



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Grado en Química

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Estimación del estrés oxidativo de la materia particulada atmosférica (PM₁₀ y PM_{2.5}) utilizando fluidos biológicos sintéticos.

Estimación do estrés oxidativo da materia particulada atmosférica (PM₁₀ y PM_{2.5}) utilizando fluídos biolóxicos sintéticos.

Atmospheric particulate matter (PM₁₀ and PM_{2.5}) oxidative stress estimation by using synthetic biological fluids.

Sandra Vila Gómez

Curso: 2022- 2023

Convocatoria: Julio

Director/a 1: María Isabel Turnes Carou

Director/a 2: Jorge Moreda Piñeiro

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Abreviaturas..... | 1 |
| Resumen | 2 |
| Resumo | 3 |
| Abstract..... | 4 |
| 1. Introducción | 5 |
| 1.1 Contaminación atmosférica y riesgos para la salud. | 5 |
| 1.1.1 Tipos de contaminantes. | 5 |
| 1.2 Materia particulada. | 6 |
| 1.2.1 Fuentes de emisión. | 6 |
| 1.2.2 Composición química del particulado. | 7 |
| 1.2.3 Efectos en la salud. | 8 |
| 1.2.4 Legislación..... | 9 |
| 1.3 Antecedentes, innovación del método y cambios. | 11 |
| 2. Objetivo del trabajo..... | 15 |
| 3. Parte experimental..... | 16 |
| 3.1 Cronograma. | 16 |
| 3.2 Material y reactivos | 16 |
| 3.2.1 Reactivos | 16 |
| 3.2.2 Instrumentación y material | 18 |
| 3.3 Selección de la muestra. | 18 |
| 3.3.1 Zona de muestreo..... | 19 |
| 3.3.2 Método de muestreo. | 20 |
| 3.3.3 Muestra analizada | 21 |
| 3.4 Selección de los fluidos pulmonares sintéticos. | 22 |
| 3.5 Técnicas usadas y procedimiento. | 23 |
| 3.5.1 Extracciones en medio acuoso..... | 23 |
| 3.5.2 Análisis espectrofotométrico. | 24 |
| 4. Resultados y discusión | 26 |
| 4.1 Tratamiento de los datos. | 26 |
| 4.1.1 Cálculo del coeficiente de extinción molar. | 26 |
| 4.1.2 Cálculo de los límites de detección y cuantificación del método..... | 28 |
| 4.1.3 Velocidad de agotamiento. | 28 |
| 4.1.4 Cálculo del potencial oxidativo. | 30 |

| | |
|---|----|
| 5. Conclusión..... | 35 |
| 6. Bibliografía..... | 35 |
| 7. Anexos..... | 42 |
| 7.1 Anexo 1. Toma de muestras. | 42 |
| 7.2 Anexo 2. Datos experimentales. | 44 |

Abreviaturas

AA: Ácido ascórbico

ALF: Fluido lisosomal artificial

COVs: Compuestos orgánicos volátiles

DTT: Ditiotreitól

OMS: Organización mundial de la salud

PM: Particulado atmosférico

PO: Potencial oxidativo

PO^{AA}: Potencial oxidativo en el ensayo de ácido ascórbico

PO^{DTT}: Potencial oxidativo en el ensayo de ditiotreitól

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SLF: Fluido pulmonar sintético

Resumen

Desde hace varios años, el interés provocado por los efectos en la salud que origina la penetración del particulado atmosférico en el cuerpo humano ha aumentado de forma exponencial.

Numerosos estudios realizados sobre este tema consideran el potencial oxidativo (PO), definido como la habilidad de los componentes de particulado para oxidar las especies antioxidantes presentes en los fluidos de los pulmones y generar especies reactivas de oxígeno (ROS), un buen indicador del impacto del particulado sobre la salud. Los ROS presentes en el tracto respiratorio pueden tener su origen en la reacción del particulado con los fluidos pulmonares o pueden introducirse directamente por el aire respirado. Su presencia puede dar lugar a diversos problemas, entre ellos respiratorios, a causa del estrés oxidativo que generan en el organismo.

Una forma de poder evaluar los daños que producen es mediante la medida del PO. Por ello, en este trabajo se lleva a cabo la medida del PO de la fracción bioaccesible de diversas muestras de particulado (recogidas en la ciudad de A Coruña) mediante dos ensayos *in-vitro* diferentes, el de ditiotreitól (DTT) y el de ácido ascórbico (AA), que evalúan de forma indirecta la presencia de ROS en el medio pulmonar.

A mayores, se emplean unas condiciones lo más similar posible a las fisiológicas usando como medio de extracción unos fluidos pulmonares sintéticos, disolución de Gamble y fluido lisosomal artificial, ALF (pH 7,4 y pH 4,5 respectivamente), que simulan los fluidos de los pulmones humanos en dos regiones diferentes del tracto respiratorio y que presentan un pH con valores situados dentro del rango de los reales. Como método de extracción se usa incubación a temperatura constante de 37°C con una agitación leve durante un periodo de 24h.

A diferencia de la mayoría de los trabajos realizados hasta ahora, llevando a cabo el estudio en estas condiciones, se consigue obtener unos resultados que proporcionen una información más realista sobre lo que realmente ocurre en el cuerpo humano al penetrar el particulado.

Palabras clave: Potencial oxidativo, particulado atmosférico, fluidos pulmonares sintéticos, Gamble, ALF, ensayo ditiotreitól, ensayo ácido ascórbico, fracción bioaccesible.

Resumo

Dende fai varios anos, o interese causado polos efectos sobre a saúde provocados pola penetración de partículas atmosféricas no corpo humano aumentou exponencialmente.

Numerosos estudos realizados sobre este tema consideran o potencial oxidativo (PO), definido como a capacidade dos compoñentes particulados para oxidar as especies antioxidantes presentes nos fluídos dos pulmóns e xerar especies reactivas do osíxeno (ROS), un bo indicador do impacto do particulado sobre a saúde. As ROS presentes no tracto respiratorio poden orixinarse pola reacción das partículas cos fluídos pulmonares ou poden ser introducidas directamente polo aire inhalado. A súa presenza pode dar lugar a diversos problemas, entre eles problemas respiratorios, debido ao estrés oxidativo que xeran no organismo.

Unha forma de avaliar o dano que producen é medindo o PO. Por iso, neste traballo realízase a medición do PO da fracción bioaccesible de diversas mostras de particulado (recollidas na cidade da Coruña) mediante dous ensaios *in-vitro* diferentes, o de ditiotreitól (DTT) e o de ácido ascórbico (AA), que avalían indirectamente a presenza de ROS no medio pulmonar.

Ademais, utilízanse condicións o máis similares posibles ás fisiolóxicas, empregando como medio de extracción uns fluídos pulmonares sintéticos, solución de Gamble e fluído lisosomal artificial, ALF (pH 7,4 e pH 4,5 respectivamente), que simulan os fluídos dos pulmóns humanos en dúas rexións diferentes do tracto respiratorio e que presentan un pH con valores situados dentro do rango dos reais. Como método de extracción empregase a incubación a unha temperatura constante de 37°C cunha lixeira axitación durante un período de 24 h.

A diferenza da maioría dos traballos realizados ata o momento, realizando o estudo nestas condicións, é posible obter resultados que aporten información máis realista sobre o que realmente acontece no corpo humano cando penetra o particulado.

Palabras chave: Potencial oxidativo, particulado atmosférico, fluidos pulmonares sintéticos, Gambre, ALF, ensaio ditiotreitól, ensaio ácido ascórbico, fracción bioaccesible.

Abstract

For several years, the interest caused by the health effects caused by the penetration of atmospheric particulates into the human body has increased exponentially.

Numerous studies carried out on this topic consider the oxidative potential (PO), defined as the ability of the particulate components to oxidize the antioxidant species present in the lung fluids and generate reactive oxygen species (ROS), a good indicator of the impact of the particulate on health. ROS present in the respiratory tract may originate from the reaction of the particulate with lung fluids or may be introduced directly from the inhaled air. Their presence can give rise to various problems, including respiratory problems, due to the oxidative stress they generate in the body.

One way to assess the damage they produce is by measuring the PO. For this reason, in this work the measurement of the PO of the bioaccessible fraction of various particulate samples (collected in the city of A Coruña) is carried out by means of two different *in-vitro* assays, that of dithiothreitol (DTT) and that of acid ascorbic acid (AA), which indirectly assess the presence of ROS in the lung environment.

In addition, conditions as similar as possible to the physiological ones are used, using synthetic pulmonary fluids, Gamble's solution and artificial lysosomal fluid, ALF (pH 7.4 and pH 4.5 respectively), which simulate the fluids as extraction medium. of the human lungs in two different regions of the respiratory tract and that present a pH with values located within the range of the real ones. Incubation at a constant temperature of 37°C with slight agitation for a period of 24h is used as the extraction method.

Unlike most of the work carried out to date, carrying out the study under these conditions, it is possible to obtain results that provide more realistic information about what really happens in the human body when the particulate penetrates.

Key words: Oxidative potential, atmospheric particulate, synthetic lung fluids, Gamble, ALF, dithiothreitol assay, ascorbic acid assay, bioaccessible fraction.

1. Introducción

1.1 Contaminación atmosférica y riesgos para la salud.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la contaminación del aire como la presencia en él de agentes químicos, físicos o biológicos que alteran las características naturales de la atmósfera (OMS, 2023).

Las emisiones a la atmósfera que están relacionadas con el cambio climático (niveles de ozono o partículas finas) pueden incrementar los efectos de la contaminación del aire sobre la salud, no solo de forma indirecta por los cambios meteorológicos, sino, directamente por los efectos de dichos contaminantes (Ferran Ballester, 2005).

Según la OMS, el cambio climático es considerado la mayor amenaza para la salud a la que nos enfrentamos. Los efectos que esto genera perjudican, especialmente, a las personas más vulnerables y, aun sabiendo de forma inequívoca que el cambio climático actúa aumentando los daños en la salud, no es sencillo estimar con precisión la magnitud y el impacto de estos riesgos sensibles a los cambios en el clima (OMS, 2021).

En estas últimas décadas, la salud humana se ha visto afectada en mayor medida debido al crecimiento urbano e industrial que ha provocado un aumento de la contaminación ambiental (Amable-Álvarez et al., 2017). Según estimaciones realizadas en 2019, la contaminación del aire ambiente en zonas urbanas y rurales en exterior provoca alrededor de unas 4,2 millones de muertes prematuras en el mundo y, esta alta mortalidad, se relaciona con la exposición a materia particulada fina que causa, entre otras, enfermedades respiratorias y cardiovasculares (OMS, 2022).

1.1.1 Tipos de contaminantes.

En el BOE (número 25, del 29 de enero del 2011 relativo a la mejora de la calidad del aire) se define un contaminante como cualquier sustancia presente en el aire ambiente que pueda tener efectos nocivos sobre la salud humana, el medio ambiente en su conjunto y demás bienes de cualquier naturaleza (BOE, 2011).

Los contaminantes atmosféricos pueden provenir de diferentes tipos fuentes de combustión en las que tenemos móviles (transporte) o fijas (industrias, climatización o procesos de eliminación de residuos). También podemos distinguir entre contaminantes primarios y secundarios, estos se diferencian entre sí por la procedencia de dichos contaminantes (Tabla 1) (Ferran Ballester, 2005).

- Contaminantes primarios: Son aquellos que proceden directamente de la fuente de emisión y se emiten sin cambios previos a la atmósfera. Pueden tener origen antropogénico o natural.
- Contaminantes secundarios: Son aquellos que se producen como consecuencia de transformaciones y reacciones químicas y físicas que sufren los contaminantes primarios en la atmósfera. Los precursores más importantes son SO₂, NO_x, NH₃ y COVs (Meteogalicia, 2023a).

Tabla 1: Principales contaminantes atmosféricos químicos y sus fuentes (Ferran Ballester, 2005).

| Contaminante | Formación | Estado físico | Fuentes |
|--------------------------------|-----------------------|---------------------------|--|
| Partículas en suspensión (PM) | Primaria y secundaria | Sólido y líquido | Vehículos, procesos industriales, humo tabaco |
| Dióxido de azufre | Primaria | Gas | Procesos industriales, vehículos |
| Dióxido de nitrógeno | Primaria y secundaria | Gas | Vehículos, estufas, cocinas de gas |
| Monóxido de carbono | Primaria | Gas | Vehículos, combustiones en interior, humo de tabaco |
| Compuestos orgánicos volátiles | Primaria y secundaria | Gas | Vehículos, industria, combustiones en interior, humo de tabaco |
| Plomo | Primaria | Sólido (partículas finas) | Vehículos, industria |
| Ozono | Secundaria | Gas | Vehículos (secundario a fotooxidación de NO _x y COVs) |

1.2 Materia particulada.

El material particulado atmosférico (PM) es una mezcla de partículas, sólidas o líquidas, que se encuentran suspendidas en el aire, conocidas como aerosoles, y pueden presentar una composición orgánica o inorgánica (Meteogalicia, 2023a). La composición de esta materia es muy variada, tanto en características físicas y químicas como en su origen (natural o antrópico) y formación (primario o secundario) y, como consecuencia, en los efectos que producen en la salud y el medio ambiente.

