

## ACTIVIDAD MUTAGÉNICA INDUCIDA POR HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN MUESTRAS DE PM<sub>2.5</sub> EN UN SECTOR RESIDENCIAL DE VILLA DEL ROSARIO-NORTE DE SANTANDER, COLOMBIA

Iván MELÉNDEZ GÉLVEZ<sup>1\*</sup>, Mónica Juliana QUIJANO VARGAS<sup>2</sup> y Alfonso QUIJANO PARRA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Pamplona. Kilómetro 1, vía Bucaramanga, Barrio el Buque, Norte de Santander, Colombia, C.P. 543050

<sup>2</sup> Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Pamplona. Kilómetro 1, vía Bucaramanga, Barrio el Buque, Norte de Santander, Colombia, C.P. 543050

\*Autor para correspondencia: jorivan2010@hotmail.com

(Recibido marzo 2015; aceptado marzo 2016)

Palabras clave: cromatografía de gases, material particulado, ensayo de Ames, *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100

### RESUMEN

Los contaminantes del aire, especialmente el material particulado (MP), han sido investigados como posibles agentes responsables del cáncer de pulmón. Varios componentes del MP como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) pueden contribuir con efectos adversos sobre la salud. La contaminación atmosférica junto con la ingesta de alimentos contaminados, son la vía primaria de la exposición humana a los HAP. Los HAP en general, son sospechosos de ser carcinogénicos, aunque el nivel sea muy bajo. La principal característica sobre la salud, es su capacidad de inducir cáncer en los organismos expuestos. El transporte vehicular es la fuente más importante de emisiones contaminantes atmosféricas y contribuye con más del 60 % de las emisiones de HAP. El objetivo de este trabajo fue determinar la mutagenicidad de muestras de PM<sub>2.5</sub>, provenientes del aire de Villa del Rosario, norte de Santander, Colombia e identificar los HAP. La identificación se realizó por medio de cromatografía de gases con detector de ionización de llama. Los ensayos mutagénicos se realizaron por el prueba de Ames en cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA 100.

Key words: gas chromatography, particulate matter, Ames test, *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100

### ABSTRACT

Air pollutants, especially particulate matter (PM) have been investigated as potential agents responsible for lung cancer. Several components of the PM such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) can contribute to adverse health effects. Air pollution, along with the intake of contaminated foods, are the primary route of human exposure to PAHs. PAHs are generally suspected of being carcinogenic at some degree. Although the level is very low, the main health risk associated with PHAs, is its ability to induce cancer in exposed organisms. The vehicular transport is the largest and most important source of atmospheric emissions that contribute over 60 % of PAH emissions. The aim of this study was to determine the mutagenicity of PM<sub>2.5</sub> samples, from the air in Villa

del Rosario, Norte de Santander, Colombia and identify PAH. Identification was carried out by gas chromatography with FID detector. The mutagenic assays were performed by the Ames *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100.

## INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son un grupo de compuestos químicos orgánicos no polares e hidrofóbicos, de dos o más anillos bencénicos fusionados. Son contaminantes del aire, producidos por la combustión incompleta de la materia orgánica, también se pueden encontrar en el suelo así como en el agua. Los HAP que contienen hasta cuatro anillos son conocidos como HAP livianos y los que contienen más de cuatro son los HAP pesados. Los HAP pesados son más estables y tóxicos que los HAP livianos (Wenzl *et al.* 2006). Las emisiones vehiculares han sido reconocidas como la fuente antrópica más importante de HAP en el aire urbano, por lo que su impacto en la salud y en el ambiente son temas muy estudiados en la actualidad (Lim *et al.* 2007, Douglas *et al.* 2011). La identificación de mutágenos en partículas del aire urbano confirmó la contribución de los HAP a la actividad mutagénica y condujo al descubrimiento de los nitroarenos, compuestos nitro aromáticos altamente mutagénicos en el escape del diésel (Schuetzle y Lewtas 1986, Lewtas 1988). Debido a sus conocidas propiedades carcinogénicas y mutagénicas, los efectos ambientales de los HAP son ampliamente estudiados (Li *et al.* 2006, Tan *et al.* 2009). El material particulado (MP) respirable compuesto por partículas de un diámetro aerodinámico menor de 10  $\mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{10}$ ) y de 2.5  $\mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{2.5}$ ) ha sido asociado con un incremento en la incidencia de las enfermedades pulmonares, cardiovasculares y cáncer (Brunekreef y Holgate 2002, Pope *et al.* 2002). Las partículas finas  $\text{PM}_{2.5}$  pueden penetrar las regiones más profundas de los pulmones como los bronquiolos, los alvéolos y causar efectos adversos para la salud, incluyendo enfermedades cardiopulmonares y cáncer de pulmón (Slezakova *et al.* 2011). El efecto del MP en el organismo depende de su composición química, un alto contenido de HAP incrementa la genotoxicidad del MP con la formación preferencial de aductos de HAP-ADN (Sevastyanova *et al.* 2008).

Los HAP pueden inducir toxicidad en organismos al interferir con la función de la membrana celular y los sistemas de acoplamiento de enzimas, los metabolitos de HAP se pueden unir al ADN y

causar interrupciones bioquímicas y daño celular (De Kok *et al.* 2006, Kosmehl *et al.* 2008). La presencia de otros compuestos incluidas la o-quinonas (Cho *et al.* 2004, Jakober *et al.* 2007, Chung *et al.* 2008) o los metales de transición (Donaldson *et al.* 2003, de Kok *et al.* 2006, Geiser y Kreyling 2010) pueden conducir a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y a la posterior inducción del estrés oxidativo (Hanzalova *et al.* 2010).

