



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ENEP-IZTACALA

ANALISIS QUIMICO DE LOS HIDROCARBUROS EN LA FASE
DE VAPOR DE EMISIONES VEHICULARES CON GASOLINA
SIN PLOMO Y LA EVALUACION CITOGENETICA EN SU
APLICACION A LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO

BC 1406/98
Ej. 1

T E S I S

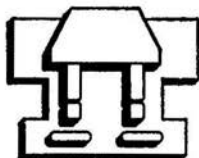
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

CLAUDIA MEDINA COYOTZIN

Este trabajo se realizó bajo la dirección
del Dr. Rafael Villalobos Prietrini
del Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM
y del Instituto Mexicano del Petróleo.



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEXICO

1998.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedico esta tesis a DIOS por estar siempre a mi lado permitiéndome lograr mis metas.

A mis padres con cariño y gratitud por haberme dado su amor, confianza y apoyo toda mi vida.

A mis hermanas por la compañía y afecto que siempre me han brindado.

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Rafael Villalobos Pietrini por la asesoría, dirección y realización de esta investigación.
- A la Biol. Sara Melchor Castro de una manera muy especial por su oportuna ayuda técnica en la prueba biológica utilizada en este estudio, sus consejos y por su enorme disponibilidad en todo momento.
- Al Dr. Isaac Schifter Secora y al Ing. Luis Díaz Gutiérrez por su confianza y energía que imprimieron en mi determinación.
- Al Quím. Máximo Castillo Flores por su motivación y aportaciones en el asesoramiento y revisión de este trabajo.
- A la Dra. Sandra Gómez Arroyo por sus valiosas observaciones y sugerencias a lo largo de la investigación.
- Al Quím. Omar Amador Muñoz por su apoyo técnico, en la revisión de resultados y en la redacción de la tesis.
- A la QFB. Patricia Cerón Bautista por sus valiosas observaciones y sugerencias químico-biológicas en la revisión de este trabajo.
- A Biol. Carmen Ramírez y Dra. Pilar Bremauntz por haberme dado las facilidades para utilizar sus laboratorios.
- A Emma Bueno, Felipe Ramos y Carlos Franco por haber donado la sangre para la realización de este estudio.
- A Liliana Ramírez por ser una gran compañera y amiga.
- A todos mis compañeros, amigos de laboratorio de Motoquímica I y II por brindarme una palabra de aliento para mí todos los días ofreciendo su amistad y apoyo incondicional.
- Al Instituto Mexicano del Petróleo y el Programa de Titulación por proporcionarme la beca para la realización de esta tesis.
- Al Centro de Ciencias de la Atmósfera. Laboratorio de Citogenética, por permitirme desarrollar este trabajo y proporcionarme el apoyo necesario para el mismo.
- A quienes de una u otra forma contribuyeron en el desarrollo del presente trabajo.

INDICE

RESUMEN	V
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	6
2. 1 Propiedades físicas y químicas de los hidrocarburos	6
2.1.2 Alifáticos	7
2.1.3 Alcanos	7
2.1.4 Alquenos	8
2.1.5 Alquinos	8
2.1.6 Cíclicos o Alicíclicos	8
2.1.7 Aromáticos	8
2.1.8 Arenos	9
2.1.9 Aromáticos polinucleares o policíclicos	9
2. 2 Efectos toxicológicos causados por hidrocarburos volátiles	9
2.2.1 Benceno	10
2.2.2 1,3-butadieno	12
2.2.3 Tolueno	12
2.2.4 Xilenos	13
2.2.5 n-hexano	14
2.2.6 n-heptano	14
2.3 Mutagenicidad en animales expuestos a vapores de gasolina	15
2.3.1 Mutagenicidad en bacterias y en cultivos celulares	16
2.3.2 Mutagenicidad en humanos	17
2.3.3 Mutagenicidad en otros organismos	18

3.1	Técnica de análisis de emisiones vehiculares	19
3.1.1	Especiación de hidrocarburos	23
3.1.2	Técnica de intercambio de cromátidas hermanas	26
3.1.3	Modelos propuestos para explicar la formación de ICH	29
3.1.3.1	Modelo de Holliday	29
3.1.3.2	Modelo de Shafer	31
3.1.3.3	Modelo de Detour	33
3.1.3.4	Modelo de Painter	34
3.1.4	Cinética de proliferación celular, índice mitótico y de replicación	36
III.	OBJETIVOS	38
IV.	MATERIALES Y METODOS	39
4.1.1	Sistema de muestreo	40
4.1.2	Procedimiento de preparación de la resina	41
4.1.3	Procedimiento de extracción de hidrocarburos	41
4.1.4	Análisis químico	42
4.1.5	Cultivo de linfocitos	42
4.1.6	Cosecha de linfocitos y tinción diferencial	43
4.1.7	Análisis de los intercambios de cromátidas hermanas	43
4.1.8	Cálculo de cinética de proliferación celular (CPC)	44
4.1.9	Cálculo del índice de replicación	44
4.1.10	Cálculo del índice mitótico	44
4.2	Análisis estadístico	44
V	RESULTADOS	45
VI	DISCUSION	60
VII	CONCLUSIONES	64
VIII	REFERENCIAS	65
IX	ANEXOS	81

RESUMEN

Las emisiones vehiculares son mezclas complejas de compuestos que contienen agentes genotóxicos a los que está expuesta la población y que pueden ser considerados como un riesgo para la salud. El primer paso para la investigación de estas emisiones es la identificación de químicos que pudieran estar relacionados con mutagenicidad o carcinogenicidad. Uno de los métodos utilizados es el uso de bioensayos, con los que se han obtenido resultados satisfactorios. Sin embargo, ha sido difícil la caracterización química de los compuestos que se aplican a los diferentes sistemas biológicos de prueba para determinar su genotoxicidad. Por tal motivo, en este trabajo se pretende aportar una nueva técnica para la obtención de los hidrocarburos en la fase gaseosa de las emisiones de la combustión de la gasolina por medio de un copolímero adsorbente, su extracción a través de sonicación, su especiación por cromatografía de gases y por último la verificación de los efectos genotóxicos utilizando un sistema biológico de prueba como es el intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en cultivo de linfocitos humanos, así como en la cinética de proliferación celular y los índices de replicación y mitótico.

El análisis cromatográfico de la emisión de la combustión de la gasolina evidenció compuestos como aromáticos, parafinas, isoparafinas, naftenos y olefinas. Mediante el análisis de intercambio de cromátidas hermanas se evaluó el efecto de la mezcla total (2.3 µg/ml) y de 5 concentraciones (0.5, 0.7, 0.9, 1.0 y 2.3 µg/ml) a partir de ella, aplicados durante 2 horas a los cultivos de linfocitos. Los resultados observados no mostraron incremento significativo en las frecuencias de ICH. Sin embargo, con respecto a la cinética de proliferación celular se manifestaron diferencias significativas en todas las concentraciones, debido a que las proporciones de metafases de primera división fueron mayores que las halladas en el testigo. En el caso del índice de replicación solo en la máxima concentración se observaron diferencias estadísticamente significativas. No siendo así para el índice mitótico en donde todas las concentraciones de los hidrocarburos indujeron citotoxicidad.

I. INTRODUCCION

Actualmente se ha considerado que uno de los problemas ambientales más importantes lo constituye la presencia de enormes y variadas cantidades de productos químicos naturales y sintéticos en el ambiente, que se ha agudizado con el crecimiento de las ciudades, la urbanización y el desarrollo industrial de las mismas. Cada día de trabajo, en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM) aproximadamente 20 millones de personas están expuestas a contaminantes tóxicos dentro de la atmósfera y la mayoría de estos compuestos son de efecto desconocido para la salud de la población (Sans 1996) . Esta es una de las grandes urbes mundiales más contaminadas y sin duda alguna la problemática que atrae la atención de la sociedad es la contaminación del aire, derivado principalmente de los siguientes sucesos:

1. El parque vehicular de la Ciudad de México consta aproximadamente de 3 millones de vehículos automotores y por ende existe un elevado consumo de combustibles de alrededor de 20 millones de litros diarios de gasolinas sin considerar diesel y gas L. P. (DDF 1995).
2. El crecimiento demográfico en los últimos 25 años en la ZMCM, concentra la quinta parte de la población total del país (20 millones de habitantes), en una superficie de 240 km², esto se debe principalmente a la migración de personas del campo y de las pequeñas comunidades hacia este lugar (SEDESOL /INE 1991-1992).
3. Las condiciones climatológicas y topográficas de la ZMCM que dificultan la dispersión de contaminantes atmosféricos ya que se encuentra rodeada de montañas (Ajusco, Chinchinautzin, Las Cruces, Santa Catarina, Guadalupe), que constituyen una barrera natural. Asimismo, la altura de 2,240 metros sobre el nivel del mar en que está asentada, reduce la eficiencia de los procesos de combustión derivado del enrarecimiento del aire y de la poca cantidad de oxígeno (Sociedad Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental A. C. 1994).
4. La gran concentración de empresas e industrias generadoras de bienes y servicios, que contribuyen con 26% de las emisiones a la atmósfera (DDF 1995).

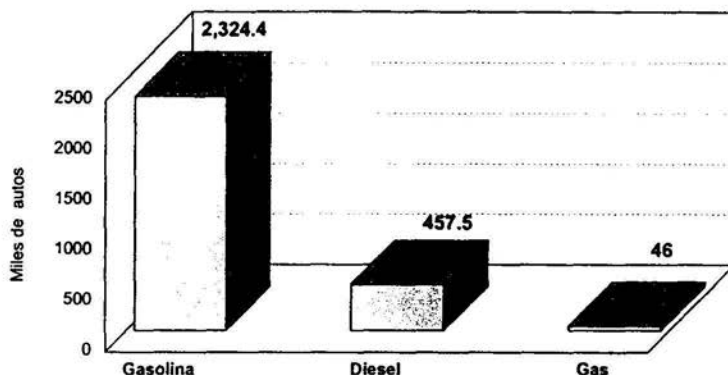
Se calcula que entre el 75 y el 85 % de los contaminantes atmosféricos de la ZMCM es producido por los autos, el 15% por las industrias y el 5% por tolvaneras y desechos orgánicos, de ahí que exista una deficiente calidad del aire provocada por los mismos (Quadri *et al.* . 1992).

Las emisiones de los motores que queman gasolina o diesel hacia la atmósfera para su funcionamiento, incluyen compuestos como monóxido de carbono, óxidos de azufre y de nitrógeno, hidrocarburos no quemados (parafinas, olefinas, aromáticos), hidrocarburos parcialmente quemados (aldehidos, cetonas, ácidos orgánicos), productos de craqueo térmico y de desintegración (acetileno, etileno, hidrógeno, hollín e hidrocarburos policíclicos) (Strauss 1990).

La gasolina y el diesel son derivados del petróleo y entre otros, se utilizan en motores de combustión interna, están formados por mezclas complejas de hidrocarburos parafínicos, olefínicos, nafténicos y aromáticos, compuestos cuyas moléculas están constituidas principalmente por átomos de hidrógeno y carbono (Rojas y Padilla 1996). Estos combustibles son producidos por un proceso de refinación que consta de varios procesos, tales como destilación, craqueo, polimerización, reformado, hidrogenación, alquilación e hidrosulfuración entre los principales (Baumeister *et al.* 1984, Restrepo 1992).

La gasolina y el diesel no se producen mediante una estricta fórmula de composición a causa de la diversidad de moléculas que la integran, así como también por las compañías y regiones geográficas donde se elaboran, sin embargo deben cumplir con ciertas especificaciones, respecto a las siguientes características: poder calorífico, volatilidad, presión de vapor, inflamabilidad, calor latente de vaporización, densidad y comportamiento respecto a la combustión (número de octano, número de cetano), entre otros (Baumeister *et al.* 1984).

Por otra parte, la distribución por el tipo de combustible que consume el parque vehicular en la ZMCM, indica que aproximadamente el 96.7% de los vehículos utilizan gasolina (Fig. 1).



Dirección de Ecología, DDF, 1994

Fig. 1 Distribución del Parque Vehicular por el tipo de Combustible

La comercialización de combustibles permite generar bienestar social, empleos, transporte, servicios, energía y otras comodidades, sin embargo, su combustión genera aproximadamente el 95% de las emisiones contaminantes en la ZMCM.

En teoría, en una "máquina vehicular perfecta", el oxígeno del aire podría convertir todo el hidrógeno del combustible en agua y todo el carbono en dióxido de carbono, pero en realidad el proceso de combustión es imperfecto y las máquinas de los automóviles emiten los diferentes contaminantes mencionados (Pennsylvania DEP 1996). Se ha comprobado que algunos de estos compuestos son formados durante la combustión incompleta de los humos de escape de los vehículos y se liberan en forma gaseosa (OECD 1995).

Los motores a gasolina son los causantes de los más altos índices de emisión de CO₂, óxidos de nitrógeno (NO_x) e hidrocarburos (HC) principalmente, estos últimos con cerca de 555,319 toneladas anuales (Espinosa *et al.* 1996, Tabla 1). La eficiencia de combustión es considerablemente inferior en este caso, ya que con la altura de la

ZMCM el nivel de oxígeno por unidad de volumen es sensiblemente menor al que se encuentra a nivel del mar (Navarrete 1992). Al hacer la comparación, a 2240 msnm, 1 m³ de aire contiene 212 g de O₂ y a nivel del mar en el mismo volumen hay 275 g de O₂, lo que determina la eficiencia de combustión, ya que si un auto está bien afinado al nivel del mar tiene una eficiencia del 92% y a la altura de la ZMCM será del 69%. Esta comparación conduce a establecer que los 3'000,734 vehículos que circulan en la ZMCM, liberan una cantidad de contaminantes similar a la que emitirían 6.3 millones de vehículos a nivel del mar (Navarrete 1992, Dirección General de Prevención y Control de la Contaminación 1996).

TABLA I. ESTADÍSTICAS DE EMISIONES CONTAMINANTES (TON/AÑO)
ARROJADAS A LA ATMOSFERA POR FUENTES MOVILES

TRANSPORTE	Número	NOx	HC	CO
Auto particular	2'391.873	31,913.00	253,865.70	1,044,008.00
Pick-up	-	2,675.30	19,373.64	73,419.40
Microbús	51,466	9,395.70	66,472.89	224,077.60
Combi	-	4,918.00	35,108.70	134,954.00
Taxi	-	15,982.00	126,574.80	529,530.00
Autobús (R-100)	85,000	6,751.30	2,337.20	5,655.00
Foráneos-suburbanos	3,649	2,485.60	2,055.10	57,332.70
De carga	-	5,867.60	46,099.68	271,321.10
De carga (más de 2 ejes)	-	7,204.00	2,079.50	4,735.80
Autobús Municipal	-	2,591.40	781.60	1,777.70
Locomotoras	-	414.00	16.84	50.52
Locomotoras de patio	-	293.96	29.59	52.12
Aeropuerto	-	1,294.89	523.43	1,583.23
TOTAL	3'000,734	91,786.75	555,318.67	2'348,497.17

Datos oficiales del Programa para Mejorar la Calidad del Aire en el Valle de México, 1995-2000. Departamento del Distrito Federal, Subdirección General de Ecología, Dirección de Estudios y Proyectos Ambientales, 1997.

- No existen datos oficiales

Los hidrocarburos aromáticos polinucleares (HAP's) son algunos de los componentes que contienen las emisiones vehiculares que se han relacionado con el potencial carcinogénico (Hermann 1981, Phillipson 1989, Hatjian *et al.* 1995). Sin embargo, existen otras sustancias gaseosas a temperatura ambiente como olefinas,

aromáticos, parafinas y naftenos, que han mostrado efectos adversos sobre la salud, aunque se ha reportado que los hidrocarburos alifáticos no presentan efectos genotóxicos en diferentes pruebas biológicas (Stenberg *et al.* 1983, Alsberg y Stenberg 1985, IARC 1989, Raabe 1993).

Como producto de la combustión llevada a cabo en automotores se generan contaminantes particulados y gaseosos, los primeros pueden formar cúmulos con diámetros de 0.05 a 30 μm hasta mayores como el hollín (Rojas y Padilla 1996). Los segundos se presentan debido a sus altas presiones de vapor. Generalmente, para el análisis químico y genotóxico las emisiones de un motor se dividen en estas dos fases (Hampton *et al.* 1983, Cheng *et al.* 1984, Payri *et al.* 1992).

Por otro lado, se han descrito efectos indeseables con las emisiones de gasolina, por ejemplo, tumores en roedores, cáncer de piel, inflamación, neumonía, enfisemas, alteraciones pulmonares, adenomas y carcinomas (Campbell 1936, Hyde *et al.* 1978, Roggendorf *et al.* 1981, Lewtas 1983, Busey y Cokrell 1984).

En México, se ha estudiado más la fase particulada que la de vapor en emisiones vehiculares debido a la disposición del equipo y al bajo costo del sistema de muestreo (Payri *et al.* 1992, Riveros 1992, González 1993, 1995). Sin embargo, ha sido difícil la caracterización química de los compuestos que se aplican a los diferentes sistemas biológicos de prueba para determinar su genotoxicidad. Por tal motivo, en este trabajo se pretende aportar una nueva técnica para la obtención y extracción de los hidrocarburos en la fase de gas de las emisiones de gasolina por medio de un copolímero adsorbente, su extracción a través de un ultrasonido y su especiación por cromatografía de gases, utilizando el método APION (aromáticos, parafinas, isoparafinas, olefinas y nafténicos) patente del IMP (Instituto Mexicano del Petróleo) y por último verificar si esta mezcla tiene efectos genotóxicos utilizando un sistema biológico de prueba como es el ICH en los linfocitos humanos en cultivo.

II . ANTECEDENTES

2.1 Propiedades físicas y químicas de los hidrocarburos

El término hidrocarburo se refiere a los compuestos formados exclusivamente por átomos de carbono e hidrógeno. A partir del gas natural, del petróleo y del carbón se obtienen numerosos compuestos orgánicos constituidos por carbono. Son la materia básica para muchos productos químicos que han afectado profundamente la vida del hombre del siglo veinte. A pesar de su composición simple y elemental los hidrocarburos muestran una extraordinaria variedad en estructura y comportamiento. Son generados por la combustión incompleta de automóviles, por evaporación de combustibles y de disolventes industriales. Algunos contribuyen a la formación de ozono y otros son sospechosos de ser cancerígenos como los aromáticos policíclicos (HAP) (Hermann 1981, Brorstron *et al.* 1983, Phillipson y Ioannides 1989, Hatjian *et al.* 1995), presentes entre otras emisiones, en la gasolina con plomo y diesel, este último con nitroderivados (NHAP). Según la estructura de la cadena se dividen en (Fig. 2): hidrocarburos de cadena abierta (alifáticos) e hidrocarburos de cadena cerrada (alicíclicos, aromáticos) (Reusch 1981).

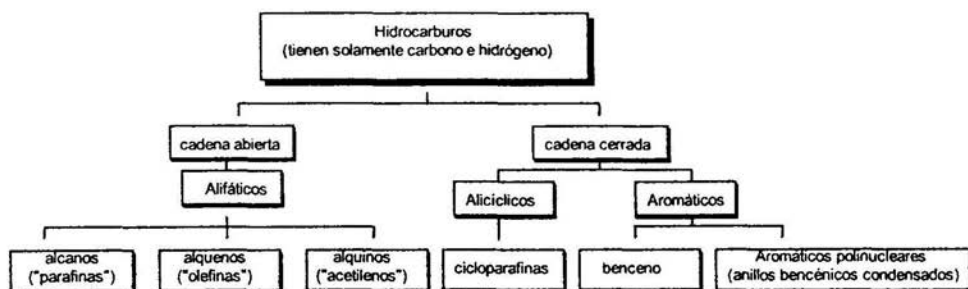


Fig.2 Clasificación general de los hidrocarburos

2.1.2 ALIFÁTICOS

Se componen de cadenas continuas o ramificadas de átomos de carbono combinados con suficientes átomos de hidrógeno para satisfacer la tetravalencia del carbono y en las que no existen estructuras cíclicas (Reusch 1981).