La contaminación debida a la presencia de estas partículas se define, según el Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, como la alteración de la composición natural de la atmósfera como consecuencia de la entrada en suspensión de partículas, ya sea por causas naturales o del hombre (MITECO, 2023b).

1.2.1 Fuentes de emisión.

La materia particulada es un componente que se encuentra de manera habitual de la atmósfera. Esta procede mayoritariamente de fuentes naturales, sin embargo, hoy en día existen numerosas fuentes de emisión antrópicas que aumentan, de forma significativa, los niveles de particulado presentes en el aire (Pey Betrán et al., 2007).

Dentro de los tipos de origen podemos destacar las siguientes fuentes de PM:

- Fuentes naturales.
 - Las emisiones de los suelos.
 - El polvo procedente de los desiertos.
 - La superficie de los mares y océanos, estas son fuente de partículas generadoras de aerosol marino. Se componen principalmente de sal.
 - Las erupciones volcánicas, estas son fuentes de partículas primarias y secundarias.
- Fuentes antropogénicas.
 - El tráfico, tanto emisiones de vehículos como desgaste de pavimento o neumáticos.
 - La actividad industrial.
 - La calefacción doméstica por la quema de biomasa.
 - Incendios (esto puede ser también un origen natural).

Las partículas procedentes de fuentes antrópicas se localizan principalmente en zonas urbanas e industriales (Meteogalicia, 2023a), aunque la fracción de PM de origen antrópico es relevante incluso en las zonas rurales (MITECO, 2023a). Éstas proceden generalmente de procesos mecánicos y de combustión (Pey Betrán et al., 2007).

1.2.2 Composición química del particulado.

Tal y como se mencionó anteriormente, el particulado atmosférico puede tener una composición variada tanto con componentes orgánicos como inorgánicos. Dentro de los componentes inorgánicos de origen secundario encontramos algunos como el sulfato o nitrato de amonio, que se forman a partir de la oxidación de SO_2 y NO_2 en la atmósfera y por la interacción con NH_3 . Estos forman parte del 30-40% del $\text{PM}_{2.5}$. Haciendo referencia ahora a los componentes orgánicos secundarios, que se forman a partir de la reacción en la atmósfera de los compuestos orgánicos volátiles (COVs) con O_3 , NO_x y otros componentes dando lugar a compuestos carbonosos sólidos y líquidos, constituyen un 25-30% del PM_{10} y $\text{PM}_{2.5}$ (MITECO, 2023a). Las sustancias orgánicas que componen el particulado juegan un papel importante, ya que son capaces de generar ROS en el ciclo redox y provocar estrés oxidativo, que se considera el mecanismo fisiopatológico con más relevancia a la hora de explicar la relación entre la exposición al particulado y las enfermedades que causa (Valavanidis et al., 2008).

La materia particulada se puede clasificar en diferentes grupos composicionales en función de la naturaleza. Estos grupos son: Materia mineral, aerosol marino, compuestos de carbono, derivados de azufre y derivadas de nitrógeno; en cada uno predominan una serie de componentes distintos, por ejemplo, dentro de aerosol marino predomina la presencia de NaCl (Pey Betrán et al., 2007).

En función de la zona en la que se realice el análisis de la calidad del aire podemos encontrar una mayor o menor influencia de cada uno de estos grupos en la composición del particulado. Haciendo referencia a la estación de la Torre de Hércules en A Coruña, podemos destacar la alta contribución del aerosol marino en esta zona debido a su cercanía con el mar. En la Tabla 2 que se muestra a

continuación podemos ver el número de veces que se superó el valor límite diario (VLD) de PM₁₀ a lo largo del año y el notable descenso al descontar el material particulado de origen natural, en este caso aerosol marino.

Tabla 2: Influencia del aerosol marino en la Torre de Hércules en 2021 (Macho-Eiras et al., 2021).

| Estación | Sup. VLD (50 µg/m³) | Media Anual (µg/m³) | Máximo diario (µg/m³) | % Datos válidos diarios |
|--|---|---|---|--------------------------------|
| Torre de Hércules | 32 | 29 | 194 | 99,45 |
| Torre de Hércules tras el descuento del aerosol marino | 10 | 18 | 92 | 99,45 |

1.2.3 Efectos en la salud.

Como ya se mencionó en apartados anteriores, la contaminación ambiental es considerada un riesgo para la salud humana. Varios estudios realizados determinaron que el material particulado presente en el aire desempeña un papel importante en la relación entre contaminación ambiental y enfermedades cardiopulmonares. Se han encontrado fuertes relaciones exposición-respuesta entre PM y los efectos a corto y largo plazo (Valavanidis et al., 2008).

De forma general, la normativa y los métodos de muestreo se basan en el tamaño que presenten las partículas, ya que es el factor más relevante a la hora de determinar la mayor o menor penetración de las partículas en las vías respiratorias (MITECO, 2023b).

Distintos grupos de investigadores demostraron que el tamaño de partícula y su área determinan su capacidad para provocar lesiones inflamatorias y daño oxidativo entre los posibles efectos biológicos.

El sistema respiratorio, como se puede ver en la Figura 1, se divide en tres regiones, la extratorácica, el árbol traqueobronquial y la región alveolar. Esta última es la más importante para la retención de PM (Valavanidis et al., 2008).

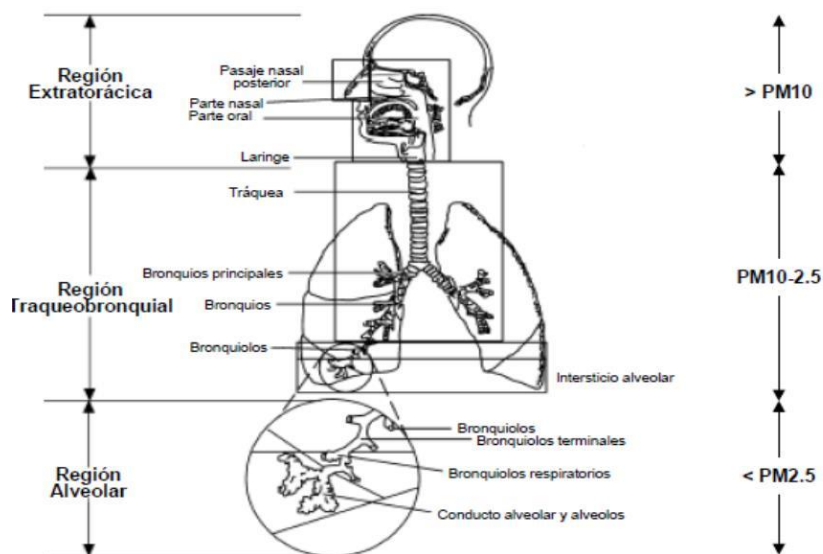


Figura 1: Regiones del aparato respiratorio humano y capacidad de penetración del particulado (según USEPA, 2002) (U.S. Environmental Protection Agency | US EPA).

La materia particulada se puede clasificar en diferentes grupos en función del tamaño, entre ellos destacan dos, PM_{10} (partículas de tamaño igual o menor a $10\ \mu m$ de diámetro, fracción gruesa) y $PM_{2.5}$ (partículas de tamaño igual o menor a $2.5\ \mu m$ de diámetro, fracción fina) (Schwarze et al., 2006). Las más dañinas las $PM_{2.5}$ ya que, al tener un menor tamaño, pueden llegar hasta los alveolos pulmonares. Las de PM_{10} quedan retenidas en la mucosa que recubre las vías respiratorias superiores (Meteogalicia, 2023a).

La llegada del $PM_{2.5}$ a los alveolos permite la entrada de sustancias nocivas zonas sensibles del cuerpo humano lo que implica un aumento de los riesgos patológicos e incluso puede aumentar los riesgos de muerte debido a enfermedades respiratorias (MITECO, 2023a).

1.2.4 Legislación.

Con el fin de establecer un planteamiento general para evaluar la calidad del aire, fijando unos criterios para el uso y la exactitud de las técnicas de evaluación, así como la definición de unos objetivos de calidad que había que alcanzarse mediante una planificación adecuada, la Directiva 96/62/CE del Consejo, modificó la normativa establecida sobre evaluación y gestión de la calidad del aire. Todo ello se recoge en el Real Decreto 102/2011, de 28 de enero, relativo a la mejora de la calidad del aire (BOE, 2011).

En lo referido a evaluación de la calidad del aire ambiente, se establecieron valores límite de partículas $PM_{2.5}$ y PM_{10} con el fin de aumentar la protección para la salud reflejados en la Tabla 3.

Tabla 3: Valores límite legislados para las partículas PM_{10} y $PM_{2.5}$ (BOE, 2011).

| | Período de promedio | Valor límite | Margen de tolerancia | Fecha de cumplimiento del valor límite |
|---|---------------------|---|----------------------------------|--|
| PM_{10} | | | | |
| Valor límite diario | 24 horas | $50\mu\text{g}/\text{m}^3$ ⁽¹⁾ | 50% ⁽²⁾ | En vigor desde 01/01/2005 ⁽³⁾ |
| Valor límite anual | 1 año civil | $40\mu\text{g}/\text{m}^3$ | 50% ⁽²⁾ | En vigor desde 01/01/2005 ⁽³⁾ |
| $PM_{2.5}$ | | | | |
| Valor límite objetivo anual | 1 año civil | $25\mu\text{g}/\text{m}^3$ | — | En vigor desde el 01/01/2010 |
| Valor límite anual (fase I) | 1 año civil | $25\mu\text{g}/\text{m}^3$ | 20% el 11/06/2008 ⁽⁵⁾ | 1 enero de 2015 |
| Valor límite anual (fase II) ⁽⁴⁾ | 1 año civil | $20\mu\text{g}/\text{m}^3$ | — | 1 enero de 2020 |

(1) Este valor no se podrá superar en más de 35 ocasiones por año.

(2) Aplicable solo mientras esté en vigor la exención de cumplimiento de los valores límite concedida de acuerdo con el artículo 23 del Real Decreto 102/2011.

(3) En las zonas en las que se haya concedido exención de cumplimiento, de acuerdo con el artículo 23, el 11 de junio 2011.

(4) Valor límite indicativo que deberá ratificarse como valor límite en 2013.

(5) Este valor debe reducirse el siguiente 1 de enero y, en lo sucesivo, cada 12 meses, en porcentajes idénticos anuales hasta llegar a un 0% el 1 de enero de 2015.

En las Directrices mundiales de la OMS sobre calidad del aire, se establecen también unos niveles recomendados para las partículas que causan daños en la salud. En ellas también se recogen medidas para reducir las concentraciones de dichas sustancias (MITECO, 2023a).

En el Real Decreto 39/2017, de 27 de enero, relativo a la mejora de la calidad del aire (BOE, 2017), en el cual se recogen las modificaciones llevadas a cabo en el Real Decreto 102/2011, se indica que los métodos de referencia que se deben llevar a cabo a la hora de la toma de muestra y medición de las partículas de $PM_{2.5}$ y PM_{10} deben ser los recogidos en la norma UNE-EN 12341:2015 “Aire ambiente. Método de medición gravimétrico normalizado para la determinación de la concentración másica PM_{10} o $PM_{2.5}$ de la materia particulada en suspensión” (UNE, 2015).

En España los niveles de particulado siempre han sido elevados, por lo que, para poder evaluar correctamente la situación con respecto a los contaminantes presentes en el ambiente, es necesario conocer la forma en la que la concentración del particulado se ve incrementada de forma natural por los diversos factores meteorológicos, como la llegada de polvo sahariano o el aerosol marino en zonas costeras. Es por esto, por lo que, la legislación recoge también procedimientos para controlar en qué medida se ven afectados los niveles de contaminantes por estos factores naturales (en el Real Decreto 102/2011 artículo 22.2 y en la Directiva 2008/50/CE artículo 20) (MITECO, 2023a).

1.3 Antecedentes, innovación del método y cambios.

Desde años atrás, los estudios epidemiológicos realizados demostraron la relación que existe entre el particulado atmosférico y los efectos sobre la salud humana. Uno de los efectos más importantes es el estrés oxidativo (Calas et al., 2017). La relación que existe entre la exposición a PM y sus efectos todavía no son claros, sin embargo, sí existe un consenso cada vez más aceptado sobre la causa de este estrés (Pietrogrande et al., 2018). Este se produce por un desequilibrio en los procesos redox celulares y por la presencia (en exceso) de ROS (Schiavo et al., 2022).

La generación catalítica de estas especies se produce por la oxidación de diversas moléculas por la presencia de PM. Este proceso se puede evaluar mediante medidas de PO, el cual se considera un indicador que nos permite estimar la capacidad del PM para generar el estrés oxidativo (Wu et al., 2022). Además, este parámetro engloba mucha información acerca del particulado, así como su composición, efecto del tamaño o propiedades de la superficie (Calas et al., 2017).

Una de las razones por las cuales el PO es un indicador del riesgo para la salud mejor que la concentración en masa de PM, es debido a que no todas las partículas presentes en el particulado contribuyen de igual forma a la toxicidad que causa. Los sulfatos o nitratos presentan baja toxicidad, pero incrementan bastante la masa de particulado, en cambio, metales de transición o compuestos orgánicos contribuyen de forma inversa (Calas et al., 2017).