La exposición al MP puede resultar en la inflamación de los pulmones y la formación de macrófagos alveolares que conducen a la generación de radicales libres y a aumentar el estrés oxidativo (Li *et al.* 1997). El ataque de las ROS sobre la molécula de ADN produce un número de bases oxidadas (Cooke *et al.* 2003), siendo la 8-oxodesoxiguanosina (8-oxodG) la más estudiada ya que es una base altamente mutagénica, su presencia en el ADN resulta en la transversión guanina citosina-adenina (GC-TA). La peroxidación lipídica afecta la estructura y la actividad de las proteínas de membrana, también promueve la formación de compuestos intermedios que propagan el estrés oxidativo (Montuschi *et al.* 2004). En estudios para evaluar los efectos potenciales de los contaminantes atmosféricos en la salud, se emplea el bioensayo de mutagenicidad y el más conocido es el mutagénico de Ames que utiliza cepas de *Salmonella typhimurium* (Ames *et al.* 1975).

El objetivo de esta investigación fue determinar la mutagenicidad del aire de Villa del Rosario usando el bioensayo de Ames con las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100 y la identificación de HAP, mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (FID, por sus siglas en inglés), asociados con partículas finas  $\text{PM}_{2.5}$  colectadas en la sede de la Universidad de Pamplona ubicada en un sitio urbano de Villa del Rosario, Colombia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo

Se realizó el monitoreo de la fracción respirable  $\text{PM}_{2.5}$  con el equipo Partisol-2025 (Plus Air Sampler USEPA, Reference Designated  $\text{PM}_{2.5}$  Method

RFDS-0498-118 in accordance with 40CFR Parts 3), ubicado en la sede de la Universidad de Pamplona en Villa del Rosario (coordenadas 7°50'2"N 72°28'27"O) en la autopista internacional que comunica la ciudad de Cúcuta (Colombia) con la ciudad fronteriza de San Antonio (Venezuela). Este sector presenta un gran flujo de vehículos de transporte público, particular y de carga pesada que funcionan con gasolina y diésel. Los monitoreos de PM<sub>2.5</sub> se realizaron con filtros Pallflex de micro cuarzo de 47 mm, en el mes de agosto de 2013, en muestreos de 24 h cada tres días, el volumen de aire obtenido fue de 24 m<sup>3</sup>, los filtros se guardaron en bolsas plásticas con cierre hermético y se mantuvieron refrigerados.

#### **Tratamiento químico de los filtros. Extracción por ultrasonido**

La extracción de la materia orgánica de los filtros de PM<sub>2.5</sub> se realizó por ultrasonido en un baño ultrasónico (Branson 1510, modelo 1510R-MT) usando como solvente el diclorometano. Los filtros provenientes del monitoreo de PM<sub>2.5</sub> se sumergieron en un vaso de precipitados con 20 mL de diclorometano durante 15 min a temperatura ambiente. Esta extracción se repitió nueve veces hasta completar 200 mL del solvente.

#### **Concentración de la materia orgánica**

Una vez obtenido el extracto, se concentró en un evaporador rotatorio de vacío, marca Heidolph modelo Laborota 400-1, a una temperatura de 25 °C y 150 rpm hasta alcanzar un volumen aproximado de 10 mL, para obtener el extracto global. Posteriormente el extracto global se transfirió a viales que se sellaron y se mantuvieron en refrigeración y en la oscuridad hasta su análisis.

#### **Fraccionamiento del extracto global**

El fraccionamiento de la materia orgánica presente en el extracto global se realizó por medio de cromatografía de columna empaquetada con 10 g de sílica gel (Yang *et al.* 2010), previamente activada a 200 °C durante 8 días. El extracto global se disolvió en 10 mL de N-hexano y se adicionó a la columna. La columna fue eluída sucesivamente con 200 mL de N-hexano para obtener la fracción 1: con 200 mL de la mezcla N-hexano-diclorometano (3:1 v/v), obteniéndose así la fracción 2 y la fracción 3 con 200 mL de diclorometano. Cada fracción obtenida se concentró y se obtuvieron 10 mL, de los cuales 5 mL se destinaron para los análisis cromatográficos y los otros 5 mL se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) para los ensayos biológicos.

#### **Identificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)**

Para identificar los HAP presentes en la materia orgánica del PM<sub>2.5</sub> del aire de Villa del Rosario (extracto global y las tres fracciones), se utilizó un cromatógrafo de gases marca Agilent Technologies 6890A Plus Series II Hewlett-Packard Plus con detector FID. La columna utilizada fue Restek Rxi-17 Sil, 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro, 0.25 µm de diámetro interno (silarileno similar a 50 % fenil/50 % dimetil polisiloxano). Para la identificación de los HAP se utilizó el patrón de 18 hidrocarburos de Restek (catálogo # 31841 EPA Método 8310 PAH Mixture). La identificación cualitativa de los HAP presentes en el extracto global se realizó de acuerdo con las siguientes condiciones: temperatura del inyector 250 °C, 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 sin división. Condiciones del horno con una temperatura inicial 65 °C por 0.5 min que se incrementa de la siguiente manera: 15 °C/min hasta 200 °C, 4 °C/min hasta 330 °C durante 15 min. Tiempo de análisis por muestra 53.33 min. Gas de arrastre helio, flujo 20 mL/min.

#### **Detección de la actividad mutagénica**

El efecto mutagénico de los extractos del PM<sub>2.5</sub> del aire de Villa del Rosario, se determinó por medio del bioensayo de Ames, a través del protocolo descrito por Maron y Ames (Mortelmans y Zeiger 2000).

En esta prueba el indicativo de la mutación está dado por la reversión his<sup>-</sup> a his<sup>+</sup>, las revertantes se identifican porque crecen en medio mínimo sin histidina. Se trabajó con las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100. El bioensayo de Ames se realizó por triplicado con las cepas TA98 y TA100 para el extracto global y las diferentes fracciones de la materia orgánica (FT, F1, F2 y F3). Con cada muestra se trataron 10<sup>8</sup> bacterias y se utilizaron testigos positivos y negativos. Para el testigo positivo se utilizó 4-nitroquinolina N-óxido (4-NQO). Como testigo negativo se usó DMSO al 12 %. Para realizar los análisis mutagénicos se evaluaron tres concentraciones de MP (50 µg, 100 µg y 150 µg). Para verificar la reproducibilidad de los resultados se realizaron tres experimentos independientes, cada uno por duplicado. Para clasificar los extractos o las fracciones como mutagénicos o no, se calculó el índice de mutagenicidad (IM). IM = RI/RE, RI: revertantes inducidas por el tratamiento, RE: revertantes espontáneas (inducidas por el testigo negativo). El IM indica las veces que es superada la mutagenicidad del