2.1.3 ALCANOS

Son de enlace simple. También se conocen como parafinas o hidrocarburos saturados. Tienen como fórmula general C_nH_{2n+2} . Son relativamente estables frente a las reacciones químicas y muy pocas sustancias reaccionan con los alcanos, es por esto que se les llama parafinas o hidrocarburos parafinicos (del latin "parum affinus", que significa "poca afinidad"). Las parafinas son de cadena no ramificada, que tienen mayor autoinflamación cuanto más larga es la cadena, por ejemplo: metano CH_4 y n-heptano C_7H_{16} ; dentro de estas se encuentran las isoparafinas que son de cadena ramificada. Son menos inflamables que las parafinas normales, por ejemplo: iso-octano (2,2,4-trimetilpentano C_8H_{18}). En general se utilizan como disolventes inertes. Los alcanos de bajo peso molecular son gases y líquidos, mientras que los de elevado son sólidos. Son sustancias no polares, insolubles en agua y con densidades menores a 1.0 g/ml. Los alcanos con más de tres carbonos pueden existir como isómeros estructurales. El origen principal de los alcanos es el petróleo y su mayor uso es como fuente de energía al realizarse su combustión. La mayoría de los combustibles que comúnmente se emplean son el gas natural, la gasolina, el queroseno y el diesel, están constituidos de hidrocarburos que contienen mezclas de alcanos cuya longitud de cadena es similar pero variable. Las mezclas de alcanos son perfectamente adecuadas para combustibles y la separación del petróleo en alcanos individuales es innecesaria. Esto es una gran ventaja porque dicha separación es sumamente difícil. Los puntos de ebullición de muchos compuestos del petróleo son tan cercanos que casi es imposible hacer una separación completa (Solomons 1982).

2.1.4 ALQUENOS

Poseen dobles enlaces entre carbonos, su fórmula general es C_nH_{2n} . Pueden ser no ramificados (n-) o ramificados (iso-). A menudo se les denomina olefinas. El etileno, el alqueno más simple se le llamó gas olefiante (latín : oleum, aceite + facere, hacer) porque el etileno gaseoso (C_2H_4) reacciona con cloro para formar $C_2H_4Cl_2$, un líquido aceitoso. Las n-olefinas son menos autoinflamables que las n-parafinas. A mayor número de carbonos, mayor autoinflamabilidad. Los alquenos de bajo peso molecular son gases no polares e insolubles en agua. El doble enlace permite realizar muchas reacciones importantes como cloración e hidrogenación. Algunos ejemplos son: eteno, propeno, 1-buteno, 2-hexeno, etc. (Morrison y Boyd 1994).

2.1.5 ALQUINOS

Hidrocarburos insaturados con uno o más triples enlaces de carbono. Fórmula general C_nH_{2n-2} . Con frecuencia se denominan acetilenos. Las propiedades físicas son similares a la de los alquenos correspondientes. Sufren reacciones de adición como los alquenos. Ejemplos: etino, propino, acetileno y alileno, etc. (Holum 1986).

2.1.6 CICLICOS O ALICICLICOS

Contienen cadenas simples de carbono, cada una de ellas unida a las adyacentes para formar uno o varios anillos, pero no del tipo bencénico. También se denominan naftenos. Tienen menor tendencia a la autoinflamación que las n-parafinas y mayor que las isoparafinas con igual número de carbonos. Se comportan de igual manera que sus alcanos correspondientes, experimentando reacciones de sustitución y/o adición; ejemplos: ciclopropano, ciclobutano, ciclopentano y metilciclopentano. (Morrison y Boyd 1994).

2.1.7 AROMATICOS

Son hidrocarburos de cadena cerrada con un tipo especial de anillo, en los cuales alternan enlaces sencillos y dobles. A esta capacidad excepcional de los átomos de carbono de unirse entre sí en una gran variedad de sistemas se debe la enorme cantidad de sustancias orgánicas conocidas. Se caracterizan por la gran estabilidad de su núcleo aromático, son parte fundamental de las gasolinas. Presentan menor

tendencia a la autoinflamación que otros compuestos y tienen un alto número de octano. Representan el 20% de los hidrocarburos sin quemar en el escape de motores a gasolina. Algunos de ellos son: benceno, tolueno, etilbenceno, xilenos, etc. (Reusch 1981).

2.1.8 ARENOS

Hidrocarburos que contienen unidades tanto alifáticas como aromáticas. Tienen reacciones en la cadena lateral y en los anillos bencénicos. Se clasifican en: alquilbencenos (alcanos y aromáticos), alquenilbencenos (alquenos y aromáticos) y alquinilbencenos (alquinos y aromáticos) (Holum 1986) .

2.1.9 AROMATICOS POLINUCLEARES O POLICICLICOS

Estos compuestos constan de diversas estructuras de anillos bencénicos fusionados o con ciclopentadieno, por ello presentan propiedades aromáticas; algunos de ellos son naftaleno, antraceno y fenantreno (Holum 1986).

2.2 Efectos tóxicos causados por los hidrocarburos volátiles

Los efectos clínicos específicos y la severidad asociada a ellos dependen de las propiedades físicas y químicas de los hidrocarburos individuales y en mezclas, además de la concentración y el tiempo de exposición. En general, su alta volatilidad, provoca un riesgo mayor de aspiración y toxicidad pulmonar (Kuling y Rumack 1981).

Los hidrocarburos más estudiados individualmente por su toxicidad y que se encuentran en las emisiones vehiculares son benceno, tolueno, 1,3- butadieno y los xilenos (orto- meta- para-), entre otros (Mehlman 1992, Simons 1995). Actualmente, la EPA/USA (1994), tiene registrados estos compuestos como los más tóxicos en el aire, en donde el benceno y el 1,3-butadieno ocupan los primeros lugares de la lista.

En estudios epidemiológicos con benceno, tolueno y 1,3-butadieno, se ha demostrado que son los causantes de leucemia y otros daños en el tejido sanguíneo (Brandt *et al.* 1978, Gerner- Smidt y Friedrich 1978, Flemming 1990, Infante *et al.* 1990). Estos también producen alteraciones al sistema nervioso central, dolor de cabeza, irritación de ojos, euforia, pupilas dilatadas, convulsiones, narcosis y hasta la muerte (ASTDR 1993). Sin embargo, el problema más grave es que además de su actividad tóxica, algunos de ellos están considerados por la EPA/USA (1990) como carcinógenos, debido a que son capaces de alterar el material genético, originando cambios (mutaciones), que pueden heredarse o llevar a diferentes respuestas orgánicas, como desarrollo de diversos tipos de cáncer, alteraciones reproductoras y malformaciones (Tice *et al.* 1987). De acuerdo con la EPA/USA (1990) las fuentes móviles pueden ser responsables del 54% al 58% de los casos de cáncer asociados con contaminantes tóxicos del aire en los EUA (OECD 1995).

Se ha comprobado que los compuestos químicos emitidos por los automóviles provocan acciones adversas en los organismos; en el ser humano producen dolor de cabeza, irritación de ojos, pupilas dilatadas, convulsiones, narcosis, etc. (ASTDR 1993).

La gasolina, es uno de los derivados más volátiles del petróleo, su contacto puede ocasionar dolor en los ojos, irritación de la córnea (Sandmark *et al.* 1989), degeneración crónica del cerebelo por la presencia de los aditivos del plomo (Young *et al.* 1977), arritmia cardiaca (Reese y Kimbrough 1993) y muerte súbita por inhalación excesiva (Anderson *et al.* 1985).

2.2.1 BENCENO

Es un componente importante de la gasolina, sustituto para la disminución del plomo en la misma, se encuentra en las emisiones de los escapes y en las que provienen del depósito del combustible y del carburador (evaporativas). Su fórmula molecular es C_6H_6 , con peso molecular es 78.11 g/mol, temperatura de ebullición de 80 °C, presión de vapor de 100 mm Hg a 26.1 °C y temperatura de inflamación de -11 °C (Budavari 1989). De acuerdo con la USEPA (1994) el 90% de las emisiones de

benceno hacia la atmósfera, son provenientes de vehículos (Sigh 1992, OECD 1995) y se considera que muchas personas se exponen diariamente a una cantidad pequeña del mismo (ASTDR 1993). En su mayoría, el benceno se pierde en el ambiente en forma de vapor y tiende a dividirse en el aire mediante la fotodegradación con vida media de una semana. En cambio en el agua y en el suelo, bajo condiciones aerobias permanece de 10 a 20 días. Por el contrario, en situación anaeróbica persiste a la degradación por lo que puede estar presente por muchos años (Paustenbach *et al.* 1993).

La IARC (Internacional Agency for Research on Cancer 1989) y la WHO (World Health Organization 1987) lo han considerado como un carcinógeno del grupo 1, lo que significa que existe suficiente evidencia científica para probar una relación positiva entre la exposición al agente tóxico y el desarrollo del cáncer, en animales y humanos (Melhman 1992, Reese y Kimbrought 1993, Snyder y Kalf 1994)

En estudios con animales se ha demostrado que el benceno causa tumores en ratas y ratones incluyendo linfomas, neoplasia hemolinforreticular, todo tipo de leucemias, cáncer de glándula zimbál, cavidad oral, pulmón, piel, cavidad nasal, estómago, glándula mamaria, ovarios y útero (Maltoni 1983, Maltoni y Conti 1985, 1987, Huff *et al.* 1989).

En Italia, el profesor Cesare Maltoni de la Fundación de Oncología y Ambiente, ha dirigido estudios mostrando que el cáncer está vinculado a sustancias a partir de emisiones vehiculares y también que el benceno es un poderoso carcinógeno que puede causar diferentes tipos de cáncer, particularmente leucemia en humanos (Simons 1995).

Infante y White (1985) calcularon las muertes por leucemia de trabajadores en contacto con benceno de 4 a 25 por cada 1000, dependientes del nivel y de la duración de la exposición.

Otras organizaciones han realizado estudios epidemiológicos en trabajadores expuestos al benceno, en donde se observaron altos niveles de leucemia (WHO/Euro 1987, Simons 1995). Dosis mayores de 400 ppm pueden causar leucemia (Brief 1980).

2.2.2 1,3- BUTADIENO

Su fórmula química es C_4H_6 , su peso molecular 54.09 g/mol, su temperatura de ebullición 15.3 °C y su presión de vapor 1840 mm Hg a 21 °C. En 1992, la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Muertes (ATDR) concluye que el 1,3-butadieno es el agente tóxico más peligroso (en términos de cáncer) en el aire emitido por motores vehiculares que al ser respirado puede ser altamente carcinogénico y posiblemente responsable de síntomas como náuseas, fatiga, dolor de cabeza, incluyendo genotoxicidad, cáncer de hígado y leucemia. De acuerdo con la EPA/USA'93, el 94% de las emisiones de 1,3-butadieno provienen de los vehículos (OECD 1995). Más importante todavía es el hecho de que además de ser un poderoso carcinógeno, es el componente con mayor reactividad fotoquímica en la formación de ozono (Simons 1995).

La EPA/USA'94 menciona que para el año 2010, el 1,3-butadieno puede ser el responsable de más del 70% de todos los casos relacionados con emisiones contaminantes del aire tóxico proveniente de vehículos de motor. Por ello la Agencia para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades ASTDR (1993) y el Instituto Nacional de la Administración de la Salud han establecido que el límite de exposición son 1,000 ppm en el aire.

2.2.3 TOLUENO

La fórmula molecular es C_7H_8 , su peso es 92.14 g/mol, su temperatura de ebullición es de 110.62 °C, y de inflamación es de 4.4 °C, su presión de vapor es de 22 mm Hg a 20 °C, la ingestión o inhalación afecta severamente al sistema nervioso central y en concentraciones altas, puede actuar como un narcótico. Los efectos en el sistema nervioso central son dolor de cabeza, vértigo, intoxicación e irritación de ojos cuando se inhalan 100 ppm de tolueno 6 horas/día durante 4 días (EPA/USA 1994).

En la exposición a 600 ppm se observan los mismos resultados o incluso más serios como euforia, pupilas dilatadas, convulsiones y náuseas (EPA/USA 1994). Pero con 10,000 a 30,000 ppm se produce narcosis y muerte (US Air Force 1989). El tolueno también puede causar daño por absorción en la piel, provocando dermatitis (Faust 1994).

Los efectos pueden ocurrir cuando las personas utilizan gasolina y otros compuestos que contienen tolueno para realizar reparaciones a sus vehículos u otras actividades (EPA/USA 1994). Sus efectos en la salud humana y en el ambiente dependen de la cantidad, la presencia y la frecuencia de exposición. El tolueno puede contribuir a la formación de ozono, cuando reacciona con otros compuestos orgánicos o sustancias en el aire.

2.2.4 XILENOS

La fórmula molecular del xileno es C_8H_{10} , su peso es 106.17 g/mol, sus temperaturas de ebullición e inflamación son de 138.3°C y de 25 a 27°C, respectivamente y su presión de vapor es de 6 mm Hg a 20 °C. Existen tres formas de xileno: orto-, meta- y para- (Reese y Kimbrough 1993). Son químicamente similares al benceno y como éste, son adicionados a la gasolina para incrementar el octanaje (Pennsylvania Department of Environmental Protection 1996).

Al igual que los otros compuestos puede producir una variedad de síntomas en el humano desde irritación de la garganta, ataques epilépticos, amnesia, hemorragia cerebral e inconsciencia hasta la asfixia. El contacto con la piel causa sensación de ardor y la exposición prolongada dermatitis. La absorción pulmonar es muy rápida y la retención está calculada en 50 a 70%. El ejercicio físico podría incrementar esta absorción (Reese y Kimbrough 1993).

2.2.5 n-HEXANO

Su fórmula es C_6H_{14} y se ha considerado como uno de los alcanos más tóxicos. Se extrae del gas natural y del petróleo y se utiliza básicamente como disolvente industrial. Tiene peso molecular de 86.17 g/mol, punto de ebullición de 68.74°C y de fusión de -95.34°C (Sandmeyer y Kirwin 1981). En el hombre hay graves efectos sobre el sistema nervioso central ya que actúa como anestésico; por ingestión causa náusea, vértigo e irritaciones bronquial e intestinal y dosis de 50 g pueden provocar la muerte. La dosis letal media (LD_{50}) por administración bucal en ratas es de 24 a 49 ml/kg. La exposición crónica produce polineuropatía en trabajadores de la industria y se ha observado que en inhaladores hay pérdida de axones y nervios terminales (Sandmeyer y Kirwin 1981). El límite recomendado para la exposición ocupacional es de 100 ppm (Sax 1980). Ha sido probado en una planta, *Vicia faba* donde induce aberraciones de tipo S-independiente, anafases multipolares, cromosomas con centrómero inactivado y micronúcleos (Gómez- Arroyo *et al.* 1986).

2.2.6 n-HEPTANO

El C_7H_{16} , es un líquido inflamable e incoloro que se aísla del gas natural y del petróleo, su peso molecular es de 100.20 g/mol, su punto de ebullición de 98.43 °C y el de fusión de -90.61°C; al igual que el n-hexano, es insoluble en agua. Fisiológicamente es más activo que el anterior, provocando paro respiratorio a concentraciones de 4.8 %, así como vértigo, incapacidad de mantener el equilibrio, incoordinación motora, irritación de las mucosas, náusea y laxitud a concentraciones menores (Sandmeyer y Kirwin 1981). Es narcótico y sensibilizador cardíaco. La concentración límite para una jornada de 8 horas es de 85 ppm. Respecto a sus efectos genéticos, se ha probado en *Vicia faba* donde causa aberraciones de tipo S-independiente, así como daño al centrómero y al huso acromático (Dávila 1981, Gómez- Arroyo *et al.* 1986).

2.3 Mutagenicidad en animales expuestos a vapores de gasolina

Campbell (1936) fue el primero en exponer ratones a las emisiones de gasolina, provocándoles tumores en el pulmón. Kotin y Falk (1954) observaron cáncer de piel en ratones que estuvieron en contacto con emisiones de la fase particulada de la combustión de la gasolina. Hyde *et al.* (1978) notaron alteraciones pulmonares en perros.

Roggendorf *et al.* (1981) aplicaron vapores de gasolina diluidos durante 18 meses a ratas observando inflamación, neumonía y enfisemas que se atribuyeron a infecciones, sin aparecer tumores.

En investigaciones similares con ratas y ratones B6C3F sometidas a gasolina vaporizada durante dos años, se encontraron frecuencias significativas de tumores, adenomas y carcinomas, con una relación de concentración-respuesta (Busey y Cockrell 1984, Kitchen 1984, MacFarland 1984).

Lewtas (1983) hizo estudios para evaluar efectos acerca del aumento o de la disminución de mutagenicidad, cambiando las condiciones de un vehículo que pudieran alterar este factor, como el combustible, la máquina, el ciclo de manejo, la temperatura ambiental, el convertidor catalítico, etc. Los resultados mostraron que la respuesta de mutagenicidad fue dependiente de la máquina y del combustible empleado. En otros trabajos, la misma autora demostró que con la fase particulada de las emisiones de gasolina sólo se manifestó inducción mutagénica sin activación metabólica en células de linfoma de ratones *in vitro*.

2.3.1 Mutagenicidad en bacterias y en cultivos celulares

Es sabido que las emisiones de la combustión de la gasolina y del diesel contienen en cualquiera de las dos fases (particulada o gas) una variedad de agentes mutagénicos y carcinogénicos (IARC 1989), que se han estudiado para tratar de encontrar los factores de riesgo hacia la salud.

Para la investigación de la fase particulada, se han realizado algunos trabajos con emisiones de la combustión de gasolina y diesel, colectándose en filtros Palflex y extrayéndose con un sistema Soxhlet y diclorometano por varias horas, posteriormente este crudo se fracciona y se aplica a diferentes tipos de bioensayos: *Salmonella typhimurium* TA100 con y sin activación metabólica (+S9 ó -S9), un complejo enzimático que metaboliza algunas sustancias, prueba de citotoxicidad en macrófagos alveolares (PMA) e inducción con 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), encontrando que todos los extractos crudos de partículas indujeron mutaciones en todos los sistemas. Con *Salmonella typhimurium* provocaron más del 60% de mutagenicidad en ausencia de la fracción S9 (Aldsberg y Stenberg 1985).

Crebelli *et al.* (1991) con el mismo tipo de extracción para las emisiones de diesel y gasolina lo dividieron en 3 fracciones: ácida, básica y neutra, que aplicaron a 9 cepas de *Salmonella typhimurium* y sólo observaron resultados positivos en la fracción ácida (conteniendo nitroaromáticos y nitropirenos) que se incrementaron al agregar la activación metabólica (S9), con respecto al diesel, sin embargo, con la emisión de gasolina se apreció una moderada mutagenicidad directa en las tres partes, aunque no se lograron identificar las especies químicas que causaron estos resultados.

Lewtas (1983) utilizando el sistema de extracción Soxhlet para la fase particulada, aplicó los extractos durante 2 y 24 h con y sin el sistema de activación metabólica en linfocitos humanos. Los datos indicaron que, con activación metabólica, todas las muestras de emisiones de gasolina y diesel indujeron ICH y sin activación sólo las de diesel. Westerholm y Rannung (1988) utilizando 4 diferentes combustibles,

atraparon las fases de gas y de partícula. Para la primera, utilizaron la técnica de criogradiente, extrayendo con acetona y para la segunda, usaron filtros Palflex. Posteriormente aplicaron los extractos a *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100 con y sin activación metabólica y observaron efectos mutagénicos en todas las muestras, excepto una en ambas fases. Sin embargo, la fase de gas tuvo una acción mayor en TA100 sin activación.

Rannug (1983) obtuvo extractos de emisiones de diesel y gasolina de las fases particulada y gaseosa, esta última la atrapó por medio de condensadores/agua y CO₂/etanol utilizando un Soxhlet especial descrito por Stenberg *et al.* (1983) que posteriormente aplicó a *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, con y sin activación metabólica, observando claramente que la fase de gas contribuyó al efecto directo en TA98 con un 60% mientras que en TA100 varió del 60 al 90% y en presencia de S9 con 25 a 30% en TA98 y 20% para TA100.

Shiraishi *et al.* (1986) expusieron células de criceto chino V79 en cultivo a la fase de vapor con productos de tolueno que obtuvo con NO₂ durante 2 horas utilizando como fuente de almacenamiento una cámara de humo. Los resultados evidenciaron una frecuencia elevada de ICH sólo en la máxima concentración siendo 3.6 veces más alta que en el testigo. Salomaa *et al.* (1988) capturaron la fase particulada del humo del cigarrillo con filtros Palflex y la gaseosa utilizando un copolímero de adsorción (XAD-2). Los extractos de ambas fases fueron fraccionados en tres partes, ácida, neutra y básica y se aplicaron a linfocitos humanos y a *Salmonella typhimurium*. Los resultados fueron positivos en *Salmonella* con activación y para la prueba de ICH en linfocitos humanos *in vitro* sin activación metabólica.