Aunque se han realizado trabajos previos sobre este tema, los más recientes concluyeron que la medida de la fracción depositada en los pulmones es más informativa, a nivel toxicológico, que las concentraciones presentes en el medio ambiente (Fang et al., 2019). Esto hace referencia a la bioaccesibilidad de las partículas, definida como la cantidad máxima de compuesto que podría disolverse en un fluido corporal y que, por tanto, se vuelve disponible para poder ser absorbida por el organismo (Collins et al., 2015).

Atendiendo a esto, el estudio de la fracción máxima que sería capaz de solubilizarse en los fluidos pulmonares (fracción bioaccesible) puede ser considerado el método más útil para evaluar los riesgos que causa la exposición al PM. Sin embargo, la falta de consenso a la hora de establecer un protocolo o una composición de los SLF bien definida dificulta la interpretación de los datos y comparación de los métodos (Kastury et al., 2017). Entre los problemas que causa está la alta variabilidad de los métodos de extracción de la fracción bioaccesible, lo que incluye las condiciones en las que se debe realizar, como pH o la temperatura (Calas et al., 2017).

Existen diferentes tipos de ensayos para llevar a cabo la determinación de PO, sin embargo, los *in-vitro* son más rápidos, más sencillos de realizar y menos costosos (requieren un menor consumo de reactivos y material) que los *in-vivo*, lo que permite realizar análisis de grandes conjuntos de datos en un menor periodo tiempo (Bates et al., 2019).

Podemos encontrar diferentes ensayos *in-vitro* en los que se mide la producción de ROS de forma directa o indirecta, por ejemplo, dentro de los de medida indirecta podemos encontrar los ensayos de resonancia de spin electrónica, ácido ascórbico

(AA), ditiotreitól (DTT) o el de glutatión (Bates et al., 2019; Pietrogrande et al., 2018). De estos ensayos existentes, los más usados son el de ditiotreitól y de ácido ascórbico, en los que se mide precisamente el consumo de estas dos sustancias a lo largo del tiempo. Cada uno de estos ensayos es sensible a compuestos diferentes, el ensayo de AA es más sensible a la presencia de iones metálicos de transición, mientras que el de DTT se ve más influenciado por la presencia de compuestos orgánicos, aunque también es sensible a los metales (Fang et al., 2019).

Para llevar a cabo la medida del PO se suelen emplear sustancias que actúen como sustituto a algún agente antioxidante presente en los líquidos pulmonares, como por ejemplo el DTT o el AA, asumiendo que la descomposición de estos es proporcional a la formación de ROS (Fang et al., 2019). El DTT simula agentes reductores biológicos como el glutatión (GHS) y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) (Calas et al., 2017), mientras que el AA es un antioxidante real que se encuentra en los fluidos que recubren las vías respiratorias. Lo que se pretende es simular la interacción existente entre el PM y la célula que genera los ROS (Pietrogrande et al., 2018).

A la hora de realizar la extracción de la fracción bioaccesible del particulado, para poder llevar a cabo las medidas de potencial, se necesita un medio de extracción. Por lo general, en estudios realizados se suele emplear metanol o agua Milli-Q (Calas et al., 2017; Song et al., 2021), medios que no son representativos de las condiciones fisiológicas humanas. Es por esto que se empezaron a utilizar los fluidos pulmonares sintéticos con los que se puede observar el impacto de los componentes de los fluidos en los valores del potencial (Calas et al., 2017).

Dentro de los fluidos pulmonares sintéticos existentes se realiza una diferenciación en función de las regiones pulmonares y del tamaño de partícula analizada, ya que la penetración del particulado es distinta y la producción de ROS varía en las diferentes regiones del tracto respiratorio (Fang et al., 2019; Pietrogrande et al., 2018). En la Figura 2 podemos visualizar gráficamente esta diferenciación, donde A representa la región alveolar, B la región bronquial y ET la región extratorácica. Total ELF representa la concentración de ROS si tuviese lugar una deposición homogénea del particulado en el fluido y sin tener en cuenta la dependencia de la deposición con el tamaño de partícula en las distintas regiones respiratorias. A mayores se representan dos zonas de toma de muestra (zona urbana y las afueras de la ciudad) para poder realizar una comparación sobre la producción de ROS en función del entorno (Fang et al., 2019).

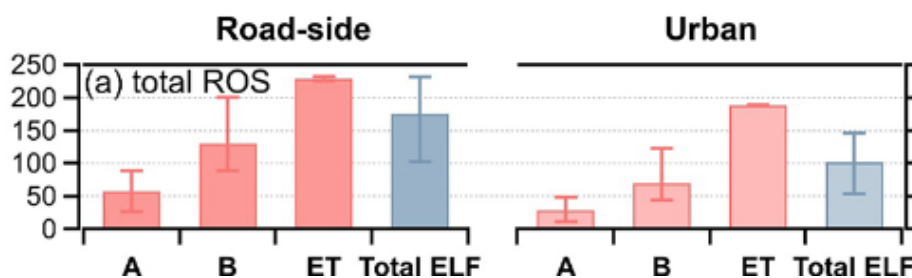


Figura 2: Concentración de ROS (nmol/L) en diferentes zonas del tracto respiratorio
(Fang et al., 2019).

Finalmente, habiendo visto los estudios realizados hasta el momento y atendiendo a las condiciones en las que se realizan, en este trabajo se centra la atención en la medida del potencial oxidativo de la fracción bioaccesible del PM en el pulmón sin hacer hincapié en la composición del particulado, simplemente se pretende analizar los efectos que produce la fracción soluble en el líquido pulmonar (en su conjunto) al entrar en contacto con los componentes del fluido. Las únicas diferenciaciones que se realizan son con respecto al tamaño de partícula, ya que, como previamente se mencionó, las partículas de menor tamaño penetran más en el aparato respiratorio y es por esto por lo que se emplea un fluido diferente en PM_{2.5} que en PM₁₀ (fluido ALF y Gamble respectivamente) para hacer referencia a las diferentes regiones del tracto.

Dentro de las innovaciones de este estudio, se encuentran las condiciones en las que se realiza ya que, como se pudo comprobar en la bibliografía consultada, la mayoría de los trabajos previos emplean condiciones alejadas a las fisiológicas usando métodos de extracción exhaustivos y medios de extracción que benefician o incrementan las solubilidades de los componentes del particulado (metanol, agua, diclorometano...) (Calas et al., 2017; Song et al., 2021).

Tabla 4: Diferentes métodos de extracción para ensayos de DTT (Song et al., 2021).

| Publicación | Muestra | Disolvente | Método de extracción |
|----------------------------------|--|------------------------------------|--|
| (Patel & Rastogi, 2018) | PM _{2.5} (cuarzo)* | MeOH:H ₂ O 1:1 | Ultrasonidos 30min |
| (Yang et al., 2014) | PM _{2.5} (cuarzo) PM _{2.5} (teflón) | MeOH MeOH, Agua | Ultrasonidos Ultrasonidos 5min |
| (Janssen et al., 2014) | PM _{2.5} , PM ₁₀ (teflón) | MeOH | Ultrasonidos 20- 30s. |
| (Wang et al., 2018) | PM _{2.5} (cuarzo) | Agua | Ultrasonidos 1h |
| (Eiguren-Fernandez et al., 2010) | PM _{2.5} (teflón con fibra de vidrio) | Agua Diclorometano | Ultrasonidos 30min Ultrasonidos 30min |
| (Pietrogrande et al., 2018) | PM ₁₀ (teflón) | 10 mL de tampón 0,1M, pH 7.4 | Ultrasonidos 15min |
| (Romano et al., 2020) | PM ₁₀ (cuarzo) | 10 mL de tampón 0,1M, pH 7.4 | Ultrasonidos 15min |
| (Calas et al., 2017) | PM _{2.5} (cuarzo) | SLF | Vortex a máxima velocidad 2h a 37°C |

*Se indica entre paréntesis el material del filtro de muestreo.

Tabla 5: Diferentes métodos de extracción para ensayos de AA

| Publicación | Muestra | Disolvente | Método de extracción |
|-----------------------------|--------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| (Frezzini et al., 2022) | PM ₁₀ | Agua desionizada | Agitación rotatoria |
| (Pietrogrande et al., 2022) | PM _{2.5} , PM ₁₀ | 10 mL de tampón 0,1M, pH 7.4 | Ultrasonidos 15min |
| (Janssen et al., 2014) | PM _{2.5} , PM ₁₀ | MeOH | Ultrasonidos 20-30s. |
| (Calas et al., 2019) | PM ₁₀ | Gamble con un surfactante | Vortex a 37°C |

En las Tablas 4 y 5 se recogen algunos de los métodos de extracción utilizados en otros estudios. El empleo de la energía de ultrasonidos o agitación vortex incrementa la cantidad de compuestos que se disuelven en medios de extracción debido a la fuerza ejercida para extraer el particulado. Esto da como resultado valores de potencial oxidativo más elevados a los esperados en el cuerpo humano, ya que estas condiciones se alejan bastante de las fisiológicas, y por tanto se relaciona con valores elevados de estrés oxidativo que dan una idea errónea de los efectos en la salud de la exposición a estos contaminantes analizados.

Las condiciones empleadas en este estudio cuentan con una extracción a temperatura constante de 37 °C con agitación a 130 rpm y en un líquido pulmonar sintético (Gamble y ALF). Con esto se pretende conseguir unos resultados que se aproximen más a los esperados en el cuerpo humano y que den unos valores de potencial oxidativo y, por consiguiente, de estrés oxidativo más afines a la realidad.

2. Objetivo del trabajo

Como se mencionó en apartados anteriores, el estudio de la calidad del aire, así como los efectos negativos que produce en la salud humana, es un tema recurrente en la actualidad. Esto hace que haya numerosos estudios relacionados con este tema y muy diversos en cuanto a método utilizado, condiciones del ensayo y parámetros a determinar. Sin embargo, muchos de ellos coinciden en el uso del potencial oxidativo como indicador de riesgo para la salud.

En este trabajo se pretende llevar a cabo una estimación del potencial oxidativo producido por la penetración del particulado atmosférico, concretamente PM₁₀ y PM_{2.5}, en el cuerpo humano por medio de las vías respiratorias y obtener unos resultados que den una visión lo más realista posible sobre lo que sucede en el organismo.

Para poder cumplir con esto se emplean dos ensayos *in-vitro* diferentes (DTT y AA) y una serie de condiciones que simulan de la forma más próxima posible las condiciones fisiológicas a la que se supone que se enfrentarían en procesos reales.

- Como medio de extracción se estudian dos fluidos pulmonares sintéticos, Gamble y ALF (pH 7,4 y pH 4,5 respectivamente).
- Como método de extracción se emplea una incubación a 37°C con agitación leve durante 24h.

Lo más novedoso de este estudio es la medida del PO de la fracción bioaccesible sin hacer referencia a la composición del particulado, centrandolo en lo que genera la penetración de dichos componentes en su conjunto al entrar en contacto con los fluidos corporales. Asimismo, es novedoso el uso del fluido ALF para las muestras de PM_{2.5} para hacer referencia a la distinta capacidad de penetración del particulado en función del tamaño de partícula y su uso para reflejar el cambio de las condiciones del medio en función de la región del aparato respiratorio en el que nos encontremos.

Este Trabajo forma parte del Proyecto de Investigación “Biodisponibilidad *in-vitro* inhalatoria/oral/dérmica de contaminantes emergentes en materia particulada atmosférica, polvo urbano y microplásticos: Predicción de la toxicidad (Referencia: PID2021-125201OB-I00)” financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y “FEDER Una manera de hacer Europa”. Convocatoria: 2021 “Proyectos de Generación de Conocimiento” en el marco del Programa Estatal para Impulsar la Investigación Científico-Técnica y su Transferencia, del Plan Estatal de Investigación Científica, Técnica y de Innovación 2021-2023. Extracto publicado en el "Boletín Oficial del Estado" de de 13 de noviembre de 2021). Duración: 01/09/2022-01/09/2025.

3. Parte experimental

3.1 Cronograma

| FEB | | | | | | |
|-----|----|----|----|----|----|----|
| L | M | Mi | J | V | S | D |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 |
| 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 |
| 27 | 28 | | | | | |

| MAR | | | | | | |
|-----|----|----|----|----|----|----|
| L | M | Mi | J | V | S | D |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 |
| 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 |
| 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | | |

| ABR | | | | | | |
|-----|----|----|----|----|----|----|
| L | M | Mi | J | V | S | D |
| | | | | | 1 | 2 |
| 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
| 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 |
| 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |

| MAY | | | | | | |
|-----|----|----|----|----|----|----|
| L | M | Mi | J | V | S | D |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
| 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 |
| 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 |
| 29 | 30 | 31 | | | | |

| JUN | | | | | | |
|-----|----|----|----|----|----|----|
| L | M | Mi | J | V | S | D |
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 |
| 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | | |

| JUL | | | | | | |
|-----|----|----|----|----|----|----|
| L | M | Mi | J | V | S | D |
| | | | | | 1 | 2 |
| 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
| 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 |
| 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |
| 31 | | | | | | |

| Leyenda | |
|---------|---|
| | Toma de muestra. |
| | Trabajo en el laboratorio. |
| | Redacción del trabajo y lectura de artículos. |
| | Lectura de artículos. |

3.2 Material y reactivos

3.2.1 Reactivos

Todas las disoluciones se llevan a cabo en agua Mili-Q, salvo que se indique lo contrario, con resistividad de $18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$ producida por un sistema de purificación de agua Wasserlab modelo Autwomatic plus 1+2.