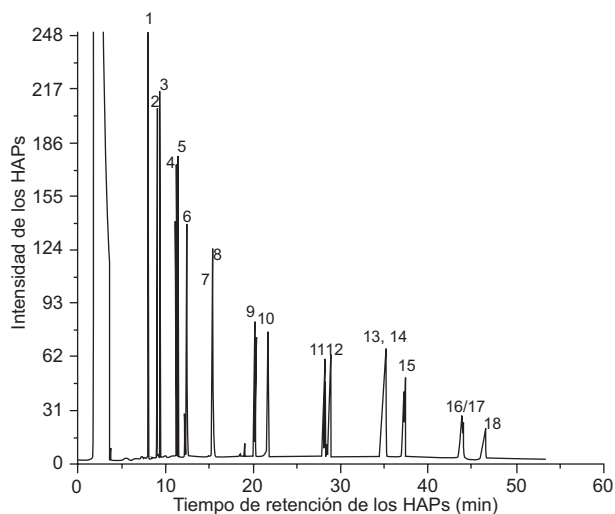
testigo negativo, para calcularlo se tomaron en cuenta los criterios de Flückiger-Isler y Kamber (2012), que establecen que ensayos en los que se obtenga un IM entre 2 y 3, indica que la sustancia probada tiene una mutagenicidad débil y que sustancias con resultados mayores a 3, tienen una mutagenicidad alta.

Respecto al análisis estadístico se utilizó la prueba de Dunnett para determinar el nivel de significancia entre el tratamiento y el testigo. Las diferencias de las medias se consideraron significativas con una  $p < 0.05$ .

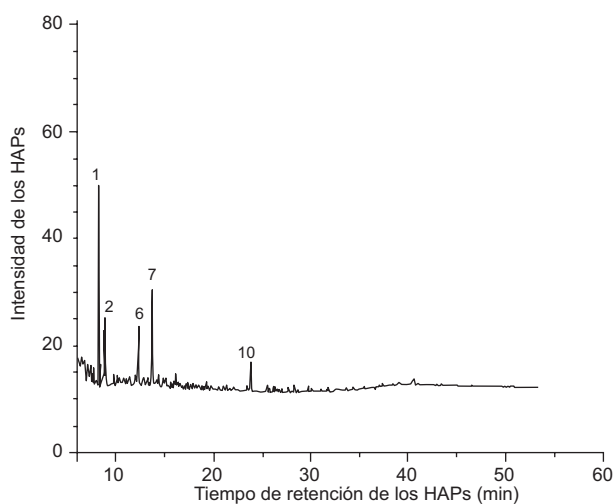
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la identificación de los diferentes HAP presentes en el extracto global y las fracciones del  $PM_{2.5}$  de Villa del Rosario extraídos con diclorometano, se tomó como referencia el cromatograma de la muestra patrón de Restek de 18 HAP (EPA, Method 8310 PAH Mix) como se muestra en la **figura 1**. En este cromatograma los compuestos presentes en la muestra patrón son: 1) naftaleno, 2) 1-metilnaftaleno, 3) 2-metilnaftaleno, 4) cenaftileno, 5) acenafteno, 6) fluoreno, 7) fenantreno, 8) antraceno, 9) fluoranteno, 10) pireno, 11) benzo[a]antraceno, 12) criseno, 13) benzo[b]fluoranteno, 14) benzo[k]fluoranteno, 15) benzo[a]pireno, 16) indeno(1,2,3-cd)pireno, 17) dibenzo[a,h]antraceno, 18) benzo[ghi]perileno.

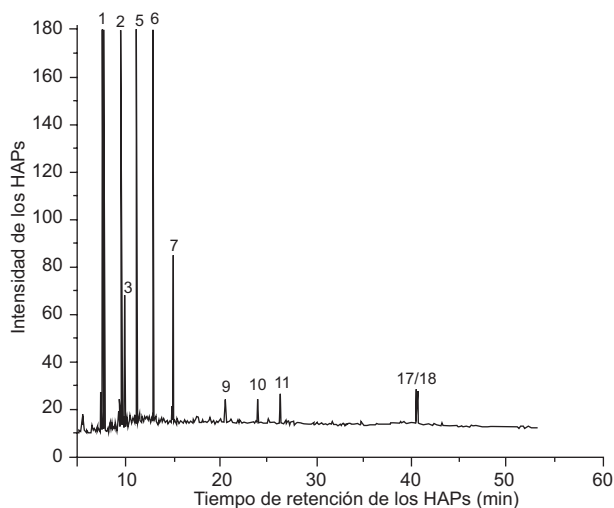
En las **figuras 2, 3, 4 y 5** se muestran los cromatogramas del extracto global y de las fracciones 1, 2 y 3 respectivamente del  $PM_{2.5}$  del aire de Villa del Rosario.



**Fig. 1.** Cromatograma correspondiente a la muestra patrón de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)



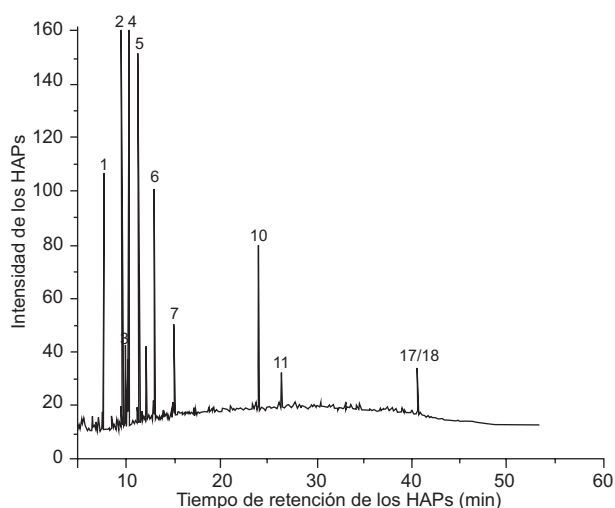
**Fig. 2.** Cromatograma del extracto global del  $PM_{2.5}$  del aire de Villa de Rosario extraída con diclorometano. Se observan los siguientes hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP): pico 1, naftaleno, pico 2, 1-metilnaftaleno, pico 6, fluoreno, pico 7 fenantreno y pico 10, pireno