2.3.2 Mutagenicidad en humanos

Las emisiones originadas por la combustión de gasolina y diesel contienen carcinógenos potenciales que causan daño en diferentes órganos y especialmente en el tracto respiratorio.

Uno de los primeros estudios fue realizado con trabajadores de líneas de ferrocarril expuestos a emisiones de la combustión del diesel, en donde se analizó el tiempo de exposición y los diversos padecimientos relacionados con cáncer de pulmón, y además se apreciaron algunos síntomas de daño pulmonar en los trabajadores en servicio activo (Holmberg y Ahlborg 1983).

Wong *et al.* (1993) llevaron a cabo un estudio con 18,135 empleados expuestos a emisiones de gasolina durante casi un año, en plataformas marinas y terrestres entre 1946 y 1985 para determinar la relación de mortalidad con respecto a cáncer de riñón y a leucemia. Los resultados de este estudio indicaron que no se incrementó la mortalidad en ninguna de las dos aún con varios índices de exposición a la gasolina.

Existe contradicción en la literatura sobre el incremento de ICH producidos por las emisiones vehiculares en linfocitos humanos periféricos. En policías expuestos a éstas durante 8 horas de trabajo por día en un período de 5 años, se describió una frecuencia alta de intercambios de cromátidas hermanas (Chandrasekaran *et al.* 1996). Por el contrario, en empleados de estaciones de gasolina y de una refinería no se encontraron diferencias significativas (Khalil *et al.* 1994, Pitarque *et al.* 1997).

2.3.3 Mutagenicidad en otros organismos

En cuanto a ensayos *in vivo*, Lewtas (1983), informó resultados positivos utilizando las pruebas de micronúcleos y mutaciones somáticas de pigmentación en los pelos estaminales de la planta *Tradescantia* y negativos en mutaciones recesivas ligadas al sexo en la mosca *Drosophila*.

3.1 Técnica de análisis de emisiones vehiculares

A través de las pruebas dinámicas se realiza la evaluación y cuantificación de emisiones contaminantes de escape de vehículos de combustión interna. Para efectuar una prueba dinámica, se utiliza una serie de equipos que cumplen con normas internacionales y nacionales como la norma oficial mexicana NMX-AA-II-1993 y por el Code of Federal Regulation Vol. 40 parte 86 de los Estados Unidos de América (denominado FTP-75). Los principales componentes del sistema FTP-75 son (Fig.3) :

1. Computadora de control y monitor indicador
2. Dinamómetro de chasis
3. Bolsas de muestreo (Tedlar)
4. Equipo de muestreo de gases a volumen constante (CVS)
5. Consola de analizadores (CO, CO₂, HC, O₂, NOx)

La función principal de cada uno de los equipos se describe a continuación:

1. Seleccionar la curva de recorrido para la evaluación y guiar al conductor
2. Soportar el vehículo y aplicar una carga que simula las condiciones reales de operación de éste
3. Recolectar durante la prueba una muestra representativa de gases de escape
4. Almacenar los gases de la emisión (generados durante la prueba) y aire ambiente
5. Analizar la concentración de cada uno de los contaminantes de escape

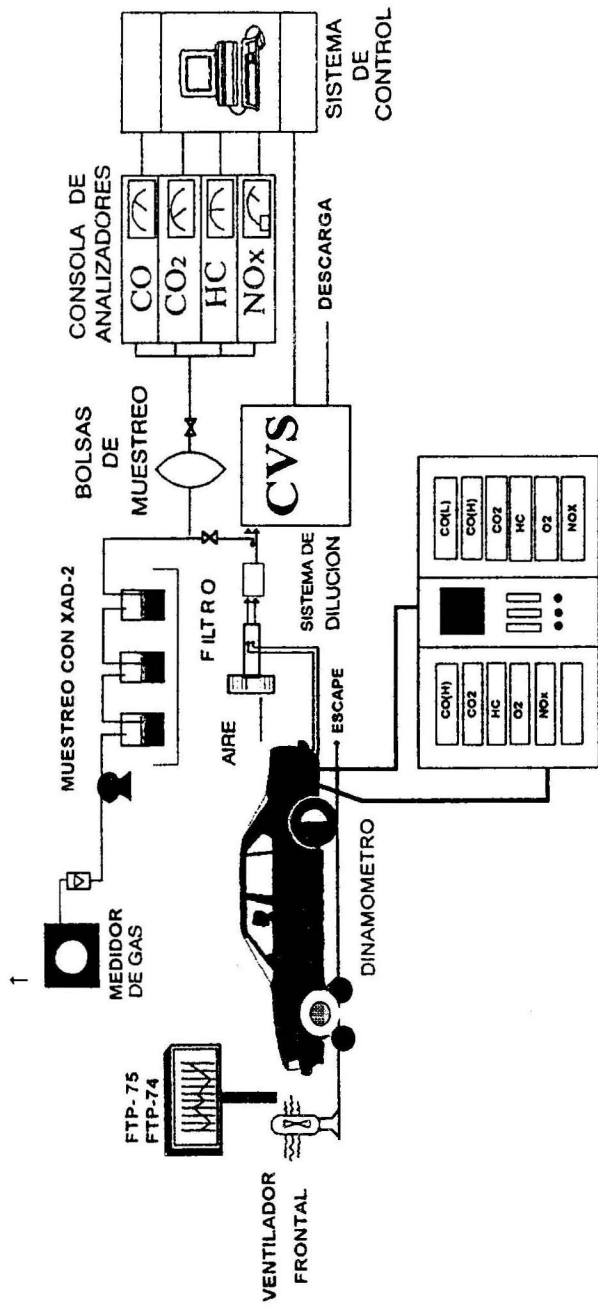


Fig. 3. Sistema de obtención de emisiones de escape. Laboratorio de Motoquimia II. IMP

La computadora de control tiene como propósito establecer la curva de recorrido al que debe someterse el vehículo automotor a un peso bruto vehicular establecido. Este sistema de recorrido tiene la posibilidad de seleccionar diez tipos de curvas, las cuales son:

TIPO DE CURVA	TIPO DE RECORRIDO
1. EPA-75 (FTP-75)	AMERICANO
2. EPA-74 (FTP-74)	AMERICANO
3. EPA-505	AMERICANO
4. HWFET	AMERICANO
5. JAPAN 10	JAPONES
6. JAPAN 11	JAPONES
7. ECE-COLD	EUROPEO
8. ECE-HOT	EUROPEO
9. ECE-FE	EUROPEO
10. IMP-30	NACIONAL

La curva EPA-75 fue adoptada por la NOM (NMX-AA-II 1993) que simula un recorrido típico en la ciudad, mediante el cual el vehículo es operado a distintas velocidades y rangos de aceleración y desaceleración lo que permite determinar conjuntamente las emisiones de escape (monóxido de carbono, hidrocarburos totales, óxidos de nitrógeno y bióxido de carbono, ya que se considera éste último como contaminante regulado, que sirve para calcular el rendimiento del combustible).

En cuanto a los dinamómetros, existen varios modelos: hidráulicos, de corrientes parásitas y directas, etc. Su aplicación depende de la precisión y versatilidad que posean. Los dinamómetros de chasis tienen una unidad de absorción de potencia para simular la masa inercial del vehículo y las condiciones de manejo, como por ejemplo, resistencia o fricción al movimiento en la carretera o en la ciudad. La masa inercial se considera, de acuerdo con la norma, como el peso del vehículo mas el peso de dos pasajeros o capacidad de carga (peso bruto vehicular).

El procedimiento de evaluación consiste en acondicionar el vehículo previamente sobre el dinamómetro de chasis a peso bruto vehicular siguiendo el trazo de la curva de recorrido (FTP-74/EPA-74), y posteriormente retirando el auto del dinamómetro se mantiene en reposo durante un mínimo de 12 h y un máximo de 36, una vez que el vehículo está listo, se monta sobre los rodillos del dinamómetro y se programa una carga inercial y de frenado. A partir de este momento se emplea la curva de recorrido (FTP-75/EPA) que simula el desplazamiento del vehículo, siguiendo un ciclo de manejo, con el que se traza una ruta de cruce que asemeja el recorrido vehicular en ciudad y en carretera. Para esto, el operador dispone de un monitor en el que sigue una trayectoria de velocidades variables y su habilidad de manejo permitirá que la prueba se realice dentro de los límites establecidos por la norma mencionada para que sea válida.

Durante la prueba el motor del vehículo aumenta su temperatura, por lo que para simular condiciones más reales se utiliza un ventilador para enfriamiento, colocándose frente al motor con el cofre abierto (Fig. 3). En este proceso, el vehículo emite gases contaminantes, que se analizan en el Sistema de Muestreo a Volumen Constante (CVS). Los gases de escape se diluyen con aire ambiente en una proporción aproximada de 1:10 antes de llegar al analizador a través de una bomba de desplazamiento positivo o de un extractor que recoge los gases emitidos por el vehículo. La capacidad de la bomba o del extractor se compensa con el aire que es succionado del ambiente, por lo tanto los gases se diluyen en proporciones variables, pero el caudal se mantiene constante. De estos gases diluidos se toman muestras en forma continua y se almacenan en bolsas de plástico teflonizadas (Tedlar).

El análisis de los gases se realiza con métodos establecidos por la norma NMX-AA-II-1993 en la cual se describe que los hidrocarburos deberán ser analizados con un detector de ionización de flama (FID); los NO_x se caracterizan con un detector de luminiscencia química (CLD) y los bióxidos y monóxidos de carbono se analizan con un detector de absorción no dispersiva de infrarrojos (NDIR).

Los analizadores, deben calibrarse y verificarse antes de cada prueba, para ello se utilizan gases de calibración con diferentes factores de dilución de acuerdo con la prueba que se realice con el equipo de muestreo CVS.

La prueba FTP-75 , consiste en manejar un total de 17.86 km con una duración de 41.3 min, la cual está dividida en tres etapas subsecuentes que son:

ETAPA	TIEMPO (seg)	km recorridos
1. Ciclo frío	505	5.76
2. Ciclo estabilizado	867	6.34
3. Reposo	600	0.00
4. Ciclo caliente	505	5.76

3.1.1 Especiación de Hidrocarburos

La cromatografía de gases ha sido usada por muchos años para analizar las emisiones de escape de los automóviles. Los primeros métodos ofrecían emplear un sistema complejo de columnas empacadas y válvulas para separar las mezclas de hidrocarburos de metano (C1) a dodecano (C12) en la emisión (McEven 1966).

Con el empleo de columnas capilares de alta resolución se han mejorado, simplificado y obtenido mejores resultados en los análisis de emisiones vehiculares, por lo que actualmente es posible separar todos los hidrocarburos en una sola columna (Olson *et al.* 1992). Sin embargo, se requiere de otros factores, como son: estándares de calibración, sistema de enfriamiento con nitrógeno líquido, control de temperatura y presión ambiental y un "software" de captura de información para formar bases de datos adecuados para su análisis posterior.

Cuando se habla de "especiación de hidrocarburos" generalmente se refiere a que es posible identificarlos y cuantificarlos individualmente de la mezcla de la emisión. Actualmente más de 120 hidrocarburos individuales han sido analizados (Lawrence 1993).

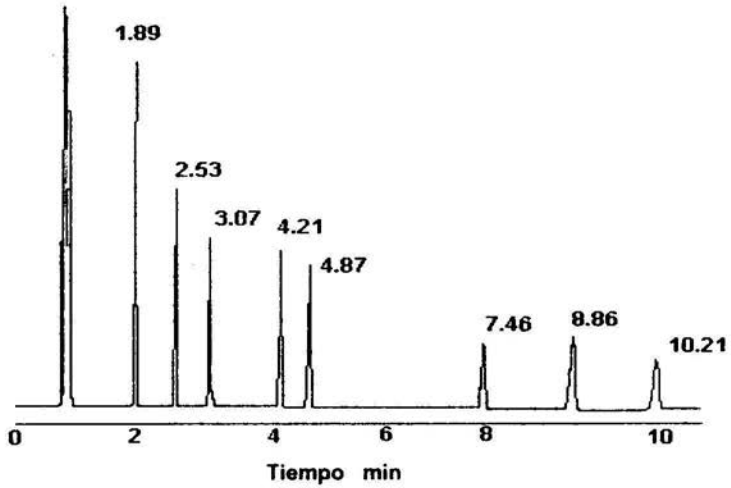
El cromatograma es la representación gráfica de los compuestos de la muestra (Fig 4). Cada pico es un compuesto y tiene asignado un tiempo de retención en minutos, el cual es el tiempo requerido para que éste eluya de la columna al detector. Para la identificación de un compuesto, es empleado un estándar como referencia que se prepara a una concentración conocida y se inyecta en la misma columna y en condiciones de operación similares.

Para determinar la concentración de un compuesto en la muestra se compara ya sea el área o la altura del pico representado en el cromatograma. Con el pico del estándar y por una simple relación lineal se cuantifica el compuesto (Rood 1995).

Algunos investigadores han empleado esta técnica de diferentes modos: en la determinación de hidrocarburos alifáticos de emisiones con gasolina (Schutzle *et al.* 1991), observando la respuesta en la reformulación de gasolinas y lubricantes (Hare y White 1991) y en la evaluación del impacto de las emisiones vehiculares en la formación de ozono (Lowi y Carter *et al.* 1990).

La especiación de hidrocarburos es una poderosa herramienta para la evaluación de los compuestos reactivos en las emisiones de escape o evaporativas; debido a que cada hidrocarburo reacciona de diferente manera con el aire urbano produciendo distintas cantidades de ozono. La misma masa del total de hidrocarburos pueden formar diversas cantidades del mismo, dependiendo de los componentes individuales. Por ejemplo, el efecto del 1,3-butadieno es 700 veces más reactivo que el metano. Estas reactividades fueron determinadas por Carter 1990. La especiación de hidrocarburos también es utilizada para determinar la

presencia y cantidad de emisiones tóxicas provenientes de los vehículos, además de que permite comprender el proceso de combustión por sí mismo (Lawrence 1993).



<u>TIEMPO DE RETENCION</u> (min)	<u>AREA</u>	<u>ALTURA</u>	<u>AMPLITUD</u> (min)
1.89	7612	6260	0.019
2.53	6398	3954	0.025
3.07	6123	3135	0.030
4.21	7798	2874	0.042
4.67	7692	2611	0.045
7.46	5686	1236	0.068
8.88	7303	1350	0.077
10.21	5587	906	0.084

Fig. 4 Cromatograma e informe

3.1.2. Técnica de intercambio de cromátidas hermanas

La similitud del material genético en todas las células es la base para emplear bioensayos a corto plazo en carcinogénesis y mutagénesis. El término bioensayo frecuentemente se refiere a pruebas de toxicidad para la evaluación de cualquier sustancia y generalmente son utilizados: microorganismos (bacterias o levaduras), células aisladas de mamíferos y en algunos casos plantas y animales completos. También se aplican para detectar respuestas biológicas relacionadas con la genotoxicidad como son: mutaciones, daño y reparación del ADN, aberraciones cromosómicas, intercambios de cromátidas hermanas (ICH) y transformaciones morfológicas de células (Stetka y Wolf 1976, Holmberg y Ahlborg 1983). Estos sensores biológicos permiten evaluar una mezcla compleja como las emisiones de combustión, para indicar lo potencialmente mutagénicas o carcinogénicas que son. La separación e identificación de componentes peligrosos y productos químicos específicos y su comparación con la actividad biológica aporta una idea de los efectos potenciales en la salud que estas sustancias tienen en el hombre.

Un biomarcador citogenético útil para determinar el daño provocado por los agentes químicos, lo constituye el cultivo de linfocitos de sangre periférica que ha mostrado ser un indicador extremadamente sensible tanto *in vitro*, como en individuos ocupacionalmente expuestos a diversos agentes ya que presenta las siguientes ventajas (Evans y O'Riordan 1975, Latt *et al.* 1981) :

- Es sencillo obtener poblaciones celulares numerosas ya que 1 ml de sangre puede contener de 1 a 3 millones de linfocitos.
- Están distribuidos en el cuerpo, circulan en todos los tejidos y una proporción elevada de ellos son longevos.
- Casi todos los linfocitos de sangre periférica son una población celular sincronizada en la interfase y normalmente no realizan la mitosis.

Asimismo el intercambio de cromátidas hermanas (ICH), ha resultado ser una prueba rápida y sensible puesto que se induce con concentraciones hasta diez veces menores que las requeridas para producir alteraciones cromosómicas (Wolff 1974, Perry y Evans 1975, Latt *et al.* 1981).

El ICH es una consecuencia de cambios simétricos en un locus dado de las cromátidas hermanas que no alteran la morfología del cromosoma (Perry y Evans 1975) o desde el punto de vista molecular, es el resultado del rompimiento y reunión del ADN en sitios homólogos (Swierenga *et al.* 1991).

Los ICH son fáciles de estudiar en linfocitos humanos y existen muchos reportes relacionados con la formación de éstos en cultivos como una respuesta a la exposición de agentes químicos. Se sabe que diferentes agentes xenobióticos provocan aberraciones cromosómicas y también aumentan la cantidad de intercambios de cromátidas hermanas por lo que es considerado como evidencia de daño cromosómico (Csukás *et al.* 1981).

Las primeras demostraciones de intercambios de cromátidas hermanas se realizaron mediante estudios autorradiográficos de cromosomas de plantas marcados con timidina tritiada que incorporaron en la primera de dos divisiones subsecuentes y observaron por medio de autorradiografía que los cromosomas presentaban una cromátida marcada y otra sin marcar, debido a la duplicación semiconservadora del ADN. La única complicación que encontraron fue que algunos segmentos de cromátidas hermanas se habían intercambiado. De esta manera se descubrió el fenómeno de intercambios de cromátidas hermanas (Taylor *et al.* 1957, Taylor 1958). A partir de entonces se desarrollaron diferentes procedimientos para distinguir las cromátidas hermanas sin la utilización de isótopos radioactivos y autorradiografía, uno de ellos fue el de fluorescencia mas Giemsa (Perry y Wolff 1974). Esta técnica consiste en exponer las células a 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdUrd), un análogo de la timina que la sustituye, de tal manera que los cromosomas de la segunda mitosis poseen una

cromátida sustituida por BrdUrd en una cadena de ADN, mientras que su cromátida hermana lo está en sus dos cadenas (Fig.5).

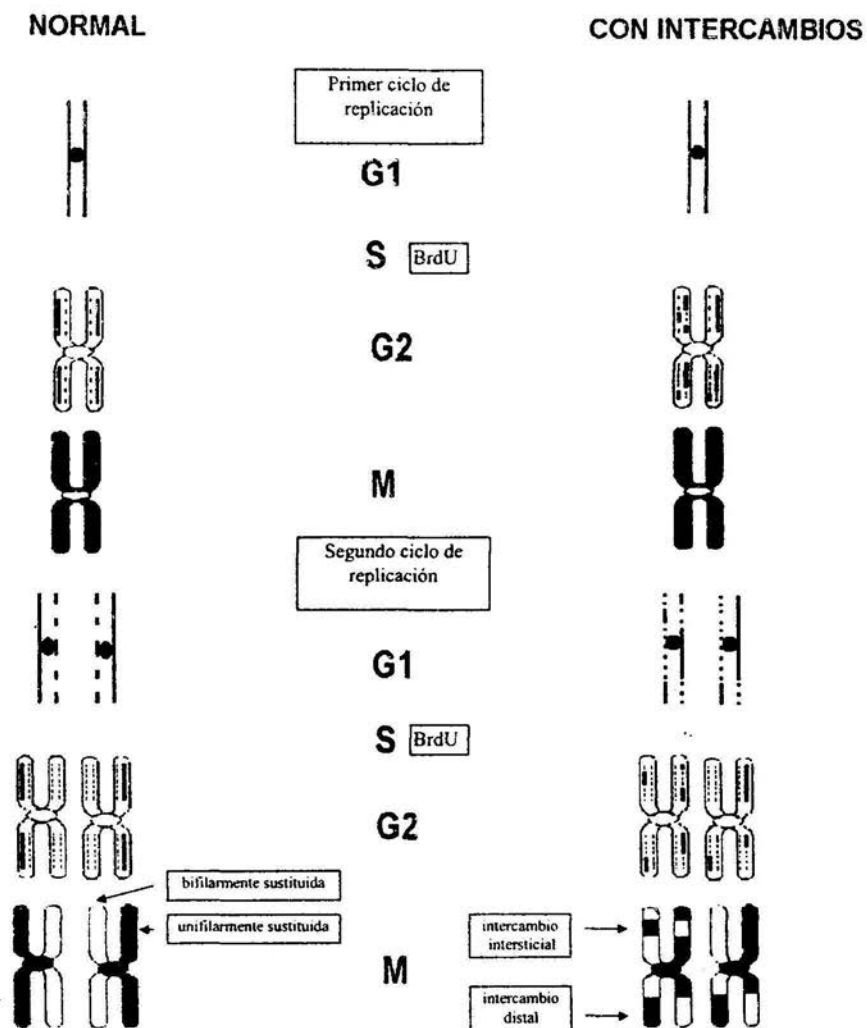


Fig. 5 Esquema que muestra la incorporación de 5-BrdU, los intercambios de cromátidas hermanas distal e intersticial

Si se ha producido un intercambio de las cromátidas hermanas se reconoce inmediatamente porque las cromátidas que tienen el ADN sustituido bifilarmente se observan más pálidas que las unifilarmente sustituidas. Con esta tinción se puede apreciar que las dos cromátidas pueden intercambiar sus segmentos. Este intercambio ocurre con frecuencias estimadas entre 6 a 9 intercambios por metafase en sujetos normales no expuestos a agentes mutagénicos; mientras que los individuos expuestos a algunas de estas sustancias incrementan en forma significativa la frecuencia de intercambios (Perry y Wolf 1974).

