Shah, M. H.; Shaheen, N.; Jaffar, M.; Khaliq, A.; Tariq, S.R. and Manzoor, S. (2006). Spatial Variations in Selected Metal Contents and Particle Size Distribution in an Urban and Rural Atmosphere of Islamabad, Pakistan. *Journal of Environmental Management*, 78(2), pp. 128–137.
- State of California EPA. (2008). Safe Drinking Water and Toxic Enforcement Act of 1986, California: State of California EPA.
- Touma, J. S.; Cox, W. M. and Tikvart, J. A. (2006). Spatial and Temporal Variability of Ambient Air Toxics Data. *Journal of the Air Waste Management Association*, 56(12), pp. 1716–1725.
- U.S. EPA. 1990 Amendments to the Clean Air Act. U.S. Senate Committee on Environment and Public Works; 2004.
- U.S. EPA. (2002). Health Assessment Document for Diesel Engine Exhaust, US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, National Center for Environmental Assessment, Washington, DC, 2002 (EPA/600/8-90/057F).
- U.S.EPA. (2004). Air Quality Criteria for Particulate Matter, US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, National Center for Environmental Assessment, Research Triangle Park Office, Research Triangle Park, NC, 2004 (vol. I, EPA/600/P-99/002aF, and vol. II, EPA/600/P-99/002bF).
- Vinitketkumnun, U.; Kalayanamitra, K.; Chewonarin, T. and Kamens, R. (2002). Particulate Matter, PM<sub>10</sub> & PM<sub>2.5</sub> Levels, and Airborne Mutagenicity in Chiang Mai, Thailand. *Mutation Research*, 519(1-2), pp. 121–131.
- Watson, J. G. and Chow, J. C. (2001). Source Characterization of Major Emission Sources in the Imperial and Mexicali Valleys along the US/Mexico Border. *Science of the Total Environment*, 276(1-3), pp. 33–47.
- Wu, C. F.; Larson, T. V.; Wu, S. Y.; Williamson, J.; Westberg, H. H. and Liu, L. J. S. (2007). Source Apportionment of PM<sub>2.5</sub> and Selected Hazardous Air Pollutants in Seattle. *Science of the Total Environment*, 386(1-3), pp. 42–52.
- Zhang, W. and Cui, J. (2001), Qi Q. Advances on the Biological Effect Indices for Fine Particles (PM<sub>2.5</sub>) in Air. *Wei Sheng Yan Jiu*, 30(6), pp. 379–382.
- Zheng, Na.; Jingshuang, L.; Qichao, W. and Zhongzhu, L. (2010). Health Risk Assessment of Heavy Metal Exposure to Street Dust in the Zinc Smelting District, Northeast of China. *Science of the Total Environment*, 408(4), pp. 726–733.

**PARA CITAR ESTE ARTÍCULO /  
TO REFERENCE THIS ARTICLE /  
PARA CITAR ESTE ARTIGO /**

Quijano-Parra, A.; Meléndez-Gélvez, I. (2014). Identificación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en el aire de Cúcuta-Colombia: efecto gen tóxico. *Revista EIA*, 11(21) enero-junio, pp. 79-87. [Online]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.14508/reia.2014.11.79-87>