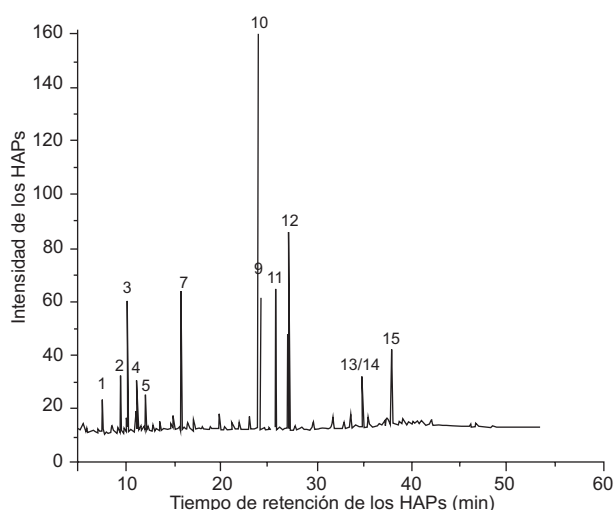
**Fig. 3.** Cromatograma correspondiente a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) encontrados en la fracción 1 de las muestras de  $PM_{2.5}$  del aire de Villa del Rosario: pico 1, naftaleno; pico 2, 1-metilnaftaleno; pico 3, 2-metilnaftaleno; pico 5, acenafteno; pico 6, fluoreno; pico 7, fenantreno; pico 9, fluoranteno; pico 10, pireno; pico 11, benzo[a]antraceno; picos 17/18, dibenzo [ah]antraceno/ benzo [g,i,h] perileno

En el **cuadro I** se muestran los HAP extraídos con diclorometano (DCM), encontrados en el extracto global, así como en las tres fracciones del  $PM_{2.5}$  del aire de Villa del Rosario

El papel de la contaminación del aire en el cáncer humano ha sido reportado en diferentes investigaciones (Samet 2004, Næss *et al.* 2007). Estudios relacionados con el origen de las partículas finas ( $PM_{2.5}$ )



**Fig. 4.** Cromatograma de la fracción 2 del  $PM_{2.5}$  del aire de Villa del Rosario en el que se observa los siguientes hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP): pico 1, naftaleno; pico 2, 1-metilnaftaleno; pico 3, 2-metilnaftaleno; pico 4, -acenaftileno; pico 5, acenafteno; pico 6, fluoreno; pico 7, fenantreno; pico 9, fluoranteno; pico 10, pireno; pico 11, benzo[a]antraceno; picos 17/18, dibenzo [a,h] antraceno /benzo [g,i,h] perileno



**Fig. 5.** Cromatograma de la fracción 3 de las muestras del  $PM_{2.5}$  del aire de Villa del Rosario en el que se identifica a los siguientes hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP): pico 1, naftaleno; pico 2, 1-metilnaftaleno; pico 3, 2-metilnaftaleno; pico 4, acenaftileno; pico 5, acenafteno; pico 7, fenantreno; pico 10, pireno; pico 11, benzo[a]antraceno; pico 12, criseno; picos 13/14, benzo [b]fluoranteno/ benzo[k] fluoranteno; 15, benzo [a]pireno

en EUA y en otros centros urbanos demostraron que los vehículos de motor diésel y los de gasolina son una de las principales fuentes de material particulado (Schauer *et al.* 1996, Watson y Chow 2001,

**CUADRO I.** HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS ENCONTRADOS EN EL AIRE DE VILLA DEL ROSARIO

Hidrocarburos aromáticos policíclicos	Extracto global	Fracción		
		1	2	3
1.-Naftaleno	X	X	X	X
2.-1 Metilnaftaleno	X	X	X	X
3.-2Metilnaftaleno	ND	X	X	X
4.-Acenaftileno	ND	X	X	X
5.-Acenafteno	ND	X	X	ND
6.-Fluoreno	X	X	X	X
7.-Fenantreno	X	X	X	X
9.-Fluoranteno	ND	X	ND	ND
10.-Pireno	X	X	X	X
11.-Benzo[a] antraceno	ND	X	X	X
12.-Criseno	ND	ND	ND	X
13.-Benzo[b]fluoranteno	ND	ND	ND	X
14.-Benzo[k] fluoranteno	ND	ND	ND	X
15.-Benzo [a] pireno	ND	ND	ND	X
17.-Dibenzo[a,h]antraceno	ND	X	X	ND
18.-Benzo[g,i,h]perileno	ND	X	X	ND

X Detectado

ND = No detectado

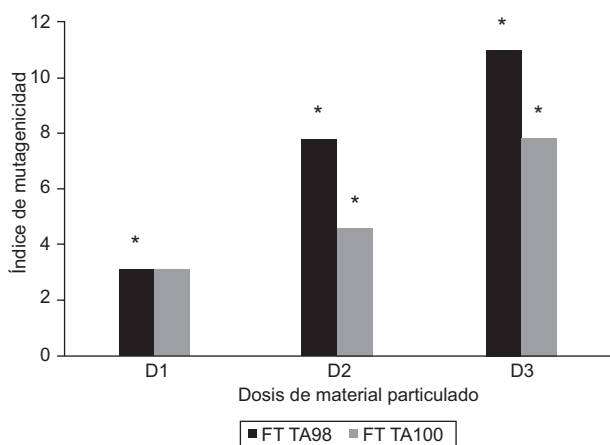
Barakat 2002, Maykut *et al.* 2003). Estudios de fraccionamiento del material particulado orgánico ( $PM_{2.5}$ ) del aire, han identificado HAP mutagénicos y carcinogénicos, que pueden causar daño oxidativo al ADN y conducir a efectos negativos tanto cardiovasculares como reproductivos (Lewtas 2007). Los HAP han sido identificados como carcinógenos en humanos por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés, 1984, 2010). La actividad cancerígena depende de la estructura del HAP, siendo más importante para moléculas de 4, 5, 6 ó 7 anillos. Además, las estructuras angulares están relacionadas con una mayor actividad cancerígena frente a las que presentan una estructura lineal y más condensada (Umbuzeiro *et al.* 2008, Dong y Lee 2009). La IARC, clasifica al benzo[a]pireno (BaP) como cancerígeno en humanos (IARC 1987). Por lo tanto, la presencia de BaP en el aire puede aumentar los riesgos carcinogénicos para el ser humano tras la exposición al aire contaminado. Los HAP suelen considerarse un indicador de emisiones de tráfico vehicular (Guo *et al.* 2003). Los HAP producidos por la combustión de combustibles orgánicos son considerados como mutágenos (IARC 1989). De acuerdo con la IARC, los HAP en el aire de Villa del Rosario que son cancerígenos potenciales en humanos son: el criseno, benzo (a) antraceno, la mezcla de benzo (b,k) fluorantenos y como probable el dibenzo[a,h]antraceno. El fenantreno hallado en