3.1.3 Modelos propuestos para explicar la formación de ICH

Aunque el significado biológico de los ICH no ha sido establecido, existen hipótesis que tratan de explicar su función celular y el proceso molecular que los origina. Existen varios modelos en los que se relaciona el tipo de evento generador con el daño, el retraso en el ciclo celular, los eventos espontáneos o la alteración del ADN propiamente dicha (Painter 1980).

3.1.3.1 Modelo de Holliday (propuesto por Kato 1977)

Entre los modelos que inicialmente fueron propuestos destaca el de Holliday que se basa en los eventos de recombinación meiótica de eucariontes inferiores y sugiere un posible papel para la formación de los ICH mediante un evento de doble hebra (Kato 1974). Este modelo involucra un intercambio de polinucleótidos entre moléculas dúplex de ADN, seguido por dos intercambios de polinucleótidos alternativos y únicamente uno de ellos produce un intercambio completo dúplex de ADN que podría ser posteriormente evidente como un ICH. Si el primer intercambio es inducido por daño, éste guiaría a un rompimiento de una cromátida, tales rompimientos podrían ser asociados con los ICH aproximadamente a la mitad del tiempo y se propone que el intercambio de ADN durante la formación de los ICH podría estar de acuerdo con el modelo de recombinación. Este proceso involucra el intercambio de hebras de polinucleótidos de ADN, que contiene segmentos cortos de ADN y se dirigen a una

región del heterodúplex que posee segmentos complementarios de cada dúplex original. Sin embargo este modelo es inconsistente ya que al no existir reparación en las regiones del ADN donde existen rompimientos, recombinaciones o durante la formación de la estructura de Holliday, permite que las lesiones persistan. Por otro lado, los heterodúplex son unidades de intercambio muy pequeñas, mientras que los ICH son entidades de ADN discretas, separadas y visibles en microscopía de luz por lo que no hay una estrecha relación entre la formación de los heterodúplex y los ICH (Stetka y Painter 1982).

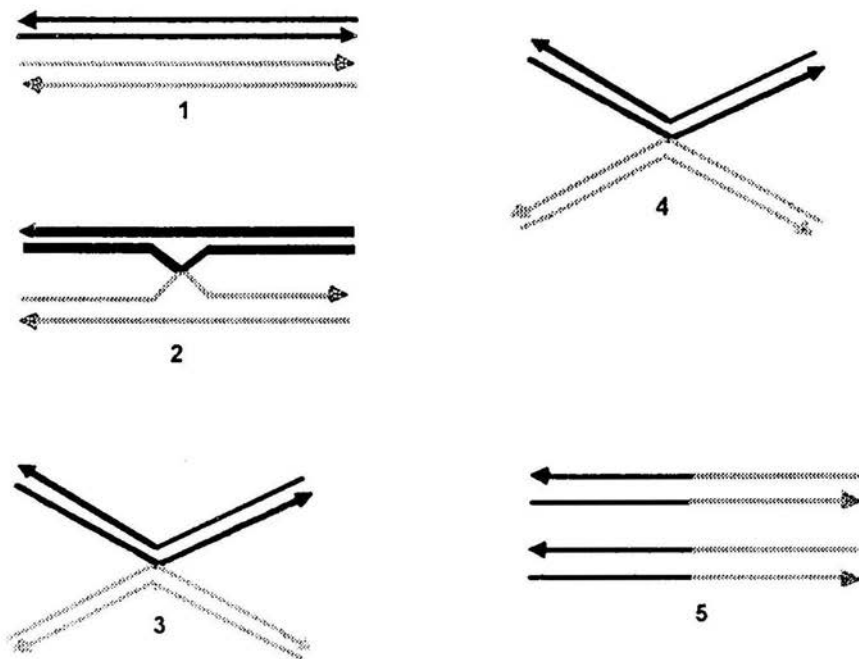


Fig. 6 Modelo de recombinación genética de Holliday (1964) propuesto por Kato (1974, 1977) para la formación de ICH

3.1.3.2 Modelo de Shafer “desvío de la replicación” (replication bypass) (propuesto por Shafer 1977)

Shafer se basa en el hecho de que las uniones cruzadas (crosslinking) podrían inhibir o bloquear la separación normal de las hebras de ADN que se requiere para su replicación bidireccional, ya que la reparación de estas ligaduras cruzadas (L/C) requieren un dúplex paralelo para completar el intercambio bidireccional. Se postula que los ICH podrían ser mecanismos por los cuales la maquinaria de replicación podría evadir o desviar (Bypass) las L/C en el ADN. Las L/C podrían ser fatales en G1 o en regiones no replicadoras de la fase S. A menos que el proceso de replicación pudiera eludir estas lesiones, produciendo un segundo dúplex para la reparación recombinacional. Sin embargo, las células sobreviven y se dividen a pesar del tratamiento con agentes inductores de L/C. El modelo se describe como el avance de una hebra de ADN hacia una L/C creando una tensión distorsional cerca de una hebra de una L/C, resultando un rompimiento en una hebra progenitora de modo que la hebra naciente pueda aproximar la L/C a la hebra progenitora opuesta por encima y por debajo. Los extremos libres quedarían entonces alineados con la polaridad opuesta. Los ICHs podrían entonces complementarse por medio de los siguientes sistemas: Unión terminal de los extremos libres vía segmentos de Okasaki, naciente o bien por su traslapamiento. El mecanismo de desvío permitiría que continúe la replicación sin ser reparado el enlace cruzado (dejándolo intacto) y ocasiona una interrupción de las hebras progenitoras y una interacción incompleta con las hebras nacientes cerca y por debajo del sitio de enlace cruzado, produciendo un intercambio de las cromátidas hermanas. Este modelo tiene correlaciones negativas al considerar los eventos de recombinación de ADN y los sitios de enlace cruzado como las regiones adecuadas para la formación de los ICH, lo cual es inconsistente con los datos experimentales obtenidos con numerosos agentes que no son inductores de enlaces cruzados pero sí de ICH; por lo tanto, descarta la posibilidad de observar ICH dobles al no haber reparación del daño inicial en el segundo ciclo de replicación y el hecho de que existen agentes cuyo mecanismo sobre el ADN no es por enlaces cruzados y son buenos inductores de ICH, hace inoperable dicho modelo (Fig. 7 y 8).

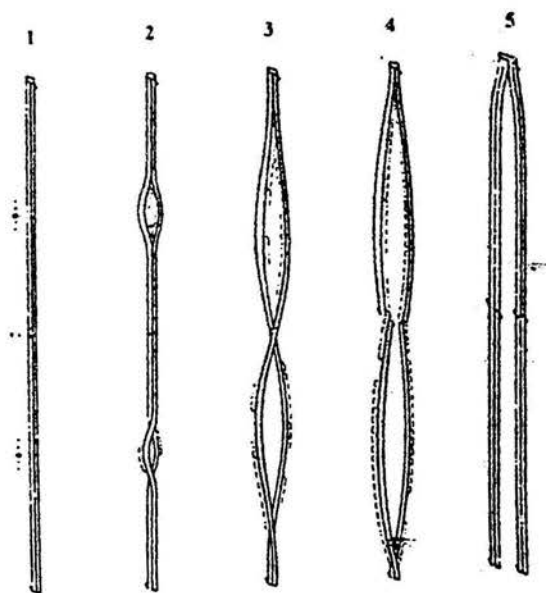


Fig. 7 Mecanismo de desviación de la replicación para la formación de un ICH por un enlace cruzado (Shafer 1977)

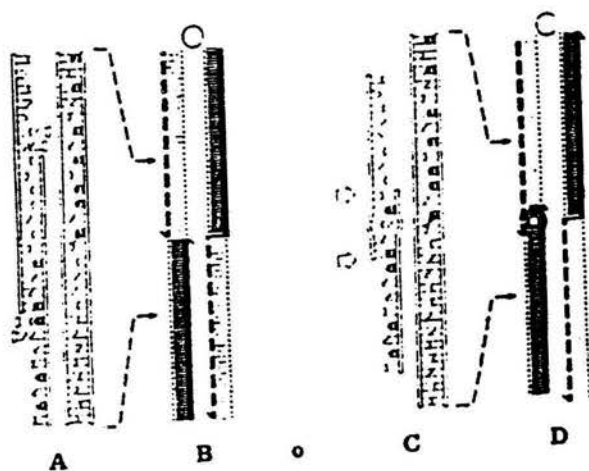


Fig. 8 Proceso alternativo de reunión (Shafer 1982)

3.1.3.3 Modelo de Detour o desviación duplicadora (propuesto por Ishii y Bender 1980)

Ishii y Bender (1978) proponen en su modelo que los ICH pueden originarse en forma espontánea o por daño al ADN. En el primer caso sugieren que son el resultado de una ruptura al azar de las hebras progenitoras a nivel de la horquilla de replicación del ADN durante la síntesis y su reasociación con las hebras hijas de polaridad similar, en el segundo los ICH son debidos a que el daño sobre una de las hebras progenitoras ocasiona que se rompa a nivel de la bifurcación del ADN durante la síntesis, teniendo la posibilidad de unirse covalentemente con la hebra hija recién sintetizada y de la misma polaridad, posteriormente la banda progenitora no alterada puede romperse cerca del extremo terminal de la hebra hija complementaria a la banda progenitora que presenta el daño continuándose con ella, complementándose con la lesionada. Este modelo basado en observaciones experimentales con agentes como hidroxurea, afidicolina y 1, B-D arabinofuranosilcitosina que inhiben la síntesis de ADN, específicamente la elongación de la cadena e inducen espontáneamente un incremento de los ICH que indica además que la horquilla de replicación puede ser el sitio de su formación. Aunque tiene algunas evidencias que tratan de explicar el mecanismo para la generación de los ICH, este modelo tiene críticas al no explicar el origen de las mellas en el ADN que precede a la formación del ICH, sino que especulan que las enzimas desespirilizan el ADN tales como las girasas y los inhibidores de estas están involucrados en el origen de ellas (Fig 9).

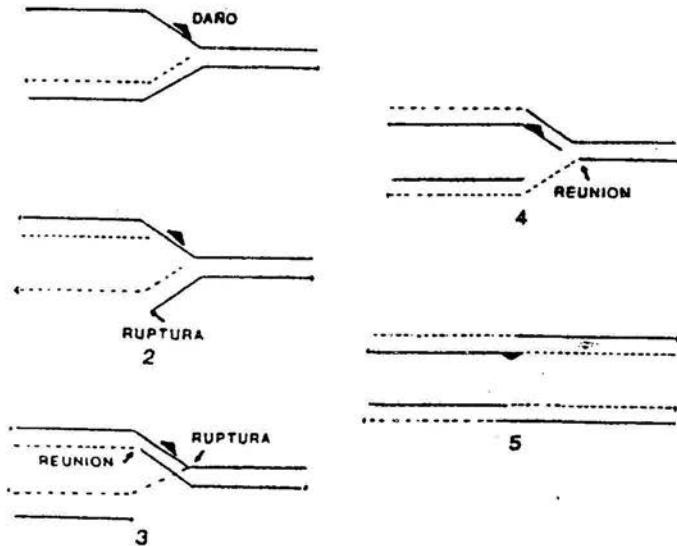
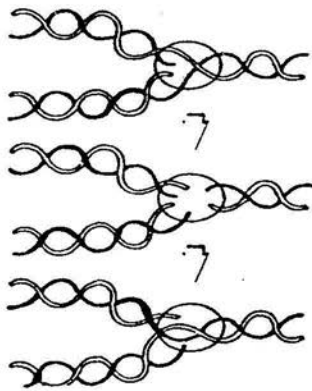


Fig. 9 Modelo de desviación duplicadora (Ishii y Bender, 1980)

3.1.2.4 Modelo de Painter (1982)

Una de las teorías más aceptada se basa en el modelo de Painter (1980) que considera que los ICH se presentan con mayor frecuencia en los sitios de unión entre los grupos de replicones. De acuerdo con este modelo, cuando el ADN es afectado por algún agente químico o físico que produce inhibición en la elongación de la cadena de polinucleótidos, dicho daño provoca retardo en la duplicación de ciertos agrupamientos de replicones. Este hecho finalmente conduce a la existencia de regiones del ADN no replicadas adyacentes a regiones replicadas en donde se originan rompimientos de hebra doble posiblemente por la acción de topoisomerasas que inducen ruptura y reasociación de cadena doble. En ocasiones la ruptura es sellada por la unión de la hebra hija de la molécula replicada con la molécula no replicada, dando lugar al intercambio de hebra doble (Fig. 10).



Unidad discreta de replicación del ADN
(replicón)

Discontinuidad de las cadenas
de ADN que puede ser inducida
por agentes

Intercambio entre una cadena de
ADN recién sintetizada y una
cadena original aún sin
replicarse

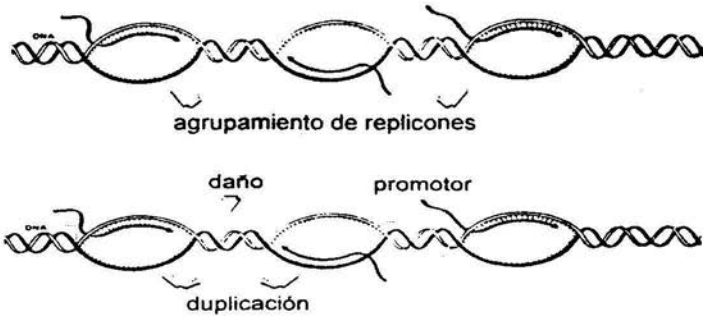


Fig. 10 Modelo que ilustra la formación de intercambios de cromátidas hermanas
propuesto por Painter (1982)

3.1.4 Cinética de proliferación celular, índices mitótico y de replicación

La cinética de proliferación celular (CPC) es otra prueba biológica (Mutchinick *et al.* 1980), que ha sido empleada tanto *in vitro* como *in vivo* para la evaluación de la citotoxicidad de compuestos químicos, debido a que las alteraciones en la proliferación se pueden deber a la reducción de la tirosina de fosforilación de la *cdc2* que a su vez afecta la activación del factor promotor de la maduración (FPM) para el inicio de la mitosis, como la polimerización de microtúbulos, entre otras. Algunos estudios reportan que ciertas concentraciones de compuestos como arsénico y cadmio, producen estímulo linfocitario aumentando así la proliferación celular (Ostrosky 1994), mientras que cuando existe falta de nutrientes, de factores de crecimiento o si se añade un inhibidor de síntesis de proteínas, el ciclo celular disminuye o se suspende (Gonsebatt 1988).

La CPC es evaluada mediante el Índice de Replicación (IR) (Lamberti *et al.* 1983). Este permite detectar cuando algunos compuestos modifican el ciclo celular, ya que se alteran las frecuencias de metafases de primera (M1), segunda (M2) o tercera (M3) divisiones (Hadnagy *et al.* 1986). Se considera en M1 aquellas células cuyo ADN se replicó una vez después de la adición de la BrdU y todos los cromosomas tiñen oscuro, en M2 a las células donde el ADN se duplicó dos veces en presencia de este análogo de base y las cromátidas están uni y bifilarmente sustituidas por éste y presentan tinción diferencial y en M3, los que muestran algunos cromosomas con ambas cromátidas bifilarmente incorporadas y otros con una bifilarmente sustituida, así la mayoría de los cromosomas tiñen claramente y pocos presentan tinción diferencial ya que estuvieron tres ciclos en presencia de este compuesto (Krishna *et al.* 1985) (Fig. 11).

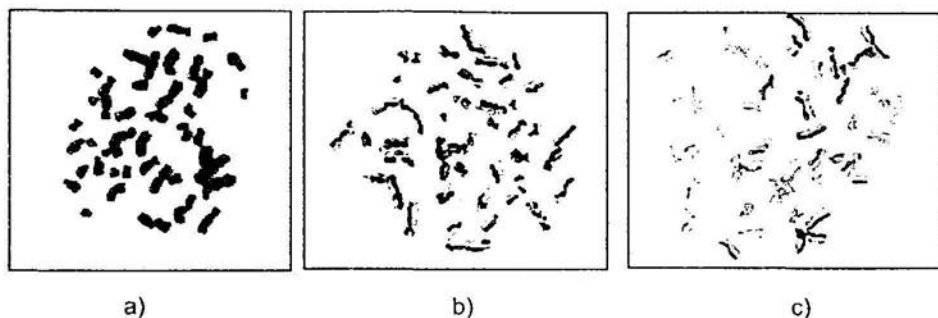


Fig. 11 Metafasas de: a) primera división (M1), b) segunda división (M2) y c) tercera división (M3)

El índice mitótico (IM) también ha sido propuesto como un parámetro en la actividad antineoplásica en el cultivo de linfocitos humanos (Rojas *et al.* 1993), que indica la relación existente entre la cantidad de células de una población determinada que se encuentran en mitosis y las que permanecen en interfase. Generalmente para hallar el índice mitótico se establece la proporción de células en división por cada mil células de un tejido en un momento determinado, pero es necesario disponer de una muestra estadísticamente representativa y un registro de células vivas o preparaciones fijas y teñidas.

El índice mitótico es inversamente proporcional al grado de diferenciación celular; así como por ejemplo, en el tejido nervioso es 0, en la epidermis de rata 0.5 y en el epiteloma basocelular humano 50 (Urdiain *et al.* 1993).

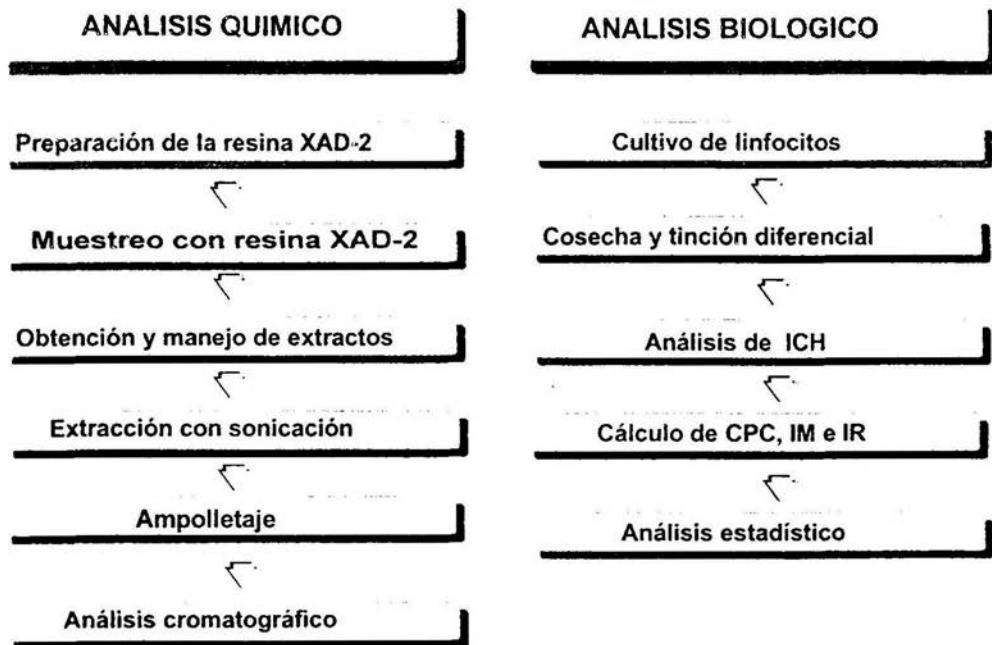
En algunos estudios se ha evaluado la acción de medicamentos antineoplásicos de uso clínico con respecto al índice mitótico encontrando que existe una relación directa entre las concentraciones empleadas y la inhibición del IM (Rojas *et al.* 1991).