- Ácido clorhídrico 37% (HCl), Panreac (Barcelona, España). CAS-nº: 7647-01-0
- Disolución tampón fosfato 0,1M, pH=7,4.
 - Fosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4), Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). CAS-nº: 7558-79-4
 - Sodio dihidrógeno fosfato monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), Panreac (Barcelona, España). CAS-nº: 10049-21-5

- Disolución DTT.
 - 1,4-Ditiotreitol (DTT), Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). CAS-nº: 3283-12-3
- Disolución ácido ascórbico.
 - Ácido ascórbico, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). CAS-nº: 50-81-7
- Disolución de ácido tricloroacético 10%.
 - Disolución de ácido tricloroacético al 20% p/v, Panreac (Barcelona, España). Código: 252373
- Disolución DTNB 0,01M en disolución fosfato.
 - Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitro-benzoico) (3,3'-6) (DNTB), Sigma.Aldrich (St. Louis, MO, USA) CAS-nº: 69-78-3
- Disolución tampón tris-HCl 0,4M, pH=8,9
 - Tris(hidroximetil)aminometano (Tris base), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) CAS-nº: 77-86-1
 - Ácido etilendiaminotetraacético (AEDT), Panreac (Barcelona, España) CAS-nº: 6381-92-6
- Disoluciones Gamble y ALF.
 - Sales comunes en ambos fluidos:**
 - Cloruro de magnesio ($MgCl_2$), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) CAS-nº: 7786-30-3
 - Cloruro sódico (NaCl), Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). CAS-nº: 7647-14-5
 - Fosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4), Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). CAS-nº: 7558-79-4
 - Sulfato sódico anhidro (Na_2SO_4), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) CAS-nº: 7757-82-6
 - Cloruro cálcico dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). CAS-nº: 10035-04-8
 - Citrato de sodio, pureza del 99,0%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) CAS-nº: 6132-04-3
 - Sales Gamble:**
 - Cloruro de potasio (KCl), Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). CAS-nº: 7447-40-7
 - Acetato sódico anhidro, Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). CAS-nº: 127-09-3
 - Bicarbonato sódico ($NaHCO_3$), pureza del 99,5-100%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) CAS-nº: 144-55-8
 - Sales ALF:**
 - Hidróxido sódico (NaOH), Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). CAS-nº: 1310-73-2
 - Ácido cítrico, pureza del 99,5%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) CAS-nº: 77-92-9
 - Glicina, pureza del 98,5%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) CAS-nº: 56-40-6

- Tartrato de sodio dihidratado, pureza del 99%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) CAS-nº: 6106-24-7
- Lactato sódico, pureza del 99,0%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) CAS-nº: 867-56-1. (Se conserva en nevera).
- Piruvato sódico, pureza del 99%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) CAS-nº:113-24-6. (Se conserva en nevera).

3.2.2 Instrumentación y material

- pH-Metro Crison (Barcelona, España), modelo micropH 2001.
- Espectrofotómetro Perkin Elmer (Norwalk, USA), modelo Lambda 6 UV/VIS.
- Centrífuga Eppendorf (Madrid, España), modelo Centrifuge 5804.
- Baño de ultrasonidos J.P.Selecta (Barcelona, España), modelo ULTRASONNS-HD con calefacción.
- Balanza analítica Sartorius (Gottingen, Alemania), modelo ME 215P con precisión de $\pm 0,00001$ g.
- Balanza analítica A&D, modelo ER-180A (Thebarton SA, Australia) con precisión de $\pm 0,0001$ g.
- Balanza granataria GRAM, modelo serie SV-510ix (Barcelona, España) con precisión de $\pm 0,001$ g.
- Incubadora J.P.Selecta (Barcelona, España) formada por una cámara incubadora Boxcult y un agitador orbital y de vaivén Rotabit.
- Micropipetas mecánicas Eppendorf Research, volúmenes de 10-100 μ L, 20-200 μ L, 0,5-5 mL.
- Micropipeta mecánica Gilson PIPETMAN Classic, volumen 100-1000 μ L.
- Sacabocados de acero de diámetro 0,5cm, J.P.Selecta.
- Filtros de fibra de cuarzo de 15 cm de diámetro de PM₁₀ y PM_{2.5}.
- Cubetas de cuarzo con tapa de 1cm de ancho.
- Material de uso común en el laboratorio.

El material de vidrio necesario se sumerge en un baño de jabón alcalino con agua Mili-Q durante 24/48h antes de su uso. Tras el baño, se aclara el material con agua de grifo y posteriormente con agua Mili-Q. Para facilitar el secado del material se emplea un poco de acetona tras el aclarado.

3.3 Selección de la muestra.

Para la realización de este trabajo se hace uso de las muestras obtenidas gracias a los estudios realizados por la Rede de Calidad del Aire de Galicia, en los que se tiene en cuenta la normativa gallega descrita en la Ley 8/2002, para verificar el cumplimiento de los objetivos definidos para la calidad del aire y para establecer actuaciones de mejora o mantenimiento de la calidad del aire (Macho-Eiras et al., 2021).

3.3.1 Zona de muestreo

La Rede de Calidade del Aire de Galicia tiene implantado el criterio más restrictivo de aglomeración aplicando la Ley 8/2002 que define aglomeración como área con una concentración de población de más de 50.000.

De esta forma, las aglomeraciones consideradas a efectos de la evaluación de la calidad del aire en Galicia y en las que es obligatorio instalar estaciones fijas de medida de los contaminantes en aire ambiente son: A Coruña, Ferrol, Santiago de Compostela, Pontevedra, Vigo, Lugo y Ourense.

Hay diferentes tipos de estaciones de medida de los contaminantes en el aire en función de la fuente de emisión principal y según el tipo de área en el que se encuentran (Macho-Eiras et al., 2021).

En nuestro caso, hacemos uso de los filtros obtenidos en 2021 de la estación de A Coruña situada en la Torre de Hércules (Figura 3), que pertenece a las 12 estaciones que forman la red de la Xunta de Galicia. Esta estación se corresponde con una estación de fondo suburbana, lo que significa que no hay una fuente de emisión predominante y está situada en una zona con presencia continuada de edificios separadas por zonas no urbanizadas (Macho-Eiras et al., 2021). Está situada a 200 m del mar, cerca del paseo marítimo y de la Torre de Hércules, en el recinto del C.I.F.P. Ánxel Casal de Monte Alto (Macho-Eiras et al., 2016).

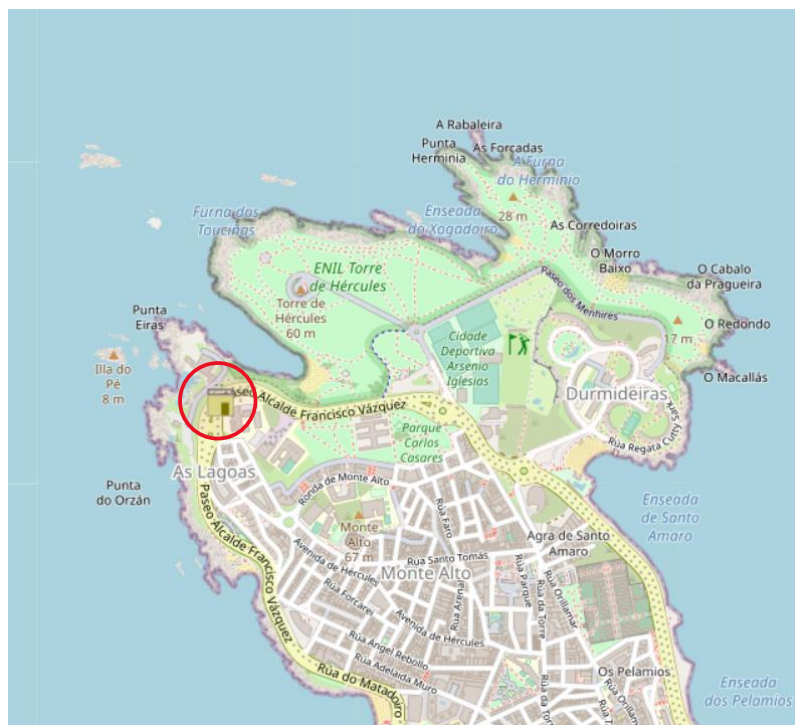


Figura 3: Localización de la estación de calidad del aire Torre de Hércules (Meteogalicia, 2023b).

La estación de la Torre de Hércules (Figura 4) está dotada con varios analizadores en continuo en los que se muestrea, entre otros, partículas de diámetro inferior a 10 micras (PM₁₀) y a 2.5 micras (PM_{2.5}) (Macho-Eiras et al., 2016).



Figura 4: Captadores gravimétricos con cabezales PM_{10} y $PM_{2.5}$ Torre de Hércules
(Macho-Eiras et al., 2016).

3.3.2 Método de muestreo.

Para llevar a cabo la toma de muestra de PM_{10} y $PM_{2.5}$ se emplean captadores gravimétricos de alto volumen tipo CAV Digitel DHA-80 (Hegnau, Suiza) y MCV CAV-A/Msb (Macho-Eiras et al., 2016) que se basan en métodos de absorción Beta y siguen las indicaciones de la norma UNE-EN 16450:2017 (UNE, 2017).

El funcionamiento de los captadores consiste en que el aire se hace pasar por los cabezales, a causa de una bomba de aspiración, y atraviesa los filtros donde quedan retenidas las partículas del diámetro seleccionado, posteriormente el aire sale por el otro extremo del equipo. El captador cuenta con sensores que determinan el caudal de aspiración y programadores que registran el tiempo durante el cual se realiza el muestreo (Esperón-Porto et al., 2020).

El Real Decreto 39/2017 establece que el método de referencia para la toma de muestra y la medición de PM_{10} y $PM_{2.5}$ es el que se describe en la Norma UNE-EN 12341:2015 "Aire ambiente. Método de medición gravimétrico para la determinación de la concentración másica PM_{10} o $PM_{2.5}$ de la materia particulada en suspensión". Los responsables de llevar a cabo el pretratamiento de los filtros es el Laboratorio de Medio Ambiente de Galicia (LMAG), que es un laboratorio acreditado por ENAC para este procedimiento (Meteogalicia, 2022). Según lo expuesto en la norma citada anteriormente, las mediciones se realizan empleando captadores con cabezales normalizados y con un caudal nominal de $30 \text{ m}^3/\text{h}$ durante un periodo de muestreo de 24 horas. Los resultados obtenidos se expresan en $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (UNE, 2015).

Para llevar a cabo la toma de muestra se emplean filtros de fibra de cuarzo Ahlstrom Munksjö MK360 (Falun, Suecia) de 150 mm de diámetro (Sánchez-Piñero et al.,

2021), estos se someten a una precalcificación a 400°C durante unas 12 horas para eliminar posibles contaminaciones orgánicas. A continuación, se acondicionan durante 48 horas a 20±1°C de temperatura y 50±5 % de humedad relativa en la sala de balanzas antes de realizar la primera pesada de los filtros (Moreda-Piñero et al., 2015). Los filtros se manejan con pinzas de teflón para evitar contaminaciones y se comprueban con lámpara de luz visible, antes de su uso, para detectar posibles defectos. Antes de cada sesión se verifica también el correcto funcionamiento de las balanzas analíticas (Meteogalicia, 2022).

La determinación gravimétrica de masa se emplea una microbalanza (Sartorius Genius, Gottingen, Alemania) (Sánchez-Piñero et al., 2021).

Los filtros blancos que se usan en el muestreo se pesan dos veces en intervalos de 24 horas para comprobar si el filtro es estable para poder emplearlo posteriormente. Si el resultado es positivo, se calcula la media de las dos pesadas y se toma dicho valor como masa del filtro blanco.

Tras el muestreo, los filtros con materia particulada se guardan en la sala de balanzas un mínimo de 24 horas antes de realizar la primera pesada y después de 24-72 horas se realiza una segunda. Si la diferencia entre ambas no es superior a 800 µg, se calcula la media como en el caso de los filtros blancos y dicho valor se registra como peso del filtro muestreado.

Con estos datos se calcula la masa de PM por diferencia entre el filtro blanco y el muestreado y se almacenan en una base de datos en la que las masas se muestran referidas al volumen de muestreo (µg PM₁₀/m³ o µg PM_{2.5}/m³) (Meteogalicia, 2022).

Los filtros se conservan posteriormente a una temperatura de -18°C en un congelador hasta el momento de su tratamiento durante el análisis (Sánchez-Piñero et al., 2021).