el aire de Villa del Rosario es característico de las emisiones del tráfico vehicular (Ravindra *et al.* 2006). El benzo(gih)perileno se ha asociado con emisiones vehiculares (Dichut *et al.* 2000).

Los tipos de órganos más comunes afectados por el cáncer y que están asociados con la exposición de gases de escape del diésel son el pulmón, la vejiga y el tejido linfático (Lipsett y Campleman 1999). Ciertos HAP como el fenantreno, el pireno y el fluoranteno, se han relacionado con enfermedades respiratorias crónicas como el asma, la bronquitis severa y el cáncer de pulmón (Taguchi *et al.* 2007, Valavanidis *et al.* 2008, Aubier 2009). Los HAP con 3 y 4 anillos aromáticos fusionados están típicamente asociados con las emisiones de los vehículos diésel (Guo *et al.* 2003). En el aire de Villa del Rosario los HAP relacionados con las emisiones diésel son: fluoreno, fenantreno, pireno y benzo[a]antraceno. Cabe mencionar que los HAP hallados en las muestras del aire (PM<sub>2.5</sub>) de Villa del Rosario, provienen exclusivamente de la combustión de las fuentes móviles que circulan con diésel y gasolina (Mi *et al.* 2000, Mi *et al.* 2001). Además, la IARC (2014), clasifica las emisiones de los vehículos que funcionan con diésel, como cancerígeno para los seres humanos.

En la **figura 6** se observan las revertantes inducidas por el extracto global en las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium*. Las cepas de esta especie permiten identificar el tipo de mutación que está involucrada, ya que cada cepa es específica para una mutación. La TA98 (His D3052) detecta mutación por desplazamiento del marco de lectura y la TA100

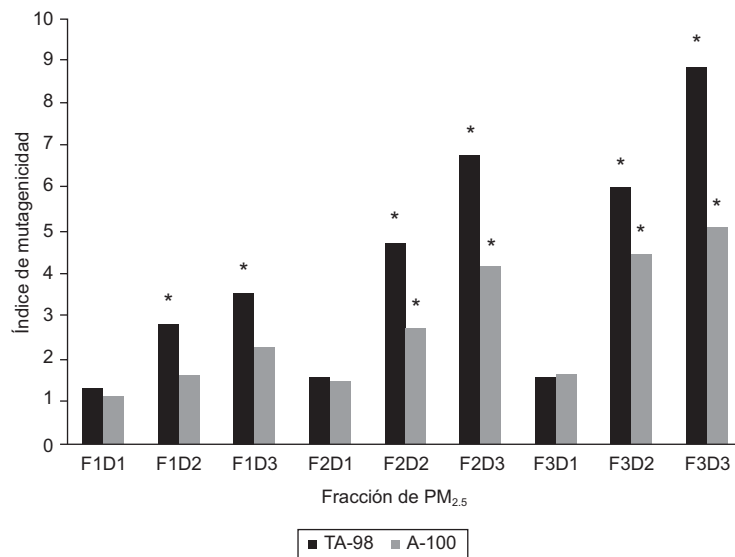


**Fig. 6.** Índice de mutagenicidad inducido por el extracto global de PM<sub>2.5</sub> del aire de Villa del Rosario. D1: dosis 1 (50 µg), D2: dosis 2 (100 µg), D3: dosis 3 (150 µg). FT: fracción total. TA98 y TA100 cepas de *Salmonella typhimurium*. \* Diferencia estadísticamente significativa comparada con el testigo negativo con  $p < 0.05$

(His G46) detecta mutaciones por sustitución de bases. De acuerdo con los resultados nos podemos dar cuenta que aunque existen en el extracto de aire los dos tipos de mutágenos, los compuestos que inducen mutación por desplazamiento del marco de lectura superan en 1.6 veces a los compuestos que inducen mutación por sustitución de bases. Es de notar, que a medida que aumentamos la dosis hay un incremento también en la respuesta mutagénica.

En la **figura 7** se muestra el índice de mutagenicidad (IM) inducido por las diferentes fracciones del PM<sub>2.5</sub> del aire de Villa del Rosario en las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium*. Si este índice es mayor o igual a 2, se considera una respuesta mutagénica positiva, lo que significa que en la muestra analizada existen compuestos químicos que están alterando el genoma de las bacterias analizadas. Como se observa en la **figura 7**, la fracción 3 (F3), es la que presenta mayor mutagenicidad. La razón de mutagenicidad es mayor en la cepa TA98, indicándonos que los compuestos presentes en esta muestra inducen principalmente mutación por pérdida o ganancia de bases. Los resultados observados se pueden atribuir a agentes mutagénicos presentes en el material particulado que pueden alterar el marco de lectura u originar sustitución de bases. Dichos agentes pueden ser derivados nitroaromáticos, HPA, metales y agentes cancerígenos amino (Kawanaka *et al.* 2008, Ianistcki *et al.* 2009). Gran parte de la actividad mutagénica encontrada en este estudio podría ser debida a dinitropirenos, compuestos que no requieren activación metabólica y lesionan el ADN originando pérdida o ganancia de bases (Kawanaka *et al.* 2008). Estos resultados son similares a los encontrados en las muestras de PM<sub>2.5</sub> del aire de la ciudad de Pamplona Norte de Santander (Meléndez *et al.* 2012).