III. OBJETIVOS

- Establecer las condiciones adecuadas para la obtención de los hidrocarburos de la fase de vapor con la resina XAD-2 de las emisiones vehiculares y su extracción por ultrasonido con dimetilsulfóxido para las pruebas citogenéticas.
- Determinar los hidrocarburos volátiles de la fase de vapor de las emisiones vehiculares por cromatografía de gases capilar.
- Evaluar su posible efecto genotóxico mediante el análisis de intercambios de cromátidas hermanas en cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica *in vitro*.
- Analizar su influencia en la cinética de proliferación celular (CPC) y en los índices mitótico (IM) y de replicación (IR).

IV. MATERIALES Y METODOS

En el siguiente diagrama de flujo se resumen las actividades incluidas en la experimentación:



4.1.1 Sistema de muestreo

Se utilizó un vehículo Volkswagen Sedan (1991) sin convertidor catalítico, que fue sometido a revisión previa de las condiciones mecánicas en los talleres del Instituto Mexicano del Petróleo (IMP), cuya finalidad fue asegurar la integridad de la unidad y que no presentara fugas de combustible o aceite que pudieran alterar los resultados. Con este criterio se realizaron las pruebas FTP-75 para capturar una muestra de emisiones vehiculares.

Para el desarrollo de este estudio se empleó gasolina sin plomo. A este combustible se le determinó la presión de vapor en los laboratorios del IMP, considerando que dicho parámetro es uno de los factores más importantes en la volatilidad de los combustibles (Manual ESSO 1996).

El procedimiento para obtener las emisiones contaminantes en los gases de escape, siguió la norma establecida por el "Code of Federal Regulations" de los Estados Unidos de América y por la Normatividad Mexicana NMX-AA-II-1993 SECOFI/DGN 1993.

El vehículo se acondicionó por 12 horas a temperatura ambiente y la duración de la prueba fue de 41.3 min. Durante la prueba y mediante el equipo de muestreo a volumen constante (CVS, Constant Volume Sampler) se atrapó y se diluyó la muestra con aire ambiental filtrado, colectándose una porción en bolsas Tedlar y la otra en resina XAD-2 a un flujo constante de 0.170 m^3 estándar por hora (SCFH)*. Por último, se analizó cualitativa y cuantitativamente su composición.

* Las condiciones estándar se refieren a 20°C y 760 mm Hg .

4.1.2 Procedimiento de preparación de la resina

Antes de capturar los hidrocarburos de la fase móvil, la resina XAD-2 se condicionó con lavados de metanol, dietiléter, acetona y metanol-agua destilada (50:50) (Salomaa 1988). Para eliminar la humedad de ésta se colocó en una estufa a 110°C por 12 horas. Posteriormente se empacó en un tubo de 15 cm con fibra de vidrio y se determinó su peso.

4.1.3 Procedimiento de extracción de hidrocarburos

Con la finalidad de determinar el tiempo más adecuado para la extracción de los hidrocarburos de la fase vapor, la resina fue colocada y resuspendida en un vial con 4 ml de dimetilsulfóxido (98%) que se colocó en baño maría con agua destilada y se sonicó durante 2 horas en un ultrasonido (Branson 2200), manteniendo la temperatura del agua a 25 °C. Cada 15 min se tomó una alícuota y se inyectó en el cromatógrafo, la cual se analizó por cromatografía de gases. Posteriormente el extracto fue absorbido por medio de un sistema de vacío, que se filtró y guardó en viales ámbar etiquetados.

4.1.4 Análisis químico

El análisis de los extractos por cromatografía de gases capilar fue hecho el mismo día en que se aplicaron al cultivo de linfocitos humanos inyectando 1 µl del extracto en un cromatógrafo de gases (Varian 3400) equipado con válvula automática de muestreo y detector de ionización de flama (FID) con un programa de temperatura de -50°C a 150°C durante 126.66 minutos llamado PIMOD, que permitió analizar compuestos de C1 a C12 en una sola "corrida de prueba". El cromatógrafo está conectado a una interfase inteligente Perkin Elmer 900 que sirvió de enlace entre el equipo cromatográfico y una computadora AcerMate que almacenó los datos del análisis de cada prueba.

El análisis cromatográfico se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones de operación:

-Tipo de columna: DB-1, longitud 100 m, 0.25 mm de diámetro interno y 0.5 μm de película	
-Temperatura del puerto de inyección	150°C
-Temperatura del detector de ionización de flama	250°C
-Gas acarreador	Helio (He)
-Flujo de gas acarreador (He)	30 ml/min
-Flujo de hidrógeno (H_2)	30 ml/min
-Flujo de aire	300 ml/min
-Relación Split	1:50
-Flujo de Venteo	60 ml/min
-Flujo en la columna	1 ml/min
-Tiempo de corrida	126.66 min
-Programa de temperatura	-50 a 150°C

4.1.5 Cultivo de linfocitos

Se tomó una muestra de sangre venosa periférica con jeringa heparinizada (0.3 ml) de un donador sano. Se agregaron 8 gotas de sangre en un tubo de ensayo estéril que contenía 5 ml de medio GIBCO complementado con 0.12 ml de fitohemaglutinina (FHA, GIBCO) esterilizados por filtración "Millipore" de 0.45 μm . A las 24 horas de iniciado el cultivo se aplicaron 100 μl (6.5×10^6) de 5-Bromodesoxiuridina (Merck) y a las 48 horas se agregaron las concentraciones de los extractos de las emisiones 0.5, 0.7, 0.9, 1.0 y 2.3 $\mu\text{g/ml}$ por 2 horas (una en reposo y otra en agitación) que se establecieron con base en experimentos preliminares. Se empleó como disolvente el dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final de 0.7%, debido a la insolubilidad de los compuestos en agua. Después del tratamiento se lavaron los cultivos 2 veces con solución isotónica de cloruro de sodio (0.9%) y finalmente se adicionaron 5 ml de medio GIBCO complementado con FHA, más 5-BrdU. A las 70 horas de cultivo se añadieron 100 μl (5×10^{-6} M) de colchicina a cada tubo. Como testigo positivo se empleó 50 μl de mitomicina C (1×10^{-7} M) ya que se ha comprobado que es un mutágeno que induce frecuencias elevadas de ICH.

4.1.6 Cosecha de linfocitos y tinción diferencial

Al transcurrir las 72 horas, los cultivos se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante e inmediatamente el botón se resuspendió en una solución hipotónica de KCl 0.075 M a 37°C por 20 minutos, se centrifugó nuevamente y se fijaron las células con 10 ml de metanol-ácido acético (3:1), después de 20 minutos, se lavó el botón con el fijador permaneciendo en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó finalmente el botón y se resuspendió en 0.5 ml de fijador, después se realizaron las preparaciones por goteo dejándolas secar al aire (Purrot y Lloyd 1972).

Para la tinción se utilizó el método de fluorescencia mas Giemsa (Perry y Wolff 1974). Las laminillas con metafases se pusieron en el colorante fluorocromado Hoechst-33258-agua destilada (1:9) por 40 minutos en oscuridad en cajas de Koplín. Posteriormente se introdujeron en una solución de citrato salino de sodio (CSS) a 60°C y se tiñeron con Giemsa (Merck), diluida en una solución de Sorensen 1:10 (pH 6.8) durante 2 minutos.

4.1.7 Análisis de los intercambios de cromátidas hermanas

Antes de iniciar la observación, las preparaciones fueron reetiquetadas con una clave para evitar prejuicios en el registro de los intercambios de cromátidas hermanas (ICH) de tal manera que se desconociera el grupo al cual pertenecían, posteriormente se registraron al microscopio considerando los ICH distales como un evento y los intercalares como dos. Se llevó a cabo la lectura de 25 metafases de segunda división y se anotaron los intercambios encontrados en éstas. Para corroborar los resultados el experimento se hizo por duplicado.

4.1.8 Cálculo de la cinética de proliferación celular (CPC)

La CPC se determinó en cada tratamiento examinando células de primera (M1), segunda (M2) y tercera (M3) divisiones en 100 metafases consecutivas que se reconocieron de acuerdo con su patrón de tinción.

4.1.9 Cálculo del índice de replicación

Se realizó la lectura de 100 metafases consecutivas donde se registraron las de primera, segunda y tercera divisiones, utilizando para este caso la ecuación propuesta por Lamberti *et al.* (1983)

$$IR = \frac{m_1 + 2m_2 + 3m_3}{100}$$

Donde m_1 es igual a metafases de primera, m_2 de segunda y m_3 de tercera divisiones y 100 el total de metafases analizadas.

4.1.10 Cálculo del índice mitótico

Se realizó el conteo de 1000 células por concentración, observándose 4 laminillas y se aplicó la fórmula siguiente:

$$IM = (\text{cantidad de metafases} / \text{células en interfase}) \times 100$$

4.2 Análisis Estadístico

Para ICH e IR, se aplicaron las pruebas de análisis de varianza (ANOVA) y de comparación múltiple Newman-Keuls, mientras que para la cinética de proliferación celular (CPC) se empleó la prueba de X^2 modificada.

V. RESULTADOS

Identificación de compuestos

El procedimiento más adecuado para la extracción de hidrocarburos consistió en suspender la resina XAD-2 en 4 ml de dimetilsulfóxido sonicando en baño María con agua destilada durante 30 min a 25 °C.

Los hidrocarburos presentes en la fase de vapor de la gasolina sin plomo fueron determinados de C1 a C12 por cromatografía de gases utilizando el método antes descrito (Tablas II-VI).

Las concentraciones que se aplicaron a los cultivos de linfocitos de 48 h fueron 0.5, 0.7, 0.9, 1.0 y 2.3 µg/ml a partir de la mezcla completa (247.18 µg/ml). De la tabla II a la VI se aprecia la identificación detallada de los grupos químicos a los que pertenece cada compuesto, tanto de la mezcla completa como de las diluciones empleadas para el experimento biológico así como su concentración total en µg/ml.

Los grupos químicos presentes en la mezcla total fueron: aromáticos (54.0%), alcanos C11 (7.5%), isoparafinas (7.0%), cicloalcanos (6.3%), olefinas (5.8%), decanos (5.51%), parafinas (4.6%) y naftenos (3.2%) (Tabla VIII). Cabe señalar que en este estudio se consideraron isoparafinas a todos los alcanos alifáticos con ramificaciones, no importando el sitio de la ramificación, esto se hizo debido a que este tipo de hidrocarburos tienen un comportamiento fisicoquímico semejante, lo cual permite agruparlos desde el punto de vista analítico.

A partir de 1.0 µg/ml se observó la pérdida del 80 % de los hidrocarburos (Fig. 12), aunque los grupos predominantes en todas las concentraciones fueron los aromáticos (benceno, 1,3,5-trimetilbenceno, n-butilbenceno) y algunas parafinas (3-metilhexano, n-heptano).

Con respecto a los cicloalcanos (hexano, heptano, octano, nonano) y las olefinas, se notó una pérdida a partir de 1.0 µg/ml (Fig. 13).

Por otro lado, el tolueno y el *o*-xileno estuvieron presentes en todas las concentraciones aunque se observó que disminuyeron conforme decreció la concentración (Tablas II a VI).

Para la concentración 0.7 µg/ml se observó que el benceno desaparece, aunque sus derivados 1,3,5-trimetilbenceno y *n*-butilbenceno persisten hasta la última concentración.

TABLA II. HIDROCARBUROS C1-C12 DE LA FASE DE VAPOR DE EMISION DE GASOLINA SIN PLOMO
MEZCLA COMPLETA 2.3 µg/ml

COMPUESTO	GRUPO	TIEMPO DE RETENCION (min)	AREA DEL PICO	CONCENTRACION (µg/ml)
metano	P	5,653	2341	3,29
etileno	O	5,843	190	0,25
acetileno	Q	6,003	396	0,51
etano	P	6,123	436	0,56
propileno	O	9,323	472	0,61
propino	Q	12,583	58	0,07
propadieno	O	14,000	133	0,17
n-pentano	P	36,070	2268	2,79
isopreno	O	36,743	644	0,79
t-penteno-2	O	37,433	401	0,49
c-penteno-2	O	38,123	230	0,28
2-metilbuteno-2	O	38,667	1722	2,12
c-1,3-pentadieno	O	39,540	132	0,16
2,2-dimetilbutano	I	40,313	3784	4,44
4-metilpenteno-1	O	42,657	586	0,70
ciclopentano	N	42,787	363	0,44
2,3-dimetilbutano	I	43,333	349	0,40
olefina 6 (2)	O	43,497	335	0,40
2-metilpentano	I	44,603	150	0,17
olefina 6 (3)	O	44,693	310	0,38
olefina 6 (4)	O	45,363	126	0,15
3-metilpentano	I	45,570	2849	3,41
olefina 6 (5)	O	46,757	90	0,11
hexeno-1	O	47,060	1085	1,27
otros cicloalcanos C6	D	-	-	8,85
n-hexano	P	47,510	259	0,30
olefina 6 (6)	O	48,677	1294	1,54
2-metilpenteno-2	O	49,167	340	0,40
olefina 6 (8)	O	49,400	357	0,42
c-hexeno-2	O	49,890	116	0,14
2,2-dimetilpentano	I	50,820	453	0,53
metilciclopentano	N	51,473	739	0,89
2,4-dimetilpentano	I	52,237	301	0,35
benceno	A	54,513	6812	7,17
3,3-dimetilpentano	I	55,520	273	0,32
ciclohexano	N	55,813	72	0,08
olefina 7(1)	O	57,253	753	0,88
olefina 7(3)	O	57,413	606	0,71
2-metilhexano y 2,3-dimetilpentano	I	58,397	918	1,04
1,1-dimetilciclopentano	N	59,133	69	0,08
3-metilhexano	I	60,090	1793	2,10
t-1,3-dimetilciclopentano	N	61,330	157	0,19
t-1,2-dimetilciclopentano	N	61,583	813	0,92
2,2,4-trimetilpentano	I	61,830	273	0,28

CONTINUA ...

COMPUESTO	GRUPO	TIEMPO DE RETENCION (min)	AREA DEL PICO	CONCENTRACION (µg/ml)
hepteno-1	O	61,963	81	0,09
olefina 7(5)	O	62,190	129	0,15
2-metilhexeno-2	O	63,220	369	0,43
n-heptano	P	63,930	358	0,42
otros cicloalcanos C7	D	-	-	5,23
1-hepteno-2	O	64,553	415	0,49
c-hepteno-2	O	65,537	78	0,09
metilciclohexano	N	66,030	247	0,29
ctc-1,2,4-trimetilciclopentano	N	66,820	119	0,14
ctc-1,2,3-trimetilciclopentano	N	67,760	349	0,41
2,3,4-trimetilpentano	I	68,267	660	0,77
tolueno	A	68,777	6704	6,89
2,3-dimetilhexano	I	70,017	311	0,38
2-metil-3-etilpentano	I	70,327	375	0,46
2-metilheptano	I	70,990	433	0,51
4-metilheptano	I	71,240	148	0,17
3-metilheptano	I	71,997	111	0,13
1ct-1,2,3-trimetilciclopentano	N	72,273	307	0,36
otros cicloalcanos C8	D	-	-	0,46
m-xileno	A	88,607	1427	1,45
4-metiloctano	I	89,993	199	0,23
2-metiloctano	I	90,253	341	0,40
ccc-1,3,5-trimetilciclohexano	N	90,980	207	0,24
3-metiloctano	I	91,310	384	0,45
o-xileno	A	91,943	1509	1,51
1-noneno-2	O	94,353	201	0,23
i-propilbenceno	A	96,173	1367	1,38
3,3-dimetiloctano	I	98,857	79	0,09
n-propilbenceno	A	99,537	329	0,34
1-metil-3-etilbenceno (metol)	A	100,330	1108	1,15
1-metil-4-etilbenceno (petol)	A	100,547	481	0,49
2,3-dimetiloctano	I	101,130	442	0,52
4-metilnonano	I	101,707	70	0,08
1-metil-2-etilbenceno (oetol)	A	102,113	508	0,52
3-metilnonano	I	102,553	104	0,12
otros cicloalcanos C9	D	-	-	1,16
1-butilbenceno	A	103,343	115	0,12
1,2,4-trimetilbenceno	A	103,557	1442	1,48
n-decano	P	105,440	261	0,30
1,2,3-trimetilbenceno	A	106,053	386	0,40
1-metil-4-i-propilbenceno	A	107,047	199	0,21
1-metil-3-n-propilbenceno	A	108,570	242	0,25
n-butilbenceno	A	108,877	12661	13,04
1-metil-4-n-propilbenceno	A	109,093	149	0,16
1,3-dimetil-5-etilbenceno	A	109,343	3262	3,44

CONTINUA ...

COMPUESTO	GRUPO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	AREA DEL PICO	CONCENTRACION (µg/ml)
1-metil-2-n-propilbenceno	A	110,257	386	0,39
1,4-dimetil-2-etilbenceno	A	110,970	26756	27,23
1,2-dimetil-4-etilbenceno	A	111,587	11415	11,78
otros alcanos C10 y aromáticos	D	-	-	18,53
n-undecano	P	113,230	2935	3,32
1,2,4,5-tetrametilbenceno	A	113,923	358	0,36
2-metilbutil-benceno	A	114,070	107	0,10
1,2,3,5-tetrametilbenceno	A	114,203	376	0,39
1- <i>t</i> -butil-2-metilbenceno	A	114,443	396	0,41
Aromático II(1)	A	115,417	2760	2,91
Aromático II(2)	A	116,113	942	0,97
n-pentilbenceno	A	116,603	996	1,03
<i>t</i> -1-metil-2-(4-metilpropil)ciclohexano	N	117,043	3449	4,03
1,3,5-trimetilbenceno	A	118,707	45928	47,23
otros alcanos C11 y aromáticos	D	-	-	23,33
n-dodecano	P	120,730	767	0,87
otros alcanos C12 y aromáticos	D	-	-	5,54
			TOTAL	247,18

Análisis cromatográfico de la fase de vapor de gasolina sin plomo, las condiciones fueron columna

capilar tipo DB-1, -50 a 150 °C

A=aromático

I= isoparafina

N=nafteno

O=olefina

P=parafina

Q=alquino

D=otros alcanos y aromáticos

TABLA III. HIDROCARBUROS C1-C12 DE LA FASE DE VAPOR DE EMISION DE GASOLINA SIN PLOMO 1.0 µg/ml				
COMPUESTO	GRUPO	TIEMPO DE		CONCENTRACION (µg/ml)
		RETENCION (min)	AREA DEL PICO	
2,2-dimetilbutano	I	36,427	82	0,10
olefina 6(2)	O	40,977	823	0,98
2-metilpentano	I	41,537	65	0,07
3-metilpentano	I	42,490	312	0,37
n-hexano	P	45,697	115	0,13
benceno	A	54,550	650	0,74
3-metilhexano	P	60,097	2349	2,75
n-heptano	P	64,600	259	0,30
tolueno	A	68,820	2206	2,27
o-xileno	A	93,683	455	0,46
i-propilbenceno	A	98,287	1324	1,34
n-propilbenceno	A	99,760	109	0,11
1-metil-3-etilbenceno (metol)	A	100,567	512	0,53
1-metil-4-etilbenceno (petol)	A	100,783	284	0,29
2,3-dimetiloctano	I	101,523	580	0,68
1-metil-2-etilbenceno (oetol)	A	102,327	170	0,18
1,2,4-trimetilbenceno	A	103,760	817	0,84
n-decano	P	105,533	70	0,08
1,2,3-trimetilbenceno	A	106,267	131	0,13
n-butilbenceno	A	109,053	2433	2,51
1,3-dimetil-5-etilbenceno	A	109,513	670	0,71
1,4-dimetil-2-etilbenceno	A	111,193	6714	6,83
1,2-dimetil-4-etilbenceno	A	111,803	2922	3,02
otros alcanos C10 y aromáticos	D	-	-	3,52
n-undecano	P	113,433	588	0,67
Aromático II (1)	A	115,563	714	0,75
Aromático II (2)	A	116,763	211	0,22
n-pentilbenceno	A	117,180	716	0,74
(1-metil-2-(4-metilpropil) ciclohexano	N	117,330	382	0,45
1,3,5-trimetilbenceno	A	118,787	6139	6,31
otros alcanos C11 y aromáticos	D	-	-	9,42
n-dodecano	P	120,820	163	0,19
otros alcanos C12 y aromáticos	D	-	-	0,50
			TOTAL	48,16