3.3.3 Muestra analizada

Para el análisis no se emplea el área total del filtro que llega al laboratorio ya que son muestras únicas y son necesarias para más estudios. Es por esto que se realiza un estudio previo acerca de la cantidad mínima de muestra necesaria. Para ello, se toman varias porciones del filtro (empleando un sacabocados de 1,2cm de diámetro) y se les realiza el procedimiento extracción que se va a emplear durante el posterior estudio para poder determinar con qué cantidad de área muestreada se consigue una sensibilidad y precisión del método más idónea. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se determinó que el área que proporciona unos resultados adecuados es de 5,65 cm², por tanto, para conseguir esta superficie de muestra se realizan 30 sacabocados de 0,5 cm de diámetro obteniendo un total de área muestreada de 5,89 cm².

Para poder realizar un estudio anual a cerca del potencial oxidativo causado por la contaminación, se lleva a cabo una toma de muestra mensual cortando un total de 30 trozos de filtro pertenecientes, cada uno, a días distintos dentro de cada mes del año estudiado.

Los días seleccionados durante la toma de muestra realizada para PM₁₀ y PM_{2.5} se muestran en las Tablas 13 y 14 situada en el Anexo 1.

Es necesario realizar también una toma de muestra de blancos de campo para la realización del análisis. Se preparan blancos de campo compuestos cortando filtros de diferentes meses, generando así muestras anuales. Los días seleccionados para el muestreo de los blancos se ven reflejados en la Tabla 15 del Anexo 1.

Finalmente, se obtienen un total de 10 muestras mensuales de PM₁₀, 10 muestras mensuales de PM_{2.5} y un total de 14 blancos de campo compuesto (muestras anuales).

Cada conjunto de filtros que componen cada muestra se guarda en sobres individuales de papel de aluminio dentro de una bolsa plástica en el congelador a una temperatura de -18°C.

3.4 Selección de los fluidos pulmonares sintéticos

Para poder llevar a cabo el análisis *in-vitro* con el que se pretende determinar el potencial oxidativo que causa la contaminación ambiental mediante un estudio relacionado con la bioaccesibilidad pulmonar del PM, es necesario seleccionar los fluidos sintéticos en los cuales se va a desarrollar la extracción de PM. Estos fluidos sintéticos simulan los líquidos pulmonares humanos y nos permiten obtener una visión bastante fiable sobre lo que ocurre en el cuerpo.

Como previamente se comentó, existe una falta de consenso acerca de la composición de SLF. Se ha usado, de forma habitual, el agua como SLF debido a ciertas ventajas en su aplicación (Kastury et al., 2017) pero existen otras muchas soluciones que representan las diferentes condiciones de las regiones pulmonares (Boisa et al., 2014).

En el estudio realizado se han usado dos SLF diferentes. El fluido sintético pionero en este tipo de estudios es el denominado solución de Gamble, este ha sufrido varios cambios en su composición inicial pero el nombre se mantiene (Boisa et al., 2014). Este fluido simula el líquido que recubre el epitelio pulmonar, presenta un pH de 7,4 y consiste en un equilibrio de cationes y aniones procedentes de diferentes sales (Kastury et al., 2017).

Otra de las soluciones empleadas es la denominada fluido lisosomal artificial (ALF), presenta un pH de 4,5 y simula la composición del interior de los lisosomas de los macrófagos alveolares (Kastury et al., 2017).

La composición empleada para la preparación del líquido simulado ALF es la adaptación propuesta por Midander et al. (2007) (Kastury et al., 2017; Midander et al., 2007) y la composición de la solución Gamble empleada es la propuesta también por Midander et al. (Sánchez-Piñero et al., 2021). Los datos teóricos acerca de la composición se muestran en la Tabla 6 que se muestra a continuación.

Tabla 6: Cantidades teóricas para la preparación de los fluidos sintéticos.

| Gamble | | ALF | | | |
|----------------------------------|--------------------------|----------------------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| | pH=7,4 | | pH=4,5 | | |
| Reactivo | Cantidad (g) para 250 ml | Reactivo | Cantidad (g) para 250 ml | Reactivo | Cantidad (g) para 250 ml |
| MgCl ₂ | 0,0243 | MgCl ₂ | 0,127 | Tartrato Na·2H ₂ O | 0,023 |
| NaCl | 1,5079 | NaCl | 0,804 | Lactato Na | 0,0215 |
| KCl | 0,0750 | Na ₂ HPO ₄ | 0,018 | Piruvato Na | 0,022 |
| Na ₂ HPO ₄ | 0,0318 | Na ₂ SO ₄ | 0,01 | | |
| Na ₂ SO ₄ | 0,0160 | CaCl·2H ₂ O | 0,032 | | |
| CaCl·2H ₂ O | 0,0919 | NaOH | 1,5305 | | |
| Acetato Na·H ₂ O | 0,1451 | Ácido cítrico | 5,23 | | |
| NaHCO ₃ | 0,6511 | Glicina | 0,015 | | |
| Citrato Na·2H ₂ O | 0,0245 | Citrato Na·2H ₂ O | 0,0195 | | |

Para ajustar el pH de ambos fluidos sintéticos al valor requerido se emplea un pH-Metro Crison, una disolución HCl al 37% para la solución Gamble y NaOH para ALF. Si el pH se acidifica demasiado en la solución Gamble, se aumenta la basicidad añadiendo unas gotas de disolución de NaOH de concentración aproximada 1M.

3.5 Técnicas usadas y procedimiento.

Para la realización de este trabajo se han realizado dos tipos de extracciones diferentes en medio acuoso y un análisis espectrofotométrico, para la obtención de datos, empelando dos ensayos distintos (DTT y AA).

3.5.1 Extracciones en medio acuoso.

Se realizan extracciones en dos medios acuosos diferentes, previamente detallados en el apartado 3.4. Uno de ellos es la disolución Gamble que simula los fluidos intersticiales que se encuentran dentro del pulmón, y la otra la disolución ALF que simula el líquido de revestimiento alveolar humano.

Para simular de una forma más exacta las condiciones de extracción en el cuerpo humano se realiza una extracción en incubadora durante 24h en unas condiciones de 37°C y una agitación constante de 130rpm. Con este tipo de extracción se consigue una visión y unos resultados más realistas de la fracción bioaccesible de PM.

De igual forma, se realizó una extracción más exhaustiva empleando un baño de ultrasonidos durante 30 min a una temperatura de 40°C. Con esta extracción se quiso comprobar si era posible una extracción de particulado mayor en los ensayos de DTT con la disolución ALF para una posterior comparación de resultados.

El procedimiento a seguir para poner a incubar las muestras antes de poder realizar las medidas es el siguiente. Primero se sacan del congelador las muestras, para que alcancen temperatura ambiente, y se prepara la disolución requerida (Gamble para PM₁₀ o ALF para PM_{2.5}). En tubos de centrifuga se introducen, usando pinzas de acero, los 30 sacabocados que forman cada una las muestras y blancos. En cada tubo, se vierten sobre los filtros unos 20 mL de disolución, medidos con probeta, y se cierran. Se colocan en una gradilla y se introducen en la incubadora durante las 24h necesarias. En el caso de la extracción por ultrasonidos, se introduce la gradilla en el baño durante 30min y una vez pasado el tiempo ya se puede continuar con la segunda parte práctica en el propio día.

3.5.2 Análisis espectrofotométrico.

Los análisis espectrofotométricos emplean la luz para poder medir las concentraciones químicas. Se miden valores de absorbancia, A, que se pueden relacionar posteriormente con los valores de concentración de la especie que absorbe la luz mediante el uso de la *ley de Lambert-Beer*. Esta ley se define con la expresión:

$$A = \epsilon bc \quad (\text{ec.1})$$

La concentración, c, se expresa en unidades de molaridad (mol/L) y el camino óptico, b, en unidades de centímetro. El coeficiente de extinción molar, ϵ , es característico de cada sustancia y se expresa con unidades de M⁻¹cm⁻¹ dando lugar así a un valor de absorbancia adimensional. Los valores de A y ϵ dependen de la longitud de onda seleccionada.

La *ley de Lambert-Beer* se cumple especialmente en disoluciones diluidas con concentraciones menores o iguales a 0,01M. A concentraciones muy elevadas se pierde la linealidad a causa de la proximidad de las moléculas de soluto que interaccionan modificando sus propiedades, esto impide que se cumpla la proporcionalidad entre absorbancia y concentración (Harris, 2016).

Para llevar a cabo las medidas de absorbancia se emplean dos ensayos distintos, el de DTT y el de AA.

3.5.2.1 Ensayo del DTT.

En este ensayo se necesita depositar en un vial topacio 3 mL de la fracción bioaccesible, previamente centrifugadas durante 5min a 3000rpm, y en una cubeta de cuarzo 0,5 mL de ácido tricloroacético. Sobre los 3 mL de la fracción bioaccesible se añaden 30 μ L de disolución de DTT y se agita haciendo movimientos circulares, rápidamente se cogen 0,5 mL del vial y se vierten sobre el ácido tricloroacético de la cubeta para parar la reacción. Se añaden también en la cubeta 50 μ L de disolución de DTNB y se esperan 2 min para añadir 2 mL del tampón Tris-HCl (en este momento la disolución incolora adquiere un tono

amarillo). Una vez añadido el tampón, se tapa la cubeta y se agita para tomar la medida en el espectrofotómetro.

El contenido del vial de topacio se guarda para realizar las siguientes medidas, ya que se necesita ir tomando alícuotas de 0,5 mL del vial cada 5min durante un tiempo total de 20min. El procedimiento se repite de forma que se consiga parar la reacción, al poner en contacto la alícuota de sobrenadante con el ácido, al pasar 5min desde la última vez que se paró en la medida anterior. En la Figura 5 se pueden observar cuales son las reacciones que tienen lugar durante el ensayo de DTT y que permiten llevar a cabo las medidas absorbancia frente al tiempo.

Para la realización de las medidas el espectrofotómetro debe estar a una longitud de onda seleccionada de $\lambda=412$ nm.

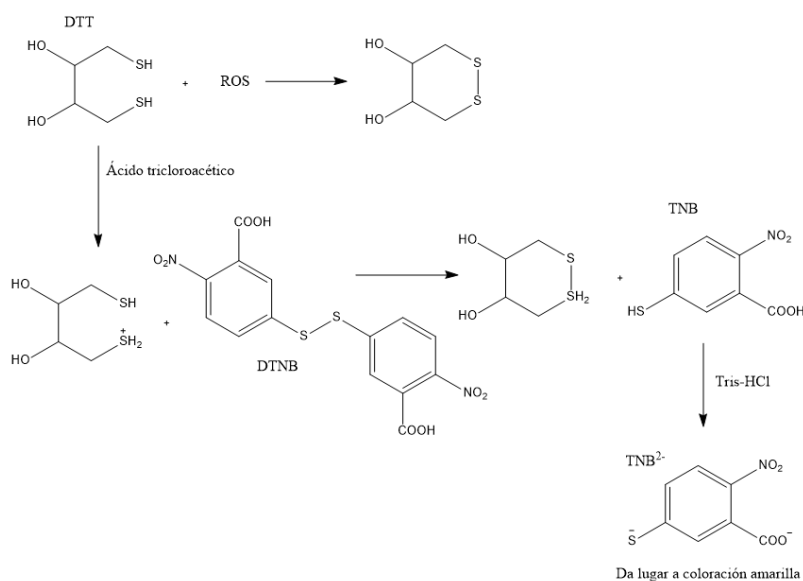


Figura 5: Esquema de las reacciones del ensayo de DTT, realizado con ChemDraw.

3.5.2.2 Ensayo del AA.

En este ensayo se necesita añadir en una cubeta de cuarzo 3mL de la fracción bioaccesible de las muestras, previamente centrifugadas durante 5min a 3000rpm. Sobre los 3 mL se añaden 30 μ L de disolución de ácido ascórbico, rápidamente se tapa y agita para iniciar las medidas en el espectrofotómetro. El equipo debe estar a una longitud de onda seleccionada de $\lambda=265$ nm y se deben tomar valores de absorbancia cada 2min durante un total de 20min. En la Figura 6 se puede observar cual es el proceso de reducción del ácido ascórbico que tiene lugar durante el ensayo de AA.

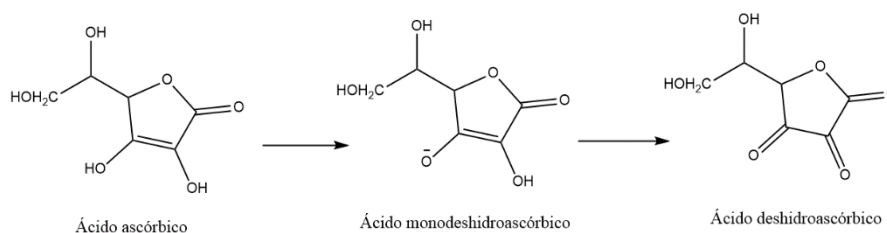


Figura 6: Esquema de la reducción del AA durante el ensayo, realizado con ChemDraw.

4. Resultados y discusión

Una vez finalizada la parte experimental, los datos obtenidos de absorbancia frente al tiempo se recogen y tratan en el programa Microsoft Excel (versión 2303).