La mutagenicidad de las partículas diésel ha sido investigada por algunos autores (Singh *et al.* 2004, Seung-Min y Chung 2006, Riger *et al.* 2011) y se ha demostrado que inducen mutagenicidad en ausencia de enzimas microsomales (Taga *et al.* 2005, Lingzhi *et al.* 2007). Se ha descubierto que una gama más amplia de compuestos aromáticos policíclicos encontrados en las emisiones de combustión de diésel y en la contaminación del aire son a la vez mutagénicos y carcinogénicos como los nitroarenos, entre los que se incluyen a las lactonas del nitropireno y nitrofenantreno y a la 3-nitrobenzantrona que es un potente mutágeno encontrado en las partículas de diésel. (Enya *et al.* 1997). Se ha informado que la 3-nitrobenzantrona es un mutágeno potente en el ensayo de mutagénesis bacteriana de Ames, que induce tumores en roedores (Arlt 2005, Nagy *et al.* 2005)



**Fig. 7.** Índice de mutagenicidad inducido fracciones de PM<sub>2.5</sub> el aire de Villa del Rosario. TA98 y TA100 cepas de *Salmonella typhimurium*. F<sub>1</sub>: Fracción 1 (eluida con n-hexano), F<sub>2</sub>: Fracción 2 (eluida con n-hexano/DCM (3:1) (v/v)), F<sub>3</sub>: Fracción 3 (eluida con DCM), D<sub>1</sub>: Dosis 1 (50 µg), D<sub>2</sub>: Dosis 2 (100 µg), D<sub>3</sub>: Dosis 3 (150 µg), \* Diferencia estadísticamente significativa comparada con el testigo negativo con p < 0.05

Los resultados positivos indican, con base en las condiciones de la prueba de Ames que las muestras del material particulado PM<sub>2.5</sub> del aire de Villa del Rosario inducen mutaciones por sustitución y por pérdida o ganancia de bases, originadas por compuestos que no requieren de la activación metabólica y que son generados fundamentalmente por la combustión vehicular. Lo anterior podría constituir un factor de riesgo para la población expuesta.

## AGRADECIMIENTOS

Los más sinceros agradecimientos a la Universidad de Pamplona-Colombia por la financiación de esta investigación.

## REFERENCIAS

- Ames B.N., McCann J. y Yamasaki E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31, 347-364. DOI: 10.1016/0165-1161(75)90046-1.
- 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, 399-410. DOI: 10.1093/mutage/gei057
- Aubier M. (2009). Traffic-related pollutants and their impact on allergic respiratory diseases. *Bull. Acad. Natl. Med.* 193, 1305-1313.
- Barakat A.O. (2002). PAHs and petroleum biomarkers in the atmospheric environment of Alexandria City, Egypt. *Water Air Soil Poll.* 139, 289-310. DOI: 10.1023/A:1015894520672
- Brunekreef B. y Holgate S.T. (2002). Air pollution and health. *Lancet* 360, 1233-1242. DOI: 10.1016/S0140-6736(02)11274-8
- Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M. y Lunec J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 17, 1195-1214. DOI: 10.1096/fj.02-0752rev
- Cho A.K., Stefano E., You Y., Rodriguez C.E., Schmitz D.A., Kumagai A.H., Eiguren-Fernandez A., Kobayashi T., Avol E. y Froines J.R. (2004). Determination of four quinones in diesel exhaust particles, SRM 1649, and atmospheric PM<sub>2.5</sub>. *Aerosol Sci. Technol.* 38, 68-81. DOI: 10.1080/02786820390229471
- Chung S.W., Chung H.Y., Toriba A., Yu B., Kameda T., Tang N. y Hayakawa K. (2008). An environmental quinoid polycyclic aromatic hydrocarbon, acenaphthene quinone, modulates cyclooxygenase-2 expression through reactive oxygen species generation and nuclear factor kappa B activation in A549 cells. *Toxicol. Sci.* 101, 152-158. DOI: 10.1093/toxsci/kfl150