Análisis cromatográfico de la fase de vapor de gasolina sin plomo, las condiciones fueron columna capilar tipo DB-1, -50 a 150 °C
A=aromático
I= isoparafina
N=nafteno
O=olefina
P=parafina
D=otros alcanos y aromáticos

TABLA IV. HIDROCARBUROS C1-C12 DE LA FASE DE VAPOR DE EMISION DE GASOLINA SIN PLOMO 0.9 µg/ml

COMPUESTO	GRUPO	TIEMPO DE RETENCION (min)	AREA DEL PICO	CONCENTRACION (µg/ml)
2-metilpentano	I	40,893	160	0,18
3-metilpentano	I	42,837	239	0,29
<i>n</i> -hexano	P	46,120	67	0,08
benceno	A	54,920	201	0,23
3-metilhexano	I	60,323	2161	2,53
<i>n</i> -heptano	P	64,753	1164	1,36
tolueno	A	68,973	589	0,61
<i>o</i> -xileno	A	92,070	248	0,25
<i>i</i> -propilbenceno	A	95,917	319	0,32
1-metil-3-etilbenceno (metol)	A	99,810	606	0,63
2,3-dimetiloctano	I	100,403	118	0,12
1-metil-2-etilbenceno (oetol)	A	102,190	80	0,08
1,2,4-trimetilbenceno	A	103,633	218	0,22
otros alcanos C10 y aromáticos	D	108,427	649	0,83
<i>n</i> -butilbenceno	A	108,940	765	0,79
1,3-dimetil-5-etilbenceno	A	109,403	222	0,23
1,4-dimetil-2-etilbenceno	A	111,023	1757	1,79
1,2-dimetil-4-etilbenceno	A	111,647	833	0,86
Aromático II (1)	A	115,493	181	0,19
<i>n</i> -pentilbenceno	A	117,103	111	0,11
<i>t</i> -1-metil-2(4-metilpropil)ciclohexano	N	117,583	351	0,41
1,3,5-trimetilbenceno	A	118,873	2796	2,88
otros alcanos C11 y aromáticos	D	-	-	0,52
otros alcanos C12 y aromáticos	D	-	-	0,36
			TOTAL	15,86

Análisis cromatográfico de la fase de vapor de gasolina sin plomo, las condiciones fueron columna capilar tipo DB-1, -50 a 150 °C

A=aromático

I= isoparafina

N=nafteno

O=olefina

P=parafina

D=otros alcanos y aromáticos

TABLA V. HIDROCARBUROS C1-C12 DE LA FASE DE VAPOR DE EMISION DE GASOLINA SIN PLOMO
0.7 µg/ml

COMPUESTO	GRUPO	TIEMPO DE RETENCION (min)	AREA DEL PICO	CONCENTRACION (µg/ml)
2-metilpentano	I	40,283	319	0,36
3-metilpentano	I	42,157	345	0,41
<i>n</i> -hexano	P	45,873	98	0,11
3-metilhexano	I	60,353	1494	1,75
<i>n</i> -heptano	P	64,813	308	0,36
tolueno	A	69,050	357	0,37
<i>o</i> -xileno	A	92,190	165	0,17
<i>i</i> -propilbenceno	A	96,130	404	0,41
1-metil-3-etilbenceno (metol)	A	99,897	633	0,65
2,3-dimetiloctano	I	100,480	129	0,13
1-metil-2-etilbenceno (oetol)	A	102,297	57	0,06
1,2,4-trimetilbenceno	A	103,713	241	0,25
otros alcanos C10 y aromáticos	D	108,487	239	0,25
<i>n</i> -butilbenceno	A	109,010	265	0,27
1,3-dimetil-5-etilbenceno	A	109,473	61	0,06
1,4-dimetil-2-etilbenceno	A	111,097	763	0,78
1,2-dimetil-4-etilbenceno	A	111,713	326	0,34
Aromático II (1)	A	115,567	67	0,07
<i>n</i> -pentilbenceno	A	117,140	112	0,12
<i>t</i> -1-metil-2(4-metilpropil)ciclohexano	N	117,623	123	0,14
1,3,5-trimetilbenceno	A	118,873	1537	1,58
otros alcanos C11 y aromáticos	D	-	-	0,17
otros alcanos C12 y aromáticos	D	-	-	0,19
			TOTAL	9,00

Análisis cromatográfico de la fase de vapor de gasolina sin plomo, las condiciones fueron columna capilar tipo DB-1, -50 a 150 °C

A=aromático

I= isoparafina

N=nafteno

O=olefina

P=parafina

D=otros alcanos y aromáticos

TABLA VI. HIDROCARBUROS C1-C12 DE LA FASE DE VAPOR DE EMISION DE GASOLINA
SIN PLOMO 0.5 µg/ml

COMPUESTO	GRUPO	TIEMPO DE RETENCION (min)	AREA DEL PICO	CONCENTRACION (µg/ml)
3-metilpentano	I	41,083	188	0,22
3-metilhexano	I	59,870	1494	1,75
<i>n</i> -heptano	P	64,493	308	0,36
tolueno	A	68,753	432	0,44
<i>o</i> -xileno	A	91,470	235	0,24
<i>i</i> -propilbenceno	A	95,633	171	0,17
1-metil-3-etilbenceno (metol)	A	99,183	506	0,52
2,3-dimetiloctano	I	100,343	184	0,19
1-metil-2-etilbenceno (oetol)	A	102,113	68	0,07
1,2,4-trimetilbenceno	A	103,580	230	0,24
otros alcanos C10 y aromáticos	D	108,410	131	0,13
<i>n</i> -butilbenceno	A	108,927	99	0,10
1,3-dimetil-5-etilbenceno	A	109,790	70	0,07
1,4-dimetil-2-etilbenceno	A	110,980	400	0,41
1,2-dimetil-4-etilbenceno	A	111,590	186	0,19
Aromático II (1)	A	115,307	201	0,21
1,3,5-trimetilbenceno	A	118,707	796	0,82
otros alcanos C11 y aromáticos	D	-	-	0,12
			TOTAL	6,26

Análisis cromatográfico de la fase de vapor de gasolina sin plomo, las condiciones fueron columna capilar tipo DB-1, -50 a 150 °C

A=aromático

I= isoparafina

N=nafteno

O=olefina

P=parafina

D=otros alcanos y aromáticos

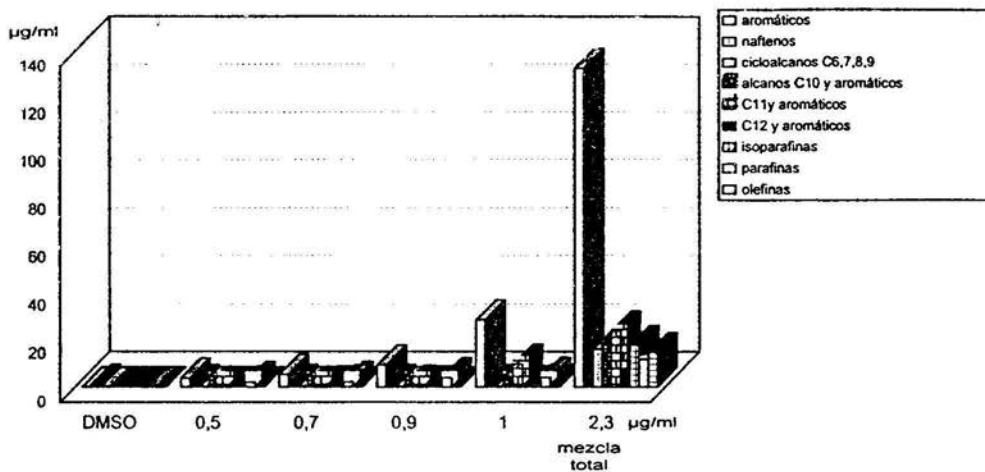


Fig. 13 Grupos químicos encontrados en la mezcla completa y en las diferentes diluciones aplicadas a los cultivos de linfocitos humanos

TABLA VII. HIDROCARBUROS POR GRUPOS QUIMICOS DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES APLICADOS A LOS CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS.

CONCENTRACION (µg/ml)	aromáticos	naftenos	cicloalcanos C6,C7,C8,C9	alcanos C10 y aromáticos	alcanos C11 y aromáticos	alcanos C12 y aromáticos	isoparafinas	olefinas	parafinas	TOTAL (µg/ml)
mezcla (2.3µg/ml)	(40%) 132.79	(29%) 97.00	(4.6%) 15.7	(5.51%) 18.53	(6.0%) 23.33	(1.64%) 5.54	(5.15%) 17.34	(4.26%) 14.34	(3.35%) 11.59	336.12
1.0	(20.6%) 27.95	(64.7%) 87.55	0	(2.6%) 3.52	(6.9%) 9.42	(0.36%) 0.5	(.90%) 1.22	(0.82%) 1.12	(2.94%) 3.98	135.28
0.9	(9.5%) 9.08	(83.6%) 79.18	0	(0.87%) 0.83	(0.54%) 0.52	(0.38%) 0.36	(0.73%) 0.70	0	(4.19%) 3.97	94.64
0.7	(5.44%) 5.25	(90.8%) 87.49	0	(0.25%) 0.25	(0.17%) 0.17	(0.19%) 0.19	(0.79%) 0.77	0	(2.3%) 2.22	96.34
0.5	(4.39%) 3.67	(92.54%) 77.3	0	(0.15%) 0.13	(0.14%) 0.12	0	(0.26%) 0.22	0	(2.52%) 2.11	83.56

Hidrocarburos (µg/ml)

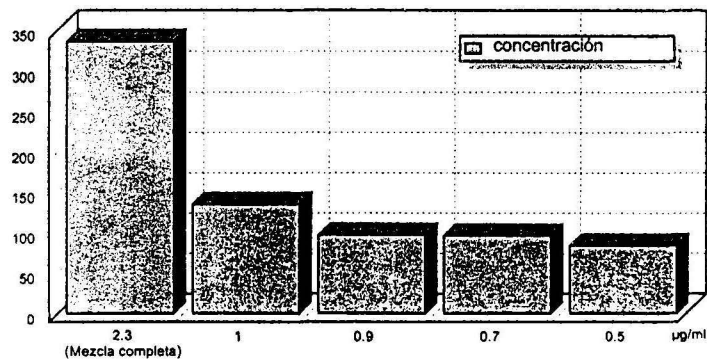


Fig. 12 Disminución de hidrocarburos C1 a C12 conforme a las diluciones aplicadas a los linfocitos humanos periféricos

En la tabla VIII, se presentan las frecuencias de ICH correspondientes a un experimento y su réplica. Los resultados obtenidos muestran con el análisis de varianza que las concentraciones 0.5, 0.7, 0.9, 1.0 y 2.3 µg/ml de hidrocarburos presentes en la emisión de gasolina sin plomo aplicados a los linfocitos en cultivo no modificaron las frecuencias de ICH con respecto al testigo.

El dimetilsulfóxido (DMSO) agregado en los experimentos como disolvente al 0.7% no incrementó significativamente la frecuencia basal de ICH (Tabla VIII), tampoco causó efectos en la cinética de proliferación celular, índice mitótico e índice de replicación, ya que se alcanzaron valores similares a los del testigo (Tablas VIII, IX, X).

Por lo que se refiere a la cinética de proliferación celular (CPC) al utilizar la prueba estadística de χ^2 , se observó inhibición de ciclo celular a partir de 0.5 µg/ml. (Tabla X, Fig. 15).

El índice de replicación presentó solo cambios significativos en la mezcla completa (2.3 µg/ml) (Tabla IX, Fig 16).

Con respecto al índice mitótico, los datos de la tabla X, y de la Fig. 14 muestran que todas las concentraciones utilizadas provocaron una disminución significativa cuando fueron comparados con el testigo.

Por otro lado, las células cultivadas en presencia de mitomicina C (testigo positivo) a las 24 h evidenciaron un incremento importante en las frecuencias ICH y una disminución de los índices mitótico y de replicación. Sin embargo, cuando se aplicó a los cultivos de 48 h durante 2 h, la inducción de ICH, aunque fue estadísticamente significativa menor con respecto al cultivo de 24 h (Tablas VIII, IX, X, Fig. 14, 15).

Las figuras 17, 18, 19, 20, 21 y 22 muestran los cromatogramas del análisis efectuado a los hidrocarburos de la fase de vapor de las concentraciones 2.3 (mezcla completa), 1.0, 0.9, 0.7, 0.5 µg/ml, así como del solvente DMSO.

TABLA VIII. INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS EN CULTIVOS DE LINFOCITOS EXPUESTOS A HIDROCARBUROS DE LA FASE DE VAPOR DE GASOLINA SIN PLOMO

Concentración (µg/ml)	ICH
	$\bar{X} \pm E E$
TESTIGO	4.60 ± 0.39
DMSO (0.7%)	4.14 ± 0.35
MMC (1x10 ⁻⁷) ^a	34.26 ± 0.38*
MMC (1x10 ⁻⁷) ^b	9.26 ± 0.30*
0.5	4.60 ± 0.35
0.7	4.76 ± 0.30
0.9	4.14 ± 0.34
1.0	5.40 ± 0.38
MEZCLA COMPLETA (2.3 µg/ml)	5.82 ± 0.36

^a tiempo de exposición 48 h

^b tiempo de exposición 2 h

n = 50 metafases analizadas en dos experimentos

Se aplicó ANOVA junto con una prueba de comparación múltiple Newman Keuls *P< 0.001

* significativo

TABLA IX. CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR EN LINFOCITOS HUMANOS *in vitro* TRATADOS CON HIDROCARBUROS DE LA FASE DE VAPOR DE GASOLINA SIN PLOMO

Concentración (µg/ml)	Metafases			I.R.
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	
TESTIGO	29	106	65	2.18
DMSO (0.7%)	43	95	62	2.09
MMC (1x10 ⁻⁷) ^a	103*	61	28	1.54*
MMC (1x10 ⁻⁷) ^b	40	96	64	2.12*
0.5	53*	82	65	2.06
0.7	50*	89	61	2.05
0.9	51*	86	63	2.06
1.0	53*	86	61	2.04
MEZCLA COMPLETA (2.3 µg/ml)	54*	97	49	1.97*

^a tiempo de exposición 48 h

^b tiempo de exposición 2 h

n= 200 metafases consecutivas en dos experimentos

Se obtuvieron diferencias significativas entre el testigo y las concentraciones al usar X² el valor de P< 0.05. Se empleó análisis de varianza a un nivel de P<0.01

I. R. = 1M1+2M2+3M3/100

* Significativo

TABLA X. INDICE MITOTICO (IM) EN LINFOCITOS HUMANOS *in vitro* TRATADOS CON LOS HIDROCARBUROS DE LA FASE DE VAPOR DE GASOLINA SIN PLOMO

Concentración (µg/ml)	IM
TESTIGO	0.054
DMSO (0.7%)	0.041
MMC (1x10 ⁻⁷) ^a	0.031*
MMC (1x10 ⁻⁷) ^b	0.035*
0.5	0.021*
0.7	0.021*
0.9	0.026*
1.0	0.026*
MEZCLA COMPLETA (2.3 µg/ml)	0.030*

^a tiempo de exposición 48 h

^b tiempo de exposición 2 h

Se obtuvieron diferencias significativas entre el testigo y las diversas concentraciones al aplicar X² con P < 0.05

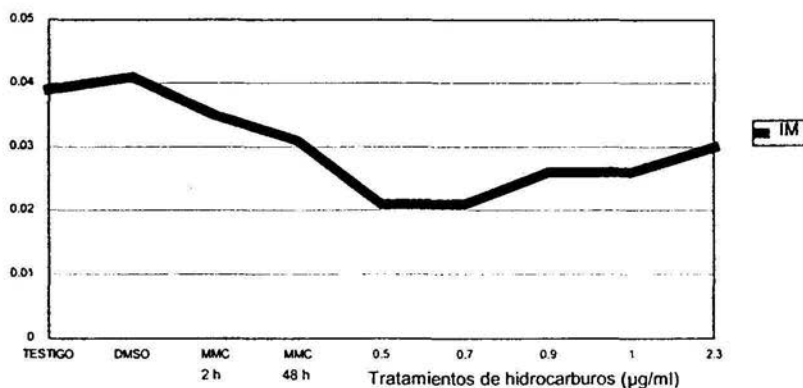


Fig. 14 Efecto de las diferentes concentraciones de hidrocarburos de la emisión de gasolina sin plomo en el índice mitótico (IM) de los linfocitos humanos en cultivo.

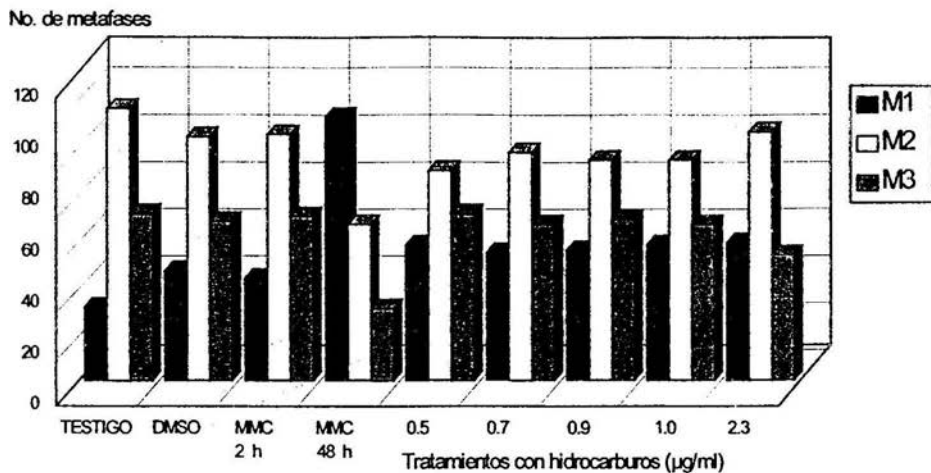


Fig. 15 Cinética de proliferación celular. Metafases de primera (M1), segunda (M2) y tercera divisiones (M3), de las diferentes concentraciones de hidrocarburos obtenidos de la fase de vapor y aplicados a linfocitos humanos periféricos en cultivo.

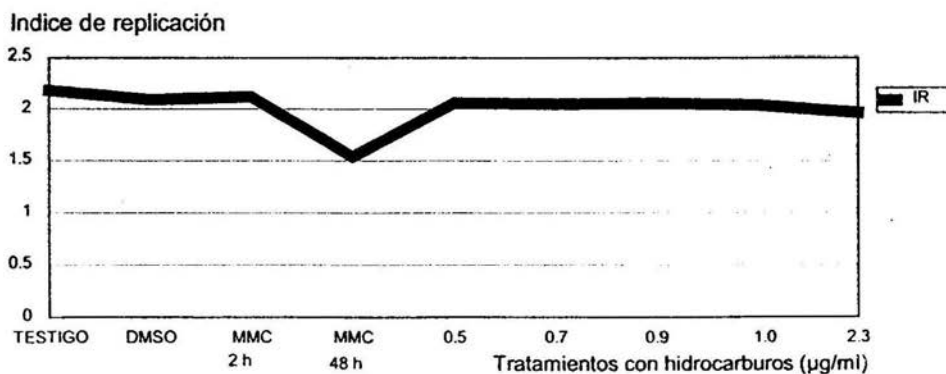


Fig. 16 Efecto de las diferentes concentraciones de hidrocarburos de la emisión de gasolina sin plomo en el índice de replicación (IR) de los linfocitos humanos en cultivo.

VI. DISCUSION

La exposición a emisiones vehiculares representa una importante causa de efectos a largo plazo en la salud humana. Una gran cantidad de estudios experimentales, así como evidencias epidemiológicas indican que las emisiones de gasolina y diesel son mutagénicas o carcinogénicas en animales de laboratorio y posiblemente en humanos (IARC 1989). Debido al gran impacto que tienen las emisiones vehiculares sobre la salud de la población expuesta, especialmente en áreas urbanas densamente pobladas, se ha requerido el desarrollo de medidas de control para los contaminantes. En la actualidad, se ha recomendado el uso de un control de emisiones del motor mediante tecnología de punta, en el que se incluyan: convertidores, el diseño de máquinas apropiadas, la inspección y mantenimiento de ellas y el empleo de combustibles limpios (Mage y Zalli 1992). En este contexto, la caracterización química y toxicológica de las emisiones con relación a la calidad de los combustibles juega un papel importante por la información básica que aportan en su desarrollo con un impacto menor en el ambiente y en la salud.