4.1 Tratamiento de los datos.

4.1.1 Cálculo del coeficiente de extinción molar.

Con los datos obtenidos experimentalmente que se muestran en las Tablas 16-23 del Anexo 2 se elabora una recta (Absorbancia vs Tiempo) para comprobar la tendencia lineal que presentan los datos. Esto nos permite estimar si se cumple de forma aceptable la *Ley de Lambert-Beer* (previamente explicada en el apartado 3.5.2) para poder obtener el valor del coeficiente de extinción molar.

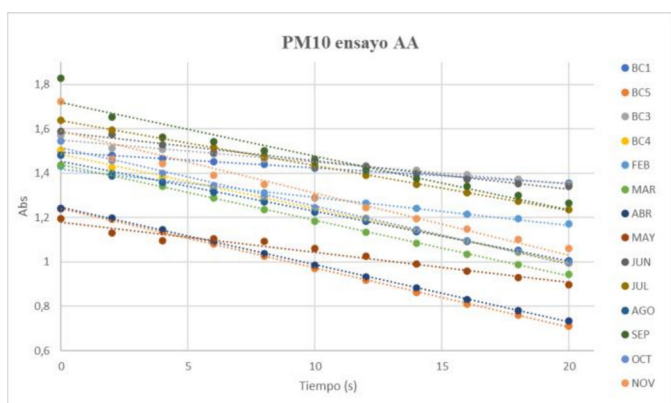


Figura 7: Abs vs Tiempo con datos PM₁₀ y AA

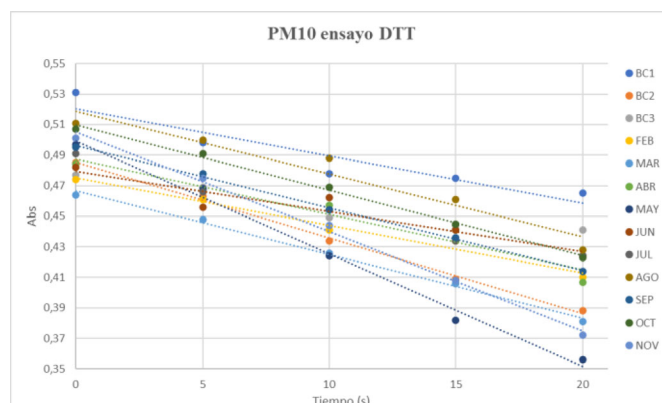


Figura 8: Abs vs Tiempo con datos PM₁₀ y DTT

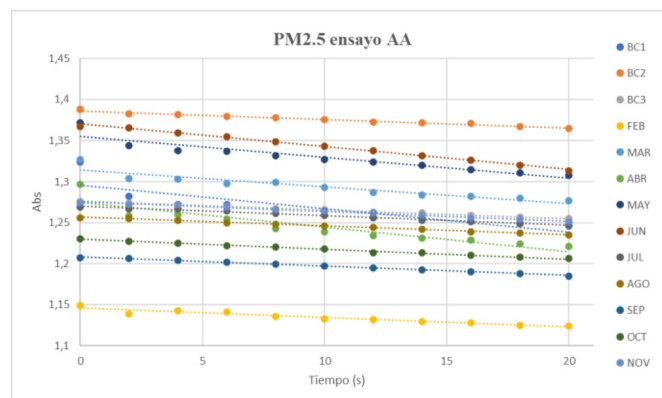


Figura 9: Abs vs Tiempo con datos PM_{2.5} y AA

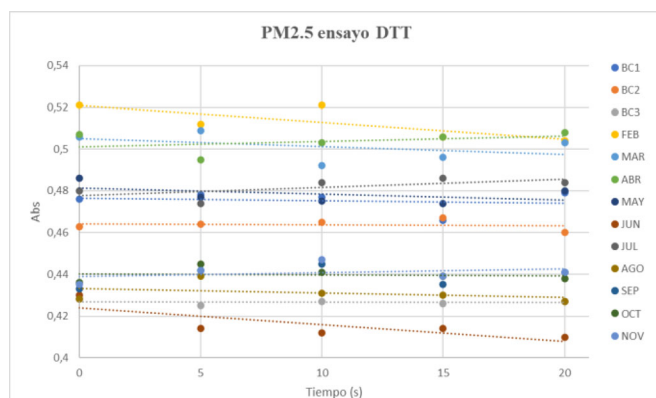


Figura 10: Abs vs Tiempo con datos PM_{2.5} y DTT

Las Figuras 7-10 mostradas anteriormente se corresponden con las representaciones de absorbancia frente al tiempo para cada una de las medidas realizadas en el laboratorio. Las realizadas para PM_{2.5} emplean el fluido ALF como medio de extracción y las de PM₁₀ emplean la disolución de Gamble.

Los valores obtenidos de R^2 para cada una de las rectas representadas se encuentran en la Tabla 8 y 9 del apartado 4.1.3. En ella se puede comprobar que, salvo excepción del ensayo de DTT con PM_{2.5}, los datos presentan un descenso bastante lineal a lo largo del tiempo ya que los valores de R^2 son superiores a 0,800.

En el caso del ensayo de AA, los valores de absorbancia registrados son, casi en su totalidad, superiores a 1. Esto, en nuestro caso, no influye puesto que solo son

necesarios estos datos para comprobar que existe un descenso lineal, en la zona de trabajo, debido al consumo progresivo del AA por parte del PM.

Para realizar este cálculo se necesita la concentración de DTT o AA que se encuentra presente en la cubeta de medida. Estas se calculan haciendo uso de las expresiones que se detallan a continuación.

Para el ensayo con DTT:

$$\frac{\text{masa DTT}(g)}{Pm DTT\left(\frac{g}{mol}\right)} \cdot \frac{Vdis. \text{ en bote topacio}(L)}{Vdis.(L)} \cdot \frac{V \text{ tomado}(ml)}{V \text{ cubeta}(ml)} \cdot \frac{1}{V \text{ cubeta}(L)} = [DTT] \left(\frac{mol}{L}\right) \quad (\text{ec.2})$$

La operación anterior se inicia con el cálculo de los moles de DTT que se encuentran en los 10 ml de disolución preparada (donde Pm es el peso molecular y masa DTT es la cantidad pesada de DTT) y se continua con el cálculo de la concentración al dividirlo entre el volumen de disolución (Vdis.). Para conocer los moles de DTT que se añaden en el bote topacio se multiplica por el volumen que añadimos de disolución en él (Vdis. en bote topacio), serían 30 µL. A continuación, se calcula el número de moles que se añaden a la cubeta de cuarzo, para ello se multiplica por los 0,5 mL de disolución contenida en el bote topacio que tomamos (V tomado) entre los 3 mL que corresponden con el volumen de la cubeta (V cubeta). Finalmente obtenemos la concentración de DTT en la cubeta al dividirlo entre el volumen de la cubeta en litros.

Para el ensayo con AA:

$$\frac{\text{masa AA}(g)}{Pm AA\left(\frac{g}{mol}\right)} \cdot \frac{1}{Vdis.(L)} \cdot \frac{V \text{ tomado}(L)}{V \text{ cubeta}(L)} = [AA] \left(\frac{mol}{L}\right) \quad (\text{ec.3})$$

La Ecuación 3 se inicia con el cálculo de los moles de AA que se encuentran en los 10 ml de disolución preparada (donde Pm es el peso molecular y masa AA es la cantidad pesada de AA) y se continua con el cálculo de la concentración al dividirlo entre el volumen de disolución (Vdis.). Para conocer los moles de AA que se añaden en la cubeta de medida se multiplica por el volumen que añadimos de disolución en ella (V tomado), serían 30 µL. Por último, para conocer la concentración de AA en la cubeta se divide entre el volumen de la cubeta (3 mL) en litros (V cubeta).

Los resultados obtenidos para el valor de ϵ , calculados haciendo uso de la Ecuación 1, de cada una de las muestras analizadas se reflejan en la Tabla 7 siguiente.

Tabla 7: Coeficientes de extinción molar de muestras PM₁₀ y PM_{2.5}.

| PM ₁₀ | ϵ^{DTT} (L·cm ⁻¹ ·mol ⁻¹) | ϵ^{AA} (L·cm ⁻¹ ·mol ⁻¹) | PM _{2.5} | ϵ^{DTT} (L·cm ⁻¹ ·mol ⁻¹) | ϵ^{AA} (L·cm ⁻¹ ·mol ⁻¹) |
|------------------|--|---|-------------------|--|---|
| Febrero | 31003 | 14379 | Febrero | 31049 | 11564 |
| Marzo | 30349 | 14429 | Marzo | 30155 | 13355 |
| Abril | 28208 | 13505 | Abril | 30215 | 13053 |
| Mayo | 28966 | 11628 | Mayo | 27869 | 12738 |
| Junio | 28092 | 15462 | Junio | 24658 | 12691 |

| | | |
|-------------------|-------|-------|
| Julio | 28616 | 15929 |
| Agosto | 30453 | 14812 |
| Septiembre | 29500 | 18292 |
| Octubre | 30215 | 15462 |
| Noviembre | 29857 | 17232 |
| Promedio | 29526 | 15113 |
| SD | 1013 | 1866 |
| | | |
| BC.1 | 34731 | 15041 |
| BC.2 | 28267 | |
| BC.3 | 27801 | 15296 |
| BC.4 | 30275 | 15032 |
| BC.5 | | 12641 |
| Promedio | 30268 | 14503 |
| SD | 3163 | 1247 |

| | | |
|-------------------|-------|-------|
| Julio | 27525 | 11782 |
| Agosto | 24929 | 12626 |
| Septiembre | 25220 | 12133 |
| Octubre | 25395 | 12365 |
| Noviembre | 25337 | 12807 |
| Promedio | 27235 | 12511 |
| SD | 2482 | 556 |
| | | |
| BC.1 | 28367 | 13325 |
| BC.2 | 26550 | 12886 |
| BC.3 | 24929 | 12827 |
| Promedio | 26615 | 13013 |
| SD | 1720 | 272 |

4.1.2 Cálculo de los límites de detección y cuantificación del método.

Límite de detección (LD) se trata de la concentración más baja de analito que puede ser detectada por el método a un nivel de confianza específico.

$$LD = X + 3 SD$$

Límite de cuantificación (LC) se define como el nivel más bajo de concentración de analito que se puede cuantificar.

$$LC = X + 10 SD$$

Donde X y SD son el valor promedio y la desviación estándar de los OP^{DDT} o OP^{AA} estimados analizando 11 blancos de procedimiento. Los valores para los LD y LC obtenidos son 0.001 y 0.002 nmol min⁻¹ m⁻³ para OP^{DDT}; y 0.01 y 0.03 nmol min⁻¹ m⁻³ para OP^{AA}.

4.1.3 Velocidad de agotamiento.

La velocidad a la que se consume el DTT o AA, en cada caso, es proporcional a la velocidad de formación de ROS. Esto se evalúa empleando la pendiente de la recta obtenida al representar gráficamente la absorbancia frente al tiempo. Los datos obtenidos se reflejan en las Tablas 8 y 9 que se muestran a continuación.

Tabla 8: Velocidades y R² de las muestras de PM₁₀

| PM ₁₀ | Velocidad DTT (μg PM ₁₀ /min) | R ² | Velocidad AA (μg PM ₁₀ /min) | R ² |
|-------------------|---|----------------|--|----------------|
| Febrero | -0,0031 | 0,979 | -0,0126 | 0,994 |
| Marzo | -0,0042 | 0,995 | -0,0252 | 0,999 |
| Abril | -0,0036 | 0,947 | -0,0492 | 0,969 |
| Mayo | -0,0074 | 0,993 | -0,0136 | 0,969 |
| Junio | -0,0026 | 0,896 | -0,0129 | 0,988 |
| Julio | -0,0033 | 0,979 | -0,0203 | 0,999 |
| Agosto | -0,0041 | 0,942 | -0,0225 | 0,994 |
| Septiembre | -0,0041 | 0,997 | -0,0242 | 0,929 |
| Octubre | -0,0043 | 0,995 | -0,0263 | 0,995 |
| Noviembre | -0,0065 | 0,995 | -0,0279 | 0,928 |
| Promedio | -0,0043 | | -0,0235 | |
| SD | 0,0015 | | 0,0107 | |
| BC.1 | -0,0031 | 0,877 | -0,0070 | 0,999 |
| BC.2 | -0,0050 | 0,997 | | |
| BC.3 | -0,0019 | 0,915 | -0,0099 | 0,979 |
| BC.4 | -0,0042 | 0,979 | -0,0246 | 0,998 |
| BC.5 | | | -0,0243 | 0,999 |
| Promedio | -0,0036 | | -0,0166 | |
| SD | 0,0013 | | 0,0093 | |

Tabla 9: Velocidades y R² de las muestras de PM_{2.5}

| PM _{2.5} | Velocidad DTT (μg PM _{2.5} /min) | R ² | Velocidad AA (μg PM _{2.5} /min) | R ² |
|-------------------|--|----------------|---|----------------|
| Febrero | -0,0008 | 0,618 | -0,0011 | 0,933 |
| Marzo | -0,0004 | 0,181 | -0,0020 | 0,877 |
| Abril | -0,0003 | 0,153 | -0,0030 | 0,834 |
| Mayo | -0,0003 | 0,241 | -0,0026 | 0,875 |
| Junio | -0,0008 | 0,625 | -0,0028 | 0,994 |
| Julio | 0,0004 | 0,439 | -0,0011 | 0,991 |

| | | | | |
|-------------------|----------|-------|---------|-------|
| Agosto | -0,0002 | 0,134 | -0,0011 | 0,997 |
| Septiembre | 0,0002 | 0,080 | -0,0011 | 0,995 |
| Octubre | -0,00004 | 0,009 | -0,0012 | 0,991 |
| Noviembre | 0,0002 | 0,105 | -0,0012 | 0,988 |
| Promedio | -0,0002 | | -0,0017 | |
| SD | 0,0004 | | 0,0008 | |
| | | | | |
| BC.1 | -0,0001 | 0,033 | -0,0029 | 0,750 |
| BC.2 | -0,00006 | 0,034 | -0,0011 | 0,985 |
| BC.3 | -0,00002 | 0,019 | -0,0011 | 0,997 |
| Promedio | -0,00006 | | -0,0017 | |
| SD | 0,00004 | | 0,0010 | |

Como se mencionó anteriormente, el consumo de DTT y AA es bastante lineal y las velocidades de consumo son prácticamente constantes en cada conjunto de ensayos.