- Dichut R., Canuel E., Gustafson K., Walker S., Edgecombe G., Gaylor M. y Macdonald E. (2000). Automotive sources of carcinogenic PAH with particulate matter in the Chesapeake Bay Region. *Environ. Sci. Technol.* 34, 4535-4640.  
DOI: 10.1021/es000971e
- Donaldson K., Stone V., Borm P.J., Jiménez L.A., Gilmour P.S., Schins R.P.F., Knaapen A.M., Rahman I., Faux S.P., Brown D.M. y MacNee W. (2003). Oxidative stress and calcium signalling in the adverse effects of environmental particles (PM<sub>10</sub>). *Free Radical Bio. Med.* 34, 1369-1382.  
DOI: 10.1016/S0891-5849(03)00150-3
- Dong T.T.T. y Lee B.K. (2009). Characteristics, toxicity, and source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in road dust of Ulsan, Korea. *Chemosphere.* 74, 1245-1253.  
DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.11.035
- Douglas M.J., Watkins S.J., Gorman D.R. y Higgins M. (2011). Are cars the new tobacco? *J. Public Health (Oxf.)* 33, 160-169.  
DOI: 10.1093/pubmed/fdr032
- De Kok T.M.C., Driessche H.A.L., Hogervorst J.G.F. y Briede J.J. (2006). Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: a review of recent studies (review). *Mutat. Res.* 613, 103-122.  
DOI: 10.1016/j.mrrev.2006.07.001
- Enya T., Suzuki H., Watanabe T., Hirayama T. y Hisamatsu Y. (1997). 3-Nitrobenzanthrone, a powerful bacterial mutagen and suspected human carcinogen found in diesel exhaust and airborne particles, *Environ. Sci. Technol.* 31, 2772-77.  
DOI: 10.1021/es961067i
- Fluckiger-Isler S. y Kamber M. (2012). Direct comparison of the Ames microplate format (MPF) test in liquid medium with the standard Ames pre-incubation assay on agar plates by use of equivocal to weakly positive test compounds. *Mutat. Res.* 747, 36-45.  
DOI: 10.1016/j.mrgentox.2012.03.014
- Geiser M. y Kreyling W.G. (2010). Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.* 7, 2.  
DOI: 10.1186/1743-8977-7-2
- Guo H., Lee S.C., Ho K.F., Wang X.M. y Zou S.C. (2003). Particle-associated polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air of Hong Kong. *Atmos. Environ.* 37, 5307-5317.  
DOI: 10.1016/j.atmosenv.2003.09.011
- Hanzalova K., Rossner P. Jr. y Sram R.J. (2010). Oxidative damage induced by carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons and organic extracts from urban air particulate matter. *Mutat. Res.* 696, 114-121.  
DOI: 10.1016/j.mrgentox.2009.12.018
- IARC (2010). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Volume 92, International Agency for Research on Cancer, Lyon, Francia, pp 244-424.
- IARC (1984). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Vol. 34, Polynuclear aromatic compounds, Part 3. International Agency for Research on Cancer, Lyon, Francia, pp 13-19.
- IARC (1987). Overall evaluations of carcinogenicity: An updating supplement 7 of IARC monographs Volumes 1-42. International Agency for Research on Cancer, Lyon, Francia, pp 21-27.
- IARC (1989). Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Occupational exposures in petroleum refining; Crude oil and major petroleum fuels. Vol. 45. International Agency for Research on Cancer. Lyon, Francia, pp 17-24.
- IARC (2014). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Vol. 105. Diesel and gasoline engine exhausts and some nitroarenes. International Agency for Research on Cancer. Lyon, Francia, pp 313-423.
- Jakober C.A., Riddle S.G., Robert M.A., Destaillets H., Charles M.J., Green P.G. y Kleeman M.J. (2007). Quinone emissions from gasoline and diesel motor vehicles. *Environ. Sci. Technol.* 41, 4548-4554.  
DOI: 10.1021/es062967u
- Kawanaka Y., Matsumoto E., Wang N., Yun S-J. y Sakamoto K. 2008. Contribution of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons to the mutagenicity of ultrafine particles in the roadside atmosphere. *Atmos. Environ.* 42, 7423-28.  
DOI: 10.1016/j.atmosenv.2008.06.032
- Kosmehl T., Hallare A.V., Braunbeck T. y Hollert H. (2008). DNA damage induced by genotoxicants in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after contact exposure to freeze dried sediment and sediment extracts from Laguna Lake (The Philippines) as measured by the comet assay. *Mutat. Res.* 650, 1-14.  
DOI: 10.1016/j.mrgentox.2007.09.009
- Ianistcki M., Dallarosa J., Sauer C., Teixeira C.E. y da Silva J. (2009). Genotoxic effect of polycyclic aromatic hydrocarbons in the metropolitan area of Porto Alegre, Brazil, evaluated by *Helix aspersa* (Müller, 1774). *Environ. Pollut.* 157, 2037-42.  
DOI: 10.1016/j.envpol.2009.02.025
- Lipsett M. y Campleman S. (1999). Occupational exposure to diesel exhaust and lung cancer: A meta-analysis. *Am. J. Public Health.* 89, 1009-1017.  
DOI: 10.2105/AJPH.89.7.1009
- Lewtas J. (2007). Air pollution combustion emissions: Characterization of causative agents and mechanisms



- associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. *Mutat. Res.* 636, 95-133.  
DOI: 10.1016/j.mrrev.2007.08.003
- Lewtas J. (1988). Genotoxicity of complex mixtures: strategies for the identification and comparative assessment of airborne mutagens and carcinogens from combustion sources. *Fund. Appl. Toxicol.* 10, 571-589.  
DOI: 10.1016/0272-0590(88)90184-4
- Li X.Y., Gilmour P.S., Donaldson K. y MacNee W. (1997). *In vivo* and *in vitro* proinflammatory effects of particulate air pollution (PM<sub>10</sub>). *Environ. Health Perspect.* 105, 1279-1283.
- Li J., Zhang G., Li X.D., Qi S.H., Liu G.Q. y Peng X.Z. (2006). Source seasonaof polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a subtropi Guangzhou, South China. *Sci. Total Environ.* 355, 145-155.  
DOI: 10.1016/j.scitotenv.2005.02.042
- Lim M.C.H., Ayoko G.A., Morawska L., Ristovski Z.D. y Jayaratne E.R. (2007). Influence of fuel composition on polycyclic aromatic hydrocarbon emissions from a fleet of in-service passenger cars. *Atmos. Environ.* 41, 50-160.  
DOI: 10.1016/j.atmosenv.2006.07.044
- Lingzhi B., Shaopeng Ch., Lijun W., Tom K.H., Yuejin W., Zengliang Yu. y Xu An. (2007). Mutagenicity of diesel exhaust particles mediated by cell-particle interaction in mammalian cells. *Toxicology* 229, 91-100.  
DOI: 10.1016/j.tox.2006.10.007
- Maykut N.N., Lewtas J., Kim E. y Larson T.V. (2003). Source apportionment of PM<sub>2.5</sub> at an urban IMPROVE site in Seattle, WA, *Environ. Sci. Technol.* 37, 5135-5142.  
DOI: 10.1021/es030370y
- Meléndez I., Quijano A. y Martínez M. (2012). Actividad mutagénica y genotóxica en el material particulado fracción respirable PM<sub>2.5</sub> en Pamplona-Norte de Santander-Colombia. *Iatreia* 25, 347-356.
- Mi H.H., Lee W.J. y Chen C.B. (2000). Effect of fuel aromatic content on PAH emission from a heavy-duty diesel engine. *Chemosphere* 41, 1783-1790.
- Mi H.H., Lee W.J., Tsai P.J. y Chen C.B. (2001). A comparison on the emission of polycyclic aromatic hydrocarbons and their corresponding carcinogenic potencies from a vehicle engine using leaded and lead-free gasoline. *Environ. Health. Persp.* 109, 1285-1290.
- Montuschi P., Barnes P.J. y Roberts L.J. (2004). Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J.* 18, 1791-1800.  
DOI: 10.1096/fj.04-2330rev
- Mortelmans K. y Zeiger E. (2000). The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res.* 455, 29-60.  
DOI: 10.1016/S0027-5107(00)00064-6
- Næss O., Nafstad P., Aamodt G., Claussen B. y Rosland P. (2007). Relation between concentration of air pollution and causespecificmortality: four-year exposures to nitrogen dioxide and particulate matter pollutants in 470 neighborhoods in Oslo, Norway. *Am. J. Epidemiol.* 165, 435-443.  
DOI: 10.1093/aje/kwk016
- Nagy E., Zeisig M., Kawamura K., Hisamatsu Y., Sugeta A., Adachi S. y Moller L. (2005). DNA adduct and tumor formations in rats after intratracheal administration of the urban air pollutant 3-nitrobenzanthrone. *Carcinogenesis* 26,1821-1828.  
DOI: 10.1093/carcin/bgi141
- Pope III C.A., Burnett R.T., Thun M.J., Calle E.E., Krewski D., Ito K. y Thurston G.D. (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 287, 1132-1141.  
DOI: 10.1001/jama.287.9.1132
- Ravindra K., Bencs L., Wauters E., de Hoog J., Deutsch F., Roekens E., Bleux N.,Berghmans P. y Van Grieken R. (2006). Seasonal and site-specific variation in vapour and aerosol phase PAHs over Flanders (Belgium) and their relation with anthropogenic activities. *Atmos. Environ.* 40, 771-785.  
DOI: 10.1016/j.atmosenv.2005.10.011
- Riger C.J., Fernandes P.N., Vilela L.F., Mielniczki-Pereira A.A., Bonatto D., Henriques J.A. y Eleutherio E.C.(2011). Evaluation of heavy metal toxicity in eukaryotes using a simple functional assay. *Metalomics.* 3, 1355-6.  
DOI: 10.1039/C1MT00086A
- Samet J.M. (2004). Environmental causes of lung cancer: what do we know in 2003? *Chest.* 125, 80S-83S.  
DOI: 10.1378/chest.125.5\_suppl.80S
- Schauer J.J., Rogge W.F., Hildemann L.M., Mazurek M.A., Cass G.R. y Simoneit B.R.T. (1996). Source apportionment of airborne particulate matter using organic compounds as tracers. *Atmos. Environ.* 30, 3837-3855.  
DOI: 10.1016/1352-2310(96)00085-4
- Schuetzle D. y Lewtas J. (1986). Bioassay-directed chemical analysis in environmental research. *Anal. Chem.* 58, 1060A-1075A.  
DOI: 10.1021/ac00124a001
- Sevastyanova O., Novakova Z., Hanzalova K., Binkova B., Sram R.J. y Topinka J. (2008). Temporal variation in the genotoxic potential of urban air particulate matter. *Mutat. Res.* 649, 179-186.  
DOI: 10.1016/j.mrgentox.2007.09.010
- Seung-Min Oh.y Kyu-Hyuck Ch. (2006). Identification of mammalian cell genotoxins in respirable diesel exhaust particles by bioassay-directed chemical analysis. *Toxicol. Lett.* 161, 226-235.  
DOI: 10.1016/j.toxlet.2005.09.008

- Singh P., DeMarini D.M., Dick C.A.J., Tabor V.J.V., Ryan W.P., Linak T., Kobayashi T. y Gilmour M.I. (2004). Sample characterization of automobile and forklift diesel exhaust particles and comparative pulmonary toxicity in mice. *Environ. Health Perspect.* 112, 820-825.
- Slezakova K., Castro D., Delerue-Matos C., Alvim-Ferraz M.C., Morais S. y Pereira M.C. (2011). Air pollution from traffic emissions in Oporto, Portugal: Health and environmental implications. *Microchem. J.* 99, 51-59. DOI: 10.1016/j.microc.2011.03.010
- Taga R., Tang N., Hattori T., Tamura K., Sakai S., Toriba A., Kizu R. y Hayakawa V. (2005). Direct-acting mutagenicity of extracts of coal burning-derived particulates and contribution of nitropolycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res.* 581, 91-95. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2004.11.013
- Taguchi K., Fujii S., Yamano S., Cho A.K., Kamisuki S., Nakai Y., Sugawara F., Froines J.R. y Kumagai Y. (2007). An approach to evaluate two-electron reduction of 9,10-phenanthraquinone and redox activity of the hydroquinone associated with oxidative stress. *Free Radical Biol. Med.* 43, 789-799. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.021
- Tan J.H., Duan J.Ch., Chen D.H., Wang X.H., Guo S.J., Bi X.H., Sheng G.Y., He K.B. y Fu J.M. (2009). Chemical characteristics of haze during summer and winter in Guangzhou. *Atmos. Res.* 94, 238-245. DOI: 10.1016/j.atmosres.2009.05.016
- Umbuzeiro G.A., Franco A., Martins M.H., Kummrow F., Carvalho L., Schmeiser H.H., Leykauf J., Stiborova M. y Claxton L.D. (2008). Mutagenicity and DNA adduct formation of PAH, nitro-PAH, and oxy-PAH fractions of atmospheric particulate matter from Sao Paulo, Brazil. *Mutat. Res-Gen Tox. En.* 652, 72-80. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2007.12.007
- Valavanidis A., Fiotakis K. y Vlachogianni T. (2008). Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. *J. Environ. Sci. Health. C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 26, 339-362. DOI: 10.1080/10590500802494538
- Watson J.G. y Chow J.C. (2001). Source characterization of major emission sources in the Imperial and Mexicali Valleys along the US/Mexico border, *Sci. Total Environ.* 276, 33-47. DOI: 10.1016/S0048-9697(01)00770-7
- Wenzl T., Simon R., Anklam E. y Kleiner J. (2006). Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union. *Trends Anal. Chem.* 25, 716-25. DOI: 10.1016/j.trac.2006.05.010
- Yang X.Y., Igarashi K., Tang N. y Lin J.M. (2010). Indirect- and direct-acting mutagenicity of diesel, coal and wood burning-derived particulates and contribution of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons. *Research* 695, 29-34. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2009.10.010