Los resultados de la especiación de hidrocarburos en este estudio denotan gran variabilidad en cuanto a los grupos químicos, pero en su mayoría los aromáticos ocupan el primer lugar y aunque disminuyeron, sus concentraciones permanecieron hasta la última dilución. Estos resultados concuerdan con el promedio de composición de la emisión de la combustión de gasolinas sin plomo realizados en otros estudios como los de Nelson y Quigley (1984) y del IMP (1996).

Los resultados encontrados en este trabajo mostraron que los hidrocarburos provenientes de la emisión de gasolina sin plomo a diferentes diluciones (0.5, 0.7, 0.9, 1.0 y 2.3 $\mu\text{g/ml}$) no causaron efectos significativos sobre la frecuencia de ICH en linfocitos humanos *in vitro*.

Los datos obtenidos de la caracterización química de los hidrocarburos presentes en cada concentración utilizada en este trabajo sugieren que la respuesta negativa de inducción de ICH se debe probablemente al predominio de compuestos aromáticos y sus derivados (benceno, 1,3,5-trimetilbenceno, n-butilbenceno, tolueno, o-xileno, etc.) ya que estos no poseen propiedades genotóxicas *per se*, sino que requieren ser biotransformados por enzimas del citocromo P450 a metabolitos que pudieran resultar tóxicos para el material genético (Pellack-Walker y Blumer 1986).

Esta investigación coincide con trabajos previos realizados en linfocitos humanos tratados con benceno y sus metabolitos (catecol, hidroquinona, fenol), donde se evidenció que sólo estos últimos elevaron la frecuencia de ICH (Morimoto 1983). Gerner-Smidt y Friedrich (1978), tampoco observaron cambios en la cantidad de ICH ni de aberraciones cromosómicas (AC) cuando aplicó el benceno, tolueno y xilenos en linfocitos humanos *in vitro*.

Por otro lado, se ha descrito en un estudio reciente, realizado con trabajadores de una estación de gasolina expuestos a 8 horas de trabajo, que los hidrocarburos predominantes detectados por cromatografía de gases en el ambiente de esa zona fueron el benceno, tolueno y xilenos con un promedio de 0.91, 1.58 y 0.89 mg/m³, respectivamente. El análisis de ICH en linfocitos humanos no mostró diferencias significativas con respecto al grupo testigo (Pitarque *et al.* 1997). Con ese mismo grupo expuesto a gasolina se empleó el ensayo de micronúcleos (MN) en linfocitos humanos *in vitro* y tampoco encontraron respuesta positiva al comparar con el grupo testigo. Aunque Oesch *et al.* (1995) en células mononucleadas de la sangre en empleados de una estación de gasolina que trabajaban más de 4 h durante la semana, evidenciaron incremento de rompimientos de hebras sencillas de ADN.

La carencia de resultados positivos (Gerner- Smidt y Friedrich 1978, Fredga *et al.* 1979, Pitarque *et al.* 1997) sugieren el uso de métodos moleculares como aductos de ADN, fluorescencia *in situ* o hibridación, etc., para que contribuyan a esclarecer los efectos de la gasolina y puedan ofrecer una estimación más exacta del riesgo de

genotoxicidad ya que Oeschls *et al.* (1995), utilizando este tipo de ensayos sensibles, detectó que la gasolina induce rompimientos de hebra sencilla en el ADN y no tuvo efectos clastogénicos ni aneugénicos.

Para demostrar la inducción de ICH, CNP e IR en los cultivos de linfocitos humanos, se empleó un agente alquilante, la mitomicina C (testigo positivo), la cual ha demostrado que provoca enlaces cruzados en el ADN e inhibe la síntesis del ARN y de las proteínas. Los tratamientos que producen una frecuencia de intercambios también causan retraso en el ciclo celular (Morimoto *et al.* 1984, Kataung 1994). En este trabajo se confirma el efecto de la MMC sobre ICH, CPC e IR y se demuestra que el procedimiento utilizado en los tratamientos con las emisiones de gasolina sin plomo fue el adecuado.

Con la MMC aplicada a las 48 h con un tiempo de exposición de 2 h se manifestó una respuesta significativa en ICH (9.26 ± 0.30) se presentan una inhibición de la CPC y el índice mitótico disminuyó significativamente. Sin embargo cuando los linfocitos se expusieron a 48 h los 3 parámetros fueron alterados 2 veces más alterados que a las 2 h. Estos datos indicaron que el tiempo corto de exposición de MMC en los cultivos (2 h) produjeron menor daño al ADN que los largos (48 h) estos resultados coinciden con algunos otros autores (Morimoto *et al.* 1984, Ribas *et al.* 1996).

Con respecto a la CPC, se manifestaron diferencias en todas las concentraciones provenientes de la emisión de gasolina sin plomo, ya que las proporciones de metafases de primera división (M1) en estos cultivos fueron mayores que las halladas en el testigo. Este hallazgo sugiere que la inhibición producida por los hidrocarburos quizá esté mediada por la activación de una forma inhibitoria de las cinasas o por un incremento intracelular del AMPc ya que se ha visto que estos factores detienen el ciclo celular, específicamente en el periodo G₁ (Herman *et al.* 1980).

Los resultados del cálculo del IR en la Tabla IX, muestran que sólo la máxima concentración utilizada en este estudio (2.3 µg/ml) fue estadísticamente significativa, lo que indica que hay un retraso en la capacidad proliferante de los linfocitos (Ivette y Tice 1982), que podría significar que la mezcla completa de hidrocarburos fue capaz de producir un disfunción en la respuesta de división de los linfocitos debido posiblemente a la interacción directa con el DNA, este comportamiento coincide con el trabajo realizado por Rojas et al. (1993) en que hubo un retraso en la cinética de proliferación celular al evaluar compuestos antineoplásicos.

Con respecto al IM, los datos presentados en la tabla X, indican una inhibición significativa en todas las concentraciones, que demostró que los hidrocarburos indujeron citotoxicidad, esto concuerda con Rojas *et al.* (1993) quienes mostraron inhibición del IM causada por seis drogas, lo que puede ser interpretado en términos de muerte o de retraso celular en algún momento durante la interfase. Una respuesta similar se observó en el trabajo de Frías *et al.* (1991) en el que notaron una considerable reducción de células después de dos divisiones tratadas con MMC.

De la anterior discusión es posible concluir lo siguiente: que al evaluar los hidrocarburos de la fase de vapor de la emisión de gasolina sobre los parámetros ICH, CPC e IM en linfocitos humanos *in vitro*, solo se reflejó el efecto en la CPC y el IM probablemente porque los compuestos químicos al no ser metabolizados, estén actuando a nivel de la fase G1 del ciclo celular y por consiguiente no se evidenció el daño en ICH debido a que este fenómeno es dependiente de la fase S ó de replicación.

VII. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio demuestran que:

1. El procedimiento más adecuado para la obtención de hidrocarburos fue resuspendiendo la resina XAD-2 en 4 ml de DMSO con sonicación durante 30 min a 25 °C.
2. En el extracto de la emisión de la combustión se encontraron diferentes grupos entre ellos aromáticos, naftenos, parafinas, isoparafinas y olefinas.
3. En general, en todas las concentraciones (0.5, 0.7, 0.9, 1.0 y 2.3 µg/ml) se manifestó una mayor concentración de compuestos aromáticos.
4. Los tratamientos directos con los hidrocarburos de la fase de vapor C1-C12 no son mutágenos directos en los linfocitos humanos en cultivo ya que no hubo respuesta citogenética.
5. El IR mostró inhibición celular con la máxima concentración (2.3 µg/ml) lo que evidenció detener el ciclo celular normal.
6. El IM se alteró en todas las concentraciones (0.5, 0.7, 0.9, 1.0 y 2.3 µg/ml) lo que sugirió que los hidrocarburos causaron citotoxicidad.

REFERENCIAS

- Alsberg T. y Stenberg U. (1985). Chemical and biological characterization of organic material from gasoline exhaust particles. *Environ. Sci. Technol.* **19**, 14-16.
- Anderson H. R., Macnair R. S. y Ramsey J. D. (1985). Deaths from abuse of volatile substances: a national epidemiological study. *Br. Med. J.* **290**,304-307.
- ASTDR (Agency for Substances and Disease Registry) (1993). Atlanta; U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Internet: <http://astdr.cdc.gov:8080facts.hpt>.
- ATDR (Agency for Toxics Substances and Disease Registry), (1992). Toxicological profile for 1,3-butadiene. Atlanta, GA; U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Baumeister T., Avallone E. A. y Baumeister III T. (1984). MARKS, Manual del Ingeniero Mecánico, Vol. II, España, 8ª Edición, McGraw Hill, Barcelona, pp. 7-15
- Brandt L., Nilsson P. G. y Mitelman F. (1978). Occupational exposure to petroleum products in men with acute non-lymphocytic leukemia. *Lancet* **1**, 553 -556.
- Brief R., Lynch J., Bernath T. y Scala R. (1980). Benzene in the workplace. *Am. Ind. Assoc. J.* **41**, 616-623
- Brorström E., Greenfelt P., Lindskog A. (1983). The effect of nitrogen dioxide and ozone on the decomposition of particle associated polycyclic aromatic hydrocarbons during sampling from the atmosphere. *Atmos. Environ.* **3**, 601-605.
- Budavari S. (1989). The Merk Index. Merck & Company, Rahway, NJ, pp. 78-89

- Busey W. M. y Cockrell B.Y. (1984). Non-neoplastic exposure-related renal lesions in rats following inhalation of unleaded gasoline vapors. (M. A. Mehlman, G.P. Hemstreet Jr., J. J. Thorpe y N.K. Weaver, Eds.), En : Renal effects of petroleum hydrocarbons, Princeton Scientific. Publishing Princeton., NJ. pp.57-64.
- Campbell J. A. (1936). The efectos of exhaust gases from internal combustion engines and of tobacco smoke upon mice, with special reference to incidence of tumours of the lung. Br. J. Exp. Pathol. **27**, 146-158.
- Carter A., Lowi Jr. y Carter W. P. (1990). A method for evaluating the atmospheric ozone impact of actual vehicle emissions, SAE, Paper 900710.
- Chandrasekaran R., Samy P. L. P. y Murthy P. B. K., (1996). Increased sister chromatid exchange (SCE) frequencies in lymphocytes from traffic policemen exposed to automobile exhaust pollution. Human. Exper. Toxicol. **15**, 301-304.
- Cheng Y.S., Yeh H.C., Mauderly J. L. y Mokler B.V., (1984). characterization of diesel exhaust in a chronic inhalation study. Am. Ind. Hyg. Assoc. J. **45**, 547-555.
- Crebelli R., Fuselli S., Cdonti G. y Carere A. (1991). Mutagenicity spectra in bacterial strains of airborne and engine exhaust particulate extracts. Mutat. Res. **261**, 237-248.
- Csukás Y., Gungl E., Antoni F. y Vida G. (1981). Role of metabolic activation in the sister chromatid exchange inducing activity of ethyl carbamate (urethano) and vinyl carbamate. Mutat. Res. **89**, 313-316
- Dávila R. M. C. (1981). Efectos producidos por el n-heptano en los cromosomas de las células meristemáticas de la raíz del haba *Vicia faba*. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México

- DDF (Departamento del Distrito Federal). (1995). Comisión Metropolitana para la prevención y control de la contaminación ambiental en el valle de México. "Programa integral contra la Contaminación Atmosférica", México, D. F.
- Dirección General de Prevención y Control de la Contaminación (1996). Programa de verificación vehicular, DDF, Informe preliminar enero-mayo, Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP), México, D. F.
- EPA/USA (Environmental Protection Agency) (1990). Cancer risks from outdoor exposure to air toxics. Vol.1, final report, EPA 4501/1-90-004a, Washington, D C.,USA.
- EPA/USA (Environmental Protection Agency) (1993). Motor vehicle related air toxic study, public review draft, Washington, DC., USA.
- EPA/USA (Environmental Protection Agency) (1994). Chemical summary for toluene prepared by office of pollution prevention and toxics. Agosto, EPA 749-F-94-021a, Washington, D. C., USA.
- Espinosa V. O., Camacho, Q. C., Carabias L.J. y De la Fuente, R.J. (1996). Programa para Mejorar la calidad del Aire en el Valle de México 1995-2000,Departamento del Distrito Federal; Gobierno del Estado de México, Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca y Secretaría de Salud, Segunda impresión, México p. 26
- Evans L. A. y O'Riordan M.L. (1975). Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen test. *Mutat. Res.* **31**, 135-148.
- Faust R. A. (1994). Toxicity summary for toluene. U. S. Army Environmental Center, Aberdeen Proving ground, Maryland, USA.

- Flemming A. F. (1990). Benzene in petrol: a continuing hazard. *Lancet* **2**, 1076-1077.
- Fredga K. J. y Berline R. M. (1979). Chromosome studies in workers exposed to benzene En: K. Berg (Ed), Genetic Damage in Man Caused by Environmental Agents, Academic Press, New York, pp. 54-61.
- Frias S., Mendoza S., Molina B. y Carnevale C. (1991). Effect of mitomycin C and Bromodeoxyuridine on fanconi anemia lymphocytes. *Anr. Genet.* in press.
- Gerner-Smidt P. y Friedrich U. (1978). The mutagenic effect of benzene, toluene and xilene studied by the ICH technique. *Mutat. Res.* **58**, 313-316.
- Gómez Arroyo S., Castillo R. y Villalobos P. (1986). Chromosomal alteration induced in *Vicia faba* by different industrial solvents: thinner, toluene, benzene, n-hexane, n-heptane y ethyl acetate. *Cytologia*, **51**, 133-142.
- Gonsebatt M. E. (1988). Cinética de proliferación celular e ICH basales e inducidas por mitomicina C en linfocitos humanos cultivados en solución salina balanceada suplementada con plasma autólogo. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM, México, D. F.
- González O. P. (1993). Análisis paramétrico de la emisión de partículas en un motor diesel de inyección directa, mediante sonda de muestreo. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- González O. R. (1995). Control, medición y tratamiento de partículas emitidas por los motores diesel. Facultad de Ingeniería, UNAM, México.
- Guizar E. y Vazquez J. (1994). Genética clínica. Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias, 2a Ed. El Manual Moderno, México.

- Hadnagy W., Seemayer N. H. y Tomingas R. (1986). Cytogenetic effects of airborne particulate matter in lymphocytes in vitro. *Mutat. Res.* **175**, 97-101.
- Hampton C. V., Pierson W. R., Schuetzle D. y Harvey T. M. (1983). Hydrocarbon gases emitted from vehicles on the road. 2. Determination of emissions rate from diesel and spark-ignition vehicles. *Environ. Sci. Technol.* **17**, 609-708.
- Hare C. T. y White J. J. (1991). "Toward the environmentally-friendly small engine: fuel, lubricant, and emission measurement issues", SAE paper 911222.
- Hatjian A. B., Eewards W. J., Harrison J., Williams M. F., Blain G. P. (1995). Ambient, biological y biological effect monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), *Toxicol. Lett.* **77**, 271-279.
- Herman H. R., Cohn M. R. y McNamara P. (1980). Principles of metabolic control in mammalian system. DNA replication and the cell cycle. Press Nueva York y Londres.
- Hermann M. (1981). Synergistic effects of individual polycyclic aromatic hydrocarbons on the mutagenicity of their mixtures. *Mutat. Res.* **90**, 399-409.
- Holmberg B., Ahlborg U. (1983). Consensus report: Mutagenicity and carcinogenicity of car exhausts and coal combustion emissions. *Environ. Health persp.* **47**, 1-30.
- Holum R. J. (1986). Química Orgánica, curso breve, editorial Limusa, México D.F.
- Huff J. E., Haseman J. K., De Marini D. M., Eustes S., Maronpot R. R., Peters A. C. (1989). Multiple site carcinogenicity of benzene in Fisher 344 rats and B6C3F1 mice. *Environ. Health Persp.* **82**, 22-25

- Huisingh J. L. y Bradow R. (1978). Application of bioassay to the characterization of diesel particle emissions. En: (M. D. Waters, S. Nesnow, J.L. Huisingh, S. S. Sandhu y L. Claxton Eds.), Application of short-term bioassays in the fractionation and analysis of complex environmental mixtures, Plenum Press, Nueva York, pp. 383-418.
- Hyde D., Gillespie J., Carter R. y Orthoefer J. (1978). Correlations of pulmonary structural and functional changes in dogs after long-term exposure to auto exhaust and other air pollutants. *Am. Rev. Resp. Dis.* **11**, 117-243.
- IARC (1989). Monographs on the evaluation of carcinogen risk to man. Vol. 45. Occupational exposures in the petroleum refining, crude oil and major petroleum fuels. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Infante P. y White M. (1985). Projections of leukemia risk associated with occupational exposure to benzene. *Am. J. Med.* **7**, 403-413.
- Infante P. F., Schwartz E. y Cahill R. (1990). Benzene in petrol: a continuing hazard. *Lancet* **2i**, 814-815.
- Instituto Mexicano del Petróleo (IMP) (1996). Evaluación comparativa del comportamiento en los vehículos automotores que utilizan las gasolinas Pemex-magna en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México, Fase II. Octubre 1997.
- Ishii Y., Bender M. A. (1978). Factors influencing the frequency of mitomycin C induced sister chromatid exchange in 5-bromodeoxyuridine substituted human lymphocytes in culture. *Mutat. Res.* **79**, 411-418.
- Ivette J. L. y Tice R. R. (1982). Average generation time: a new method of analysis and quantitation of cellular proliferation kinetics. *Environ. Mutage.* **4**, 358 (abstract).

- Kato H. (1974). Spontaneous sister chromatid exchanges detected by a BrdU labelling methods. *Nature*, **251**, 70-72.
- Khalil M.A., Qassem W., Osama M.K. (1994). No significant increase in sister-chromatid exchanges in cultured blood lymphocytes from workers in a large oil refinery. *Mutat. Res.* **312**, 187-191.
- Kitchen D. F. (1984). Neoplastic renal effects of unleaded gasoline in Fisher 344 rats. En: (M. A. Mehlman, G.P. Hemstreet Jr, J. J. Thorpe y N. K. Weaver Eds.), Renal effects of petroleum hydrocarbons Princeton Scientific, Publishing Princeton, Nueva Jersey, pp. 65-72,
- Kotin P. y Falk H. L. (1954). Aromatics hydrocarbons II. Presence in the particulate phase of gasoline engine exhaust. *Arch. Ind. Hyg. Occup. Hyg.* **9**, 164-177.
- Krishna G. J., Xu J, Nath J, Petersen M. y Ong T. (1985). In vitro cytogenetic studies on mice exposed to ethylene dibromide. *Mutat. Res.* **158**, 81-87.
- Kuling K. y Rumack B. (1981). Hydrocarbon ingestion. *Curr. Top. Emerg. Med.* **3**, 1-15.
- Lamberti A., Bigatti P.P. y Ardito G. (1983). Cell kinetics and sister-chromatid exchange frequency in human lymphocytes. *Mutat. Res.* **120**, 193-198.
- Latt S. A., Allen J., Bloom S. E., Carrano A., Falke E., Kram D., Scheider E. Schreck R. Tice R., Witfield B. y Wolff S. (1981). Sister chromatid exchange: a report of the genotoxic program. *Mutat. Res.* **87**, 17-62.
- Lawrence R. S. (1993). Reformulated gasolines. How do their emissions measure up?, *Technology Today*, September, 2-7.