En el ensayo de DTT con la disolución Gamble (pH=7,4), la velocidad de consumo media es 0,0043 $\mu\text{g PM}_{10}/\text{min}$ mientras que con la disolución ALF (pH=4), al no haber una tendencia lineal en los datos, es complicado establecer una velocidad de consumo. Sin embargo, con el ensayo de AA sí es posible realizar una comparación entre los distintos tamaños de partícula. La velocidad media en Gamble con PM_{10} es 0,0235 $\mu\text{g PM}_{10}/\text{min}$ mientras que en la disolución ALF con $\text{PM}_{2.5}$ es 0,0017 $\mu\text{g PM}_{2.5}/\text{min}$. Podemos apreciar un notable descenso en la velocidad al disminuir el pH del medio, esto nos indica que el particulado fino da lugar a una formación de ROS más lenta en el mismo periodo de tiempo, lo que resulta ventajoso ya que al encontrarse en zonas más internas del aparato respiratorio produciría efectos más perjudiciales para la salud. Aun así, lo que nos interesa comprobar es el efecto que producen las especies reactivas de oxígeno en el medio, no la velocidad de formación de estas y para ello empleamos el PO.

4.1.4 Cálculo del potencial oxidativo.

El valor del potencial oxidativo es el dato que nos proporciona información sobre la relación que hay entre el PM atmosférico y la capacidad de los componentes asociados a oxidar los antioxidantes de los pulmones y generar especies reactivas con oxígeno de forma catalítica (Bates et al., 2019).

El cálculo del OP se lleva a cabo empleando la Ecuación 4 que se muestra a continuación.

$$\frac{n_0 \cdot n_f}{t \cdot V_m} = PO \quad (\text{ec.4})$$

En donde n_0 se corresponde con los nanomoles de DTT o AA a tiempo 0, n_f con los nanomoles de DTT o AA tras los 20 minutos, t se corresponde con el tiempo transcurrido durante el ensayo (20 minutos en ambos casos) y V_m se corresponde con los m^3 de aire que pasan por la muestra (los 30 trozos de filtro), es decir, el volumen muestreado. De esta forma, las unidades en las que se expresan los valores de PO son $nmol/min \cdot m^3$.

En el caso de los blancos de campo, no se hace pasar un volumen de aire a través de los filtros, pero como este dato es necesario para poder obtener un valor de PO, se realiza una media del volumen de aire que pasa por el área total del filtro en cada mes del año y a partir de este dato se calculan los m^3 de aire que pasarían por la muestra del blanco.

Los datos obtenidos tras el análisis se ven reflejados en las tablas resumen que se presenta a continuación (Tabla 10 y 11). En ella aparecen los datos experimentales de PO para cada ensayo realizado (PO^{AA} y PO^{DTT} para cada caso, utilizando disolución de Gamble (Tabla 10) y disolución ALF (Tabla 11)) y los valores obtenidos tras restar la media de los blancos correspondientes. Este último dato mencionado es el que nos interesa para el estudio. Además, en la tabla se muestran los valores medios de $\mu g/m^3$ de PM que hay en los filtros para cada mes del año (estos datos se obtienen de archivos proporcionados por la (Xunta de Galicia (2022)) con los que se realizó una representación gráfica (Figuras 11 y 12) de la variación de PO y de la masa de PM muestreada durante los meses de estudio, en las que se puede observar la falta de relación entre la cantidad de particulado y los valores de PO.

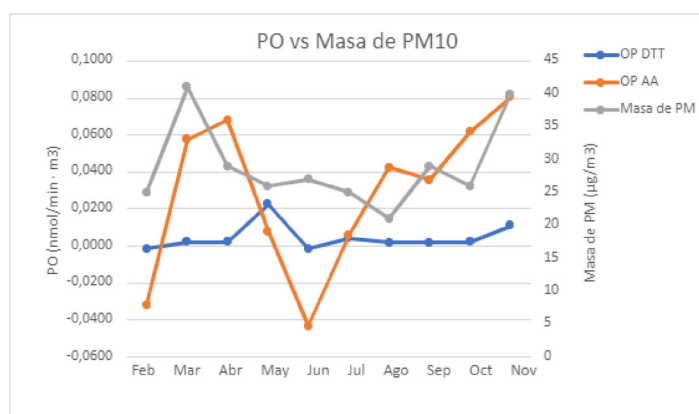


Figura 11: Variación del PO y la masa de PM_{10} durante el periodo estudiado.

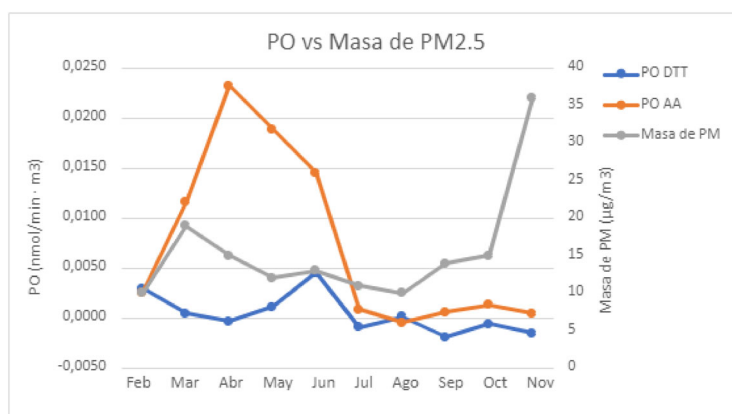


Figura 12: Variación del PO y la masa de $PM_{2.5}$ durante el periodo estudiado.

Tabla 10: Tabla resumen con los datos de PO para PM_{10} . Extracción en condiciones fisiológicas ($37^\circ C$ y agitación leve).

| PM_{10} | PO^{DTT} ($nmol \cdot min^{-1} \cdot m^{-3}$) | PO^{AA} ($nmol \cdot min^{-1} \cdot m^{-3}$) | PO^{DTT-BC} ($nmol \cdot min^{-1} \cdot m^{-3}$) | PO^{AA-BC} ($nmol \cdot min^{-1} \cdot m^{-3}$) | $\mu g/m^3$ |
|----------------|--|---|---|--|-------------|
| Febrero | 0,011 | 0,099 | < LD | < LD | 25 |
| Marzo | 0,015 | 0,188 | 0,002 | 0,058 | 41 |

| | | | | | |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|----|
| Abril | 0,015 | 0,199 | 0,002 | 0,068 | 29 |
| Mayo | 0,035 | 0,139 | 0,023 | < LD | 26 |
| Junio | 0,011 | 0,087 | < LD | < LD | 27 |
| Julio | 0,017 | 0,136 | 0,004 | < LD | 25 |
| Agosto | 0,015 | 0,173 | 0,002 | 0,042 | 21 |
| Septiembre | 0,015 | 0,166 | 0,002 | 0,036 | 29 |
| Octubre | 0,015 | 0,192 | 0,002 | 0,062 | 26 |
| Noviembre | 0,024 | 0,211 | 0,011 | 0,080 | 40 |

Tabla 11: Tabla resumen con los datos de PO para PM_{2.5}. Extracción en condiciones fisiológicas (37°C y agitación leve).

| PM _{2.5} | PO ^{DTT} (nmol·min ⁻¹ ·m ⁻³) | PO ^{AA} (nmol·min ⁻¹ ·m ⁻³) | PO ^{DTT} -BC (nmol·min ⁻¹ ·m ⁻³) | PO ^{AA} -BC (nmol·min ⁻¹ ·m ⁻³) | µg/m ³ |
|-------------------|---|--|---|--|-------------------|
| Febrero | 0,003 | 0,012 | 0,003 | < LD | 10 |
| Marzo | < LD | 0,021 | < LD | 0,012 | 19 |
| Abril | < LD | 0,033 | < LD | 0,023 | 15 |
| Mayo | 0,001 | 0,029 | 0,001 | 0,019 | 12 |
| Junio | 0,005 | 0,024 | 0,005 | 0,015 | 13 |
| Julio | < LD | 0,011 | < LD | < LD | 11 |
| Agosto | < LD | < LD | < LD | < LD | 10 |
| Septiembre | < LD | 0,010 | < LD | < LD | 14 |
| Octubre | < LD | 0,011 | < LD | < LD | 15 |
| Noviembre | < LD | 0,010 | < LD | < LD | 36 |

Podemos comprobar a simple vista que en los ensayos de DTT y AA para el particulado fino estamos trabajando, la mayoría de las veces, por debajo del límite de detección.

Tras ver estas diferencias en los resultados de ambos ensayos realizados para PM₁₀ y PM_{2.5} se decidió comprobar si la causa de esto se debía a que los filtros de PM_{2.5} no contaban con una cantidad de particulado suficiente como para que el método de extracción empleado extrajese suficientes compuestos oxidantes para conseguir superar el LD. Es por esto que se realizó una extracción empleando un baño de ultrasonidos obteniendo los resultados de PO^{DTT} y PO^{AA} que se muestran a continuación en la Tabla 12.

Tabla 12: Tabla resumen con los datos de PO para PM_{2.5}. Extracción con ultrasonidos.

| PM _{2.5} | PO ^{DTT} (nmol·min ⁻¹ ·m ⁻³) | PO ^{AA} (nmol·min ⁻¹ ·m ⁻³) | PO ^{DTT} -BC (nmol·min ⁻¹ ·m ⁻³) | PO ^{AA} -BC (nmol·min ⁻¹ ·m ⁻³) | μg/m ³ |
|-------------------|---|--|---|--|-------------------|
| Marzo | < LD | 0,015 | < LD | < LD | 19 |
| Noviembre | < LD | 0,017 | < LD | < LD | 36 |

Tras realizar esta prueba y comprobar que empleando extracciones más exhaustivas no se consigue un aumento en los valores de PO, se concluyó que, efectivamente, estamos trabajando por debajo de los límites de detección en las muestras de particulado fino debido a la baja cantidad de compuestos oxidantes presentes en ellas y no es problema del método de extracción empleado.

Además, se pudo ver como el pH y la composición del medio afectan de forma notoria en la realización de los ensayos al observar las diferencias entre los resultados para PM₁₀ y PM_{2.5} mostrados en las Tablas 10 y 11.

Este trabajo no realiza un estudio en base a la composición del particulado, sin embargo, otros estudios previos comprobaron que el fluido simulado ALF presenta un alto contenido en citrato procedente del ácido cítrico y del citrato sódico, este forma complejos de cobre que presenta un potencial redox menor que el que posee el ion metálico libre. Al realizar la medida de potencial en este fluido disminuye la capacidad redox del Cu(II), si a esto se le añade la baja cantidad de particulado presente en la fracción bioaccesible de PM_{2.5}, podemos entender el bajo PO que obtenemos como resultado (Wu et al., 2022). En el trabajo realizado por Calas se muestran otros componentes afectados por la complejación con citrato como, por ejemplo, el MnCO₃. Este se puede disolver durante el proceso de extracción debido al bajo pH del medio, causando que el ion metálico pueda complejar con el citrato provocando la disminución del consumo de DTT a causa de la menor producción de ROS (Calas et al., 2017).

Otro detalle relevante influenciado por el pH se ve relacionado con la reacción llevada a cabo durante el proceso de medida. A la hora de evaluar el consumo de DTT se llevan a cabo una serie de reacciones previas (Figura 5), el primer paso consiste en protonar el DTT con la adición de ácido tricloroacético para parar la reacción de formación de ROS (Pietrogrande et al., 2018). Teniendo en cuenta que el pH en la disolución ALF es ácido (pH = 4,5-5), cabe la posibilidad de que la protonación del DTT no tenga lugar en el momento de la adición del ácido tricloroacético y que no se produzca la reacción al estar desde el punto de partida en un medio ácido. Esta podría ser una justificación razonable para la falta del descenso lineal en el consumo de DTT durante la realización del ensayo.

Así mismo, la idea de que estemos trabajando muy próximos al límite de detección del instrumento también podría ser válida.