- Lewtas J. (1983). Evaluation of the mutagenicity and carcinogenicity of motor vehicles emissions using short-term bioassays. *Environ. Health Perspect.* **47**, 141-152.
- Lowi A. Jr., Carter W. P. (1990). "A method for evaluating the atmospheric ozone impact of actual vehicle emissions", SAE, paper 900710.
- Manual ESSO (1996). Control de calidad, su aplicación a productos del petróleo, México.
- MacFarland H. N. (1984). Zenobiotic induced kidney lesions: hydrocarbons. The 90-day and 2 year gasoline studies. En: (M. A. Mehlman, G.P. Hemstreet Jr., J.J. Thorpe y N. K. Weaver Eds.), Renal effects of petroleum hydrocarbons Princeton Scientific. Publishing Princeton, Nueva Jersey, pp. 51-56.
- Mage D. T. y Zalli O. (1992). Motor vehicle air pollution: Public health impact and control measures. Doc. WHO/PEP/92.4, Ginebra.
- Maltoni C. (1983). Myths and facts in the history of benzene carcinogenicity. En: (M. A. Mehlman, Ed.), Advances in modern environmental toxicology, Princeton Scientific, Publishing Princeton, Nueva Jersey, Vol. IV, pp. 1-15.
- Maltoni C. y Conti B. (1985). Experimental studies on benzene carcinogenicity: at the Bologna Institute of Oncology: current results and ongoing research. *Am.J. Ind. Med.* **7**, 415-446.
- Maltoni C. y Conti B. (1987). Experimental studies on benzene carcinogenicity: results on Wistar rats and Swiss mice, treated by ingestion. En: Living in a chemical world, *Ann. NY Acad. Sci.* **534**, 412-426.
- McEven D. J. (1966). Automobile exhaust hydrocarbon analysis by gas chromatography. *Anal. Chem.* **38**, 1047-1053.

- Mehlman M. A. (1992). Dangerous and cancer-causing properties of products and chemicals in the oil refining and petrochemical Industry, Cap. VII Health effects of Motor Fuels: Carcinogenicity of gasoline, Environ. Res. **59**, 238-249.
- Morimoto K., Wolff S. y Koizumi A. (1983). Induction of sister chromatid exchanges in human lymphocytes by microsomal activation of benzene metabolites. Mutat. Res. **119**, 355-360.
- Morimoto K. (1984). Proliferative kinetics and chemical induced sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. En: Tice R. R. y Hollaender A. (Eds.) Sister chromatid exchanges 25 years of experimental research. part. B. Plenum Press, Nueva York, pp. 677-693.
- Morrison R. y Boyd R. (1994). Química Orgánica, Fondo Educativo Interamericano, México.
- Mutchinick O., Ruz L. y Casas L. (1980). Time of first generation metaphases. I. The effect of various culture media and fetal calf serum in human lymphocytes cultures. Mutat. Res. **72**, 127-134.
- Navarrete B. G. (1992). Energía y medio Ambiente. El caso de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México, Artículo técnico, DINAMIS, No. **1-6**, 72-87.
- Nelson F. P. y Quigley M. S. (1984). The hydrocarbon composition of exhaust emitted from gasoline fuelled vehicles. Atmos. Environ. **18**, 79-87.
- NMX-AA-11-1993/SECOFI/DGN, Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, Método de prueba para la evaluación de emisiones de gases del escape de los vehículos automotores nuevos en planta que usan gasolina como combustible. Esta norma es similar a EPA/75 (FTP-75).

- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) (1995). Motor Vehicle Pollution, Reduction strategies beyond 2010. Publicación de la OECD, París Francia.
- Oesh F. J., Fuchs J. V., Hengstler J. G. (1995). DNA single strand break analysis in mononuclear blood cells of petrol pump attendants. *Int. Arch. Health* **67**, 35-39.
- Olson L. K., Sinkevitch M. R. y Sloane M. T. (1992). Speciation and quantitation of hydrocarbons in gasoline engine exhaust. *J. of Chromatogr. Science* **30**, 500-508.
- Ostrosky W. P. (1994). El índice mitótico y la cinética de proliferación linfocitaria en el monitoreo biológico. *Gac. Med. Mex.* **130**, 432-437.
- Painter R. B. (1980). A replication model for sister-chromatid exchange. *Mutat. Res.* **70**, 337-341.
- Painter R. B. (1982). A replication model for sister chromatid exchange. *Alan R. Liss. Nueva York.* **7**, 115-121.
- Paustenbach W. P., Bass D. R. y Price P. (1993). Benzene toxicity and Risk assessment, 1972-1992: implications for future regulation. *Environ. Health Persp.* **101** (Suppl. 6), 177-200.
- Payri G. F., Lapuerta A. M. y González O. R. (1992). La medición de emisión de partículas en motores diesel. Congreso de Ingeniería Mecánica, Madrid, Septiembre, 1992.
- Pellack- Walker y Blumer J. L. (1986). DNA damage in L5178YS cells following exposure to benzene metabolites. *Mol. Pharmacol.* **30**, 42-47.
- Pennsylvania Department of Environmental Protection (1996). Internet :<http://www.dep.state.pa.us/dep/deput...e/aq/factsheets/factsheet2.htm#wlhat>
- Perry P. y Wolff S. (1974). New Giemsa method for differential staining of sister chromatids. *Nature* **25**, 156-158.

- Perry P. y Evans H.J. (1975). Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* **25**, 121-125.
- Phillipson C. E. y Ioannides C. (1989). Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to mutagens in the Ames test by various animal species including man. *Mutat. Res.* **211**, 147-151.
- Pitarque M., Carbonell E., Lapeña N. Marsú M., Valbuena A., Creus A. y Marcos R. (1997). SCE analysis in peripheral blood lymphocytes of a group of filling station attendants *Mutat. Res.* **390**, 153-159.
- Purrot R. J. y Lloyd D. C. (1972). The study of chromosome aberration yield in human lymphocytes as an indicator of radiation dose. 1. Techniques. *Natl. Radiol. Protect. Board, UK. NRPB-R2.*
- Quadri de la Torre G y Sánchez C. L. (1992). La Ciudad de México y la contaminación atmosférica. Limusa, México. D. F. pp. 35-46
- Raabe K. G. (1993). Review of the carcinogens potential of gasoline. *Environ. Health Persp.* **101**, (Suppl. 6),35-38.
- Rannug U. (1983). Data from short-term tests on motor vehicle exhausts. *Environ. Health Persp.* **47**, 161-169.
- Reese E. y Kimbrough D. R. (1993). Acute toxicity of gasoline and some additives. *Environ. Health Persp.* **101**(Suppl. 6), 115-131.
- Restrepo Y. (1992). Contaminación atmosférica en México. Sus causas y efectos en la salud. Comisión Nacional de Derechos Humanos, México, D. F.
- Reusch H. W. (1981). Química Orgánica, McGraw-Hill , México. p. 36.

- Ribas G., Surallés J., Carbonell E., Xamena N., Creus A., Marcos R. (1996). Genotoxicity of the herbicides alachlor and maleic hydrazine in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis* **11**, 221-227.
- Riveros H. G., Ortiz A. L., y López V (1992). Emisiones contaminantes en motores de gasolina, *DINAMIS* **1-6**, 6167, UNAM, México.
- Roggendorf W., Neumann H., Thron H. L., Schneider H. y Sarasa-Corral J. L. (1981). Histological examination of the rat after long-term exposure to subtoxic automotive exhaust gas. *Arch. Toxicol.* **47**,247-256.
- Rojas E., Sordo M., Bizarro A. (1991). Lymphocyte proliferation as cytostatic screening system. *Env. Mol. Mut.* **17**,62.
- Rojas E., Herrera L. A., Sordo M., Gonsebatt M. E., Montero R. , Rodríguez R. y Ostrosky-Wegman P. (1993). Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity. *Anti-Cancer Drug.* **4**,637-640.
- Rojas T. A. y Padilla M. C. (1996). Muestreo, medición y análisis de partículas diesel. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rood D. (1995). A practical guide to the care, maintenance, and troubleshooting of capillary gas chromatographic systems, Traducción y revisión por Heidelberg, Huthig, Alemania.
- Salomaa S., Tuominen J. y Skyttä E., (1988). Genotoxicity and PAC analysis of particulate and vapour phases of environmental tobacco smoke. *Mutat. Res.* **204**,173-183.
- Sandmark B., Brooms Y. y Lofgren L., (1989). Olfactory function in painters exposed to organic solvents. *Scan J. Work Environ. Health.* **15**, 60-63.

- Sandmeyer E.E. y Kirwin C. J. (1981). Esters. En: Patty's industrial hygiene and toxicology. 3º de Vol. IA. Wiley. Nueva York pp. 2259-2412
- Sans F. R. y Ribas P. J. (1996). Ingeniería Ambiental, Contaminación y tratamientos, Marcombo Boixareu, Barcelona, España. p. 16
- Sawyer F. R. (1993). Trends in auto emissions and gasoline composition. Environ. Health Persp. **101** (Suppl. 6), 5-12.
- Sax I. (1980). Dangerous properties of industrial materials. Van Nostrand, Nueva York, 5a Ed. p. 980.
- Schutzle D., Jensen T. E. , Nagy D., Prostack A. y Hochhauser A. (1991). Analytical chemistry and auto emissions. Anal. Chem. **63**, 1149-1159A.
- Secretaría de Transportes y Vialidad del Departamento del Distrito Federal, (1995). Seminario: Hacia un Plan Rector de Transporte para la Zona Metropolitana de la Ciudad de México, Automóvil Privado y Usuarios del Transporte Público". Comisión de Vialidad y Tránsito Urbanos de la Asamblea de Representantes del Distrito Federal. Ciudad de México, 17, 18 y 19 de Mayo.
- SEDESOL/INE (1991-1992). Informe de la situación general en materia ambiental de equilibrio ecológico y protección al ambiente, México, D. F, 1991-1992.
- Shafer D. A. (1977). Replication bypass model of sister chromatid exchanges and implications for Bloom's syndrome and Fanconi's anemia. Hum. Genet. **39**, 177-190.
- Shiraishi F., Hashimoto S. y Bandow H. (1986). Induction of sister-chromatid exchanges in Chinese hamster V79 cell by exposure to the photochemical reaction products of toluene plus NO₂ in the gas phase. Mutat. Res. **173**, 135-138.

- Sigh H. B. (1992). Measurements of volatile organic chemical at selected in California, *Atmos. Environ.* **26a**, 2929-2946.
- Simons C. (1995). The lies of unleaded petrol (Pt.2), internet
<http://www.peg.apc.or/nexus/ulp2.htm>
- Snyder R. y Kalf G. F. (1994). A perspective on benzene leukemogenesis. *Cr. I Rev. in Toxicol.* **24**,177-209.
- Sociedad Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, A. C. (1994). INGENIERIA AMBIENTAL, Información tecnológica, publicación periódica año 7, No. **24**.
- Solomons T. W. G. (1982). Química Orgánica. Limusa, México, pp. 83-119
- Stenberg U., Alsberg T. y Westerholm R. (1983). Emission of carcinogenic components with automobile exhaust, *Environ. Health Persp.* **47**,53-63.
- Stetka D. G. y Wolff S. (1976). Sister chromatid exchange as an assay for genetic damage induced by mutagen-carcinogens. II. *In vitro* test for compounds requiring metabolic activation. *Mutat. Res.* **41**, 343-350.
- Stetka D. G. Jr. (1982). Operative and Non-operative mechanisms of sister chromatid exchange. En: (Wolff S. Ed.), *Sister chromatid exchanges*. Alan R. Liss, Nueva York, pp 99-114.
- Strauss W. y Mainwaring F. (1990). *Contaminación del aire*, Trillas, México, p 45
- Swierenga S. H. H., Heddle J. A., Sigal E. A., Gilman J. P. W., Brilinger R. L. Douglas G. R. y Nestmann E. R. (1991). Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories, IV. Chromosome aberration and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 chinese hamster lung and human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* **246**,301

- Taylor J. H., Wood P.S. y Hughes W. L. (1957). The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium labeled thymidine. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **43**,122-128.
- Taylor J. H., (1958). Sister chromatid exchanges in tritium labeled chromosomes. Genetics **43**, 515-529.
- Tice R. , Chaillet J. y Schneider E. L. (1976). Demonstration of spontaneous sister chromatid exchanges *in vivo*. Exp. Cell. Res. **102**, 426-429.
- Tice R. R., Ivett J. L. y McFee A. F. (1987). The effect of agent treatment time on the induction of sister-chromatid exchanges in mouse bone marrow cells *in vivo*. Mutat. Res. **182**,15-29
- Urdiain O. G., Sánchez M. A., Sagredo G. E., Rovira R. P., González P. A., Uría A. M. y León del Brío M. (1993). Citología, De. Medica y Técnica S. A. , Barcelona, España, pp. 358-359.
- U. S. Air Force (1989). Toluene. En: the installation restoration toxicology guide, vols 1-5, Wright-Patterson Air Force Base, Ohio, pp 1-37
- Westerholm N. R. y Rannug U. (1988). Effect of fuel polycyclic aromatic hydrocarbon content on the emissions of polycyclic aromatic hydrocarbons and other mutagenic substances from a gasoline-fueled automobile. Environ. Sci. Technol. **22**, 925-930.
- White A. D. y Hesketh L. C. (1980). Method utilizing human lymphocytes with *in vitro* metabolic activation for assesing chemical mutagenicity by sister chromatid exchange analysis. Mutat. Res. **18**, 885-893.

WHO/EURO (World Health Organization) (1987). Air Quality Guidelines for Europe, Regional Office for EUROPE, Copenhagen, Denmark.

Wolff S. (1974). Sister chromatid exchanges: the most sensitive mammalian system for determining the effects of mutagenic, carcinogenic. Expert Conference Oslo, Noruega. pp. 11-13

Wong O., Harris F. y Smith T. (1993). Health effects of gasoline exposure II. Mortality patterns of distribution workers in the United States. Environ. Health Persp. **101** (Suppl. 6), 63-76.

Young R. S. K., Grzyb S. E. y Crismon L. (1977). Recurrent cerebellar dysfunction as related to chronic gasoline sniffing in an adolescent girl. Clin. Pediatr. **16**, 706-708.

ANEXOS

Data File: h:\c325e3 PIS Printed on 11-12-1997 at 09:10:51
Start time: 0.00 min. Stop time: 126.66 min. Offset: 0 sec.
Full Range: 2 millivolts

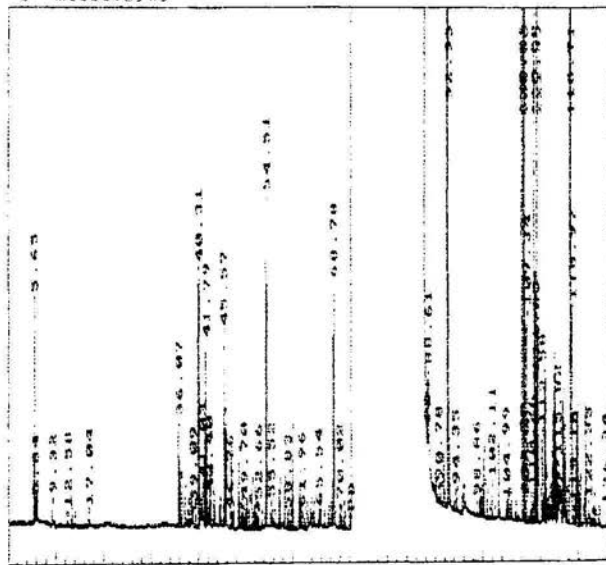


Fig. 17 Cromatograma de hidrocarburos de la fase de vapor, mezcla completa (2.3 µg/ml)

Data File = h:\diluc1.PIS Printed on 11-12-1997 at 09:33:59
 Start time: 0.00 min. Stop time: 126.68 min. Offset: 1 mv.
 Full Range: 2 millivolts

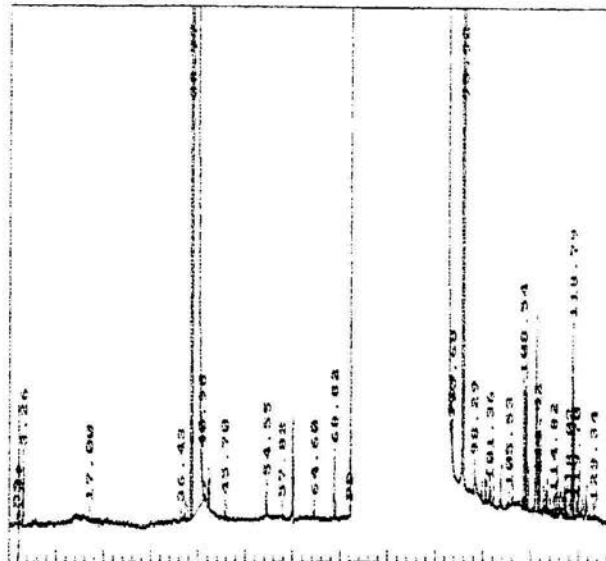


Fig. 18 Cromatograma de hidrocarburos de la fase de vapor ($1 \mu\text{g/ml}$)

Data File = hmfild02.PIC Printed on 11-12-1997 at 09:29:56
Start time: 0.00 min. Stop time: 126.69 min. Offset: -1 mv
Full Range: 2 millivolts

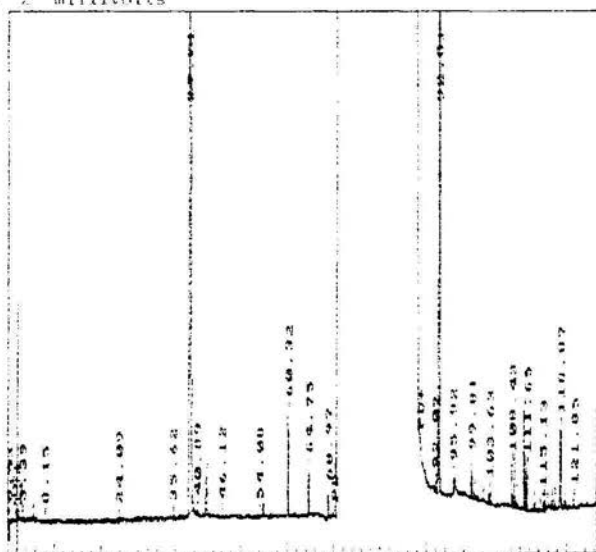


Fig. 19 Cromatograma de hidrocarburos de la fase de vapor (0.9 µg/ml).

Data file = hidiluc3.PIS Printed on 11-12-1997 at 09:37:10
Start time: 0.00 min. Stop time: 126.66 min. Offset: 0 mv.
Full Range: 2 millivolts

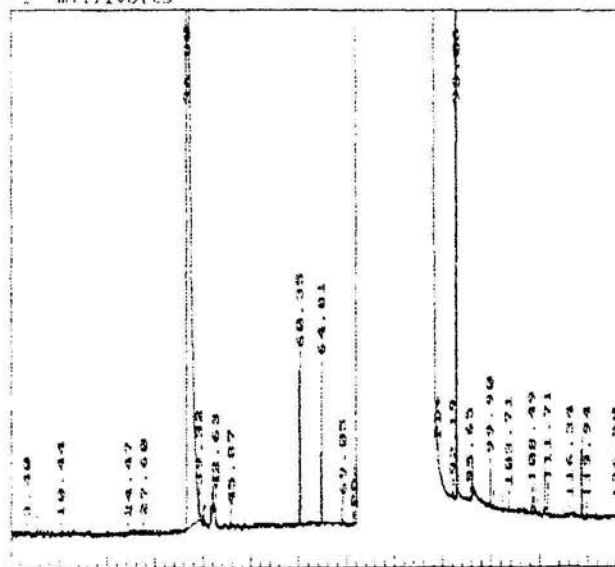


Fig. 20 Cromatograma de hidrocarburos de la fase de vapor (0.7 µg/ml)

Data File : hsd1004.PTS Printed on 11-12-1997 at 09:40:04
Start Time: 0.00 min. Stop Time: 120.00 min. Offset: 0 mV.
Full Range: 2 millivolts.

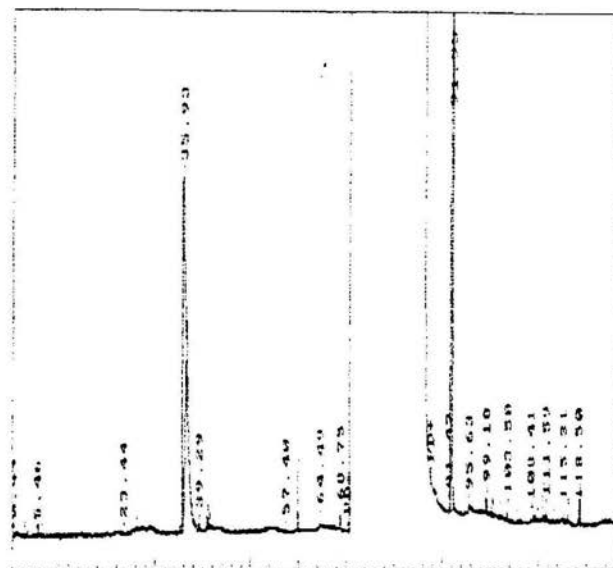


Fig. 21 Cromatograma de hidrocarburos de la fase de vapor, (0.5 µg/ml)