Es importante mencionar también el apreciable descenso en los valores de PO^{AA} entre PM_{10} y $PM_{2.5}$. Esto puede tener una explicación beneficiosa a para la salud, ya que indicaría que el particulado fino (más dañino por su capacidad de penetración en el cuerpo) presente en la fracción bioaccesible no presenta un nivel de toxicidad tan elevado como el particulado grueso y causaría un menor daño en la parte interna del tracto respiratorio.

5. Conclusión

Tras finalizar el trabajo de fin de grado previamente desarrollado, se puede concluir que se ha conseguido llegar al objetivo planteado inicialmente. La estimación del PO de las muestras de PM₁₀ y PM_{2.5} analizadas en los SLF correspondientes en función del tamaño de partícula mediante los dos ensayos *in-vitro* estudiados (DTT y AA) han proporcionado resultados adecuados (pese a las limitaciones con los LD del método) y permiten confirmar las ventajas del uso de las condiciones fisiológicas para estudios posteriores.

Podemos destacar los siguientes puntos:

- El empleo de condiciones fisiológicas a la hora de realizar las extracciones, en comparación con extracciones exhaustivas, proporciona unos resultados más realistas que permiten un mejor punto de vista para plantear los riesgos en la salud.
- Con la realización de los ensayos *in-vitro* DTT y AA reafirmamos el bajo coste que suponen por su bajo consumo de reactivos y de tiempo.
- A la vista de los bajos resultados obtenidos en los ensayos realizados con ALF, se concluye que el pH y composición del medio influyen en la realización de los ensayos de DTT y AA.
- Los resultados obtenidos tras los ensayos realizados con la disolución de Gamble y ALF son adecuados para la medida del estrés oxidativo de la materia particulada.
- Tras la comparación de los resultados de PO obtenidos para PM_{2.5} y PM₁₀ se concluye que el particulado fino tiene un nivel de toxicidad menor, indicativo de su menor daño para la salud humana.

Unha vez finalizado o proxecto de fin de grao desenvolvido previamente, pódese concluir que se conseguiu o obxectivo inicialmente marcado. A estimación do PO das mostrás de PM₁₀ e PM_{2.5} analizadas no SLF correspondente en función do tamaño de partícula mediante os dous ensaios *in-vitro* estudados (DTT e AA) deron resultados adecuados (a pesar das limitacións cos LD de o método) e permiten confirmar as vantaxes do uso de condicións fisiolóxicas para estudos posteriores.

Podemos destacar os seguintes puntos:

- A utilización de condicións fisiolóxicas na realización das extraccións, en comparación coas extraccións exhaustivas, proporciona resultados máis realistas que permiten un mellor punto de vista sobre os riscos para a saúde.
- Ao realizar os ensaios DTT e AA *in-vitro* reafirmamos o baixo custo que supoñen polo seu baixo consumo de reactivos e tempo.
- Á vista dos baixos resultados obtidos nos ensaios realizados con ALF, conclúese que o pH e a composición do medio inflúen na realización dos ensaios de DTT e AA.
- Os resultados obtidos tras os ensaios realizados coa solución de Gamble e ALF son adecuados para a medida do estrés oxidativo da materia particulada.
- Tras comparar os resultados de PO obtidos para PM_{2.5} e PM₁₀, conclúese que as partículas finas presentan un nivel de toxicidade inferior, indicativo do seu menor dano para a saúde humana.

After completing the previously developed end-of-degree work, it can be concluded that the initially set objective has been achieved. The estimation of the PO of the samples of PM₁₀ and PM_{2.5} analyzed in the corresponding SLF as a function of particle size using the two *in-vitro* assays studied (DTT and AA) have provided adequate results (despite the limitations with the LD of method) and confirm the advantages of using physiological conditions for further studies.

We can highlight the following points:

- The use of physiological conditions when performing the extractions, compared to exhaustive extractions, provides more realistic results that allow a better point of view to raise health risks.
- With the performance of the *in-vitro* DTT and AA assays, we reaffirm the low cost they entail due to their low consumption of reagents and time.
- In view of the low results obtained in the tests carried out with ALF, it is concluded that the pH and composition of the medium influence the performance of the DTT and AA tests.
- The results obtained after the tests carried out with Gamble's and ALF solution are adequate oxidative stress assessment of particulate matter.
- After comparing the PO results obtained for PM_{2.5} and PM₁₀, it is concluded that fine particulate matter has a lower toxicity level, indicative of less damage to human health.

6. Bibliografía

- Amable-Álvarez, I., Méndez-Martínez, J., Bello-Rodríguez, B., Benítez-Fuentes, B., Escobar-Blanco, M., Zamora-Monzón, R. (2017). Influencia de los contaminantes atmosféricos sobre la salud. *Revista Médica Electrónica*, 39(5), 1160-1170. <http://www.revmedicaelectronica.sld.cu/index.php/rme/article/view/2470/3610>
- Bates, J. T., Fang, T., Verma, V., Zeng, L., Weber, R. J., Tolbert, P. E., Abrams, J. Y., Sarnat, S. E., Klein, M., Mulholland, J. A., Russell, A. G. (2019). Review of Acellular Assays of Ambient Particulate Matter Oxidative Potential: Methods and Relationships with Composition, Sources, and Health Effects. *Environmental Science and Technology*, 53(8), 4003-4019. https://doi.org/10.1021/ACS.EST.8B03430/ASSET/IMAGES/LARGE/ES-2018-03430N_0001.JPEG
- BOE (2011). 1645 Real Decreto 102/2011, de 28 de enero, relativo a la mejora de la calidad del aire. (2011). Acceso 15 de mayo de 2023, <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2011-1645>
- BOE (2017). 914 Real Decreto 39/2017, de 27 de enero, por el que se modifica el Real Decreto 102/2011, de 28 de enero, relativo a la mejora de la calidad del aire. (2017). Acceso 15 de mayo de 2023, <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2017-914>
- Boisa, N., Elom, N., Dean, J. R., Deary, M. E., Bird, G., Entwistle, J. A. (2014). Development and application of an inhalation bioaccessibility method (IBM) for lead in the PM10 size fraction of soil. *Environment International*, 70, 132-142. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2014.05.021>
- Calas, A., Uzu, G., Besombes, J. L., Martins, J. M. F., Redaelli, M., Weber, S., Charron, A., Albinet, A., Chevrier, F., Brulfert, G., Mesbah, B., Favez, O., Jaffrezo, J. L. (2019). Seasonal Variations and Chemical Predictors of Oxidative Potential (OP) of Particulate Matter (PM), for Seven Urban French Sites. *Atmosphere* 2019, Vol. 10, Page 698, 10(11), 698. <https://doi.org/10.3390/ATMOS10110698>
- Calas, A., Uzu, G., Martins, J. M. F., Voisin, D., Spadini, L., Lacroix, T., Jaffrezo, J. L. (2017). The importance of simulated lung fluid (SLF) extractions for a more relevant evaluation of the oxidative potential of particulate matter. *Scientific Reports*, 7, 11617. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11979-3>
- Collins, C. D., Craggs, M., Garcia-Alcega, S., Kademoglou, K., & Lowe, S. (2015). 'Towards a unified approach for the determination of the bioaccessibility of organic pollutants'. *Environment International*, 78, 24-31. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2015.02.005>
- Eiguren-Fernandez, A., Shinyashiki, M., Schmitz, D. A., DiStefano, E., Hinds, W., Kumagai, Y., Cho, A. K., Froines, J. R. (2010). Redox and electrophilic properties of vapor- and particle-phase components of ambient aerosols. *Environmental Research*, 110(3), 207-212. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2010.01.009>

- Esperón-Porto, P., Fernández-Amado, M., Piñeiro-Iglesias, M., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D. (2020). *Instituto Universitario de Medio Ambiente (IUMA); Universidade da Coruña (UDC)*. «Medida niveles de partículas zona de los Castros». <http://coruna.es/infoambiental/es/calidad-del-aire/publicaciones-2.html>
- Fang, T., Lakey, P. S. J., Weber, R. J., Shiraiwa, M. (2019). Oxidative potential of particulate matter and generation of reactive oxygen species in epithelial lining fluid. *Environmental Science and Technology*, 53(21), 12784-12792. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03823>
- Ferran Ballester. (2005). Contaminación atmosférica, cambio climático y salud. *Revista Española de Salud Pública*, 79 (Nº2), 159-175.
- Frezzini, M. A., Di Iulio, G., Tiraboschi, C., Canepari, S., Massimi, L. (2022). A New Method for the Assessment of the Oxidative Potential of Both Water-Soluble and Insoluble PM. *Atmosphere*, 13(2), 349. <https://doi.org/10.3390/ATMOS13020349/S1>
- Harris, D. C. (2016). *Análisis químico cuantitativo (3a. ed.)*. Editorial Reverté. <https://doi.org/10.0/CSS/ALL.MIN.D74D1A5D029B.CSS>
- Janssen, N. A. H., Yang, A., Strak, M., Steenhof, M., Hellack, B., Gerlofs-Nijland, M. E., Kuhlbusch, T., Kelly, F., Harrison, R., Brunekreef, B., Hoek, G., Cassee, F. (2014). Oxidative potential of particulate matter collected at sites with different source characteristics. *Science of The Total Environment*, 472, 572-581. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2013.11.099>
- Kastury, F., Smith, E., Juhasz, A. L. (2017). A critical review of approaches and limitations of inhalation bioavailability and bioaccessibility of metal(loid)s from ambient particulate matter or dust. *Science of The Total Environment*, 574, 1054-1074. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2016.09.056>
- Macho-Eiras, L., Blanes-Fernández, L., Gallego-Fernández, N., Marchante-Hernández, A., Gómez-Tellado, L., Rodríguez-Villazón, C., Saunders-Estévez, D., Fraga-Moure, I. (2016). *PM10 Y PM2,5 en ES1219: Área metropolitana de A Coruña en 2016 y la influencia del aerosol marino*. Acceso 24 de abril de 2023, https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfera-y-calidad-del-aire/informe_aerosol_marino_2016_tcm30-514133.pdf
- Macho-Eiras, L., Gallego-Fernández, N., Costa-Tomé, P., Saunders-Estévez, D., Otero-Martínez, C., Blanes-Fernández, L., Marchante-Hernández, A., Gómez-Tellado, L., Vázquez-Cancela, A., Ruíz-Iglesias, F., Estévez-Campos, E., Gómez-Varela, T., Cristóbal-Rego, D. (2021). *Informe Anual Calidade do aire de Galicia 2021*. Acceso 17 de abril de 2023, https://www.meteogalicia.gal/Caire/informesCaire.action?request_locale=es
- Meteogalicia (2022) - Intercomparación dos equipos automáticos de PM co método de referencia*. (2022). Acceso 23 de mayo de 2023, https://www.meteogalicia.gal/datosred/infoweb/caire/informes/ESTUDIO/GL/FC_2021.pdf

- Meteogalicia (2023a) - Descripción de los Contaminantes (Partículas)*. (2023). Acceso 24 de abril de 2023, <https://www.meteogalicia.gal/Caire/particulasCaire.action>
- Meteogalicia (2023b) - Estaciones Calidad del Aire de Galicia*. (2023). Acceso 25 de abril de 2023, https://www.meteogalicia.gal/Caire/estacionsCaire.action?request_locale=es
- Midander, K., Pan, J., Odnevall Wallinder, I., Leygraf, C. (2007). Metal release from stainless steel particles in vitro —influence of particle size. *Journal of Environmental Monitoring*, 9(1), 74-81. <https://doi.org/10.1039/B613919A>
- MITECO (2023a), Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico - Partículas*. (2023). Acceso 23 de mayo de 2023, <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfera-y-calidad-del-aire/calidad-del-aire/salud/particulas.aspx>
- MITECO (2023b), Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico - Partículas en suspensión*. (2023). Acceso 24 de abril de 2023, <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfera-y-calidad-del-aire/emisiones/prob-amb/particulas.aspx>
- Moreda-Piñeiro, J., Turnes-Carou, I., Alonso-Rodríguez, E., Moscoso-Pérez, C., Blanco-Heras, G., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D. (2015). The Influence of Oceanic Air Masses on Concentration of Major Ions and Trace Metals in PM_{2.5} Fraction at a Coastal European Suburban Site. *Water, Air, and Soil Pollution*, 226(1). <https://doi.org/10.1007/s11270-014-2240-2>
- OMS (2021), Organización Mundial de la Salud - Cambio climático y salud*. (2021). Acceso 9 de mayo de 2023, <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/climate-change-and-health>
- OMS (2022), Organización Mundial de la Salud - Calidad del aire ambiente (exterior) y salud*. (2022). Acceso 9 de mayo de 2023, [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health)
- OMS (2023), Organización Mundial de la Salud - Contaminación atmosférica*. (2023). Acceso 9 de mayo de 2023, https://www.who.int/es/health-topics/air-pollution#tab=tab_1
- Patel, A., Rastogi, N. (2018). Oxidative potential of ambient fine aerosol over a semi-urban site in the Indo-Gangetic Plain. *Atmospheric Environment*, 175, 127-134. <https://doi.org/10.1016/J.ATMOSENV.2017.12.004>
- Pey-Betrán, J., Alastuey-Urós, A., Querol-Carceller, X., Mata-Perelló, J. (2007). *Caracterización físico-química de los aerosoles atmosféricos en el mediterráneo occidental Memoria de tesis presentada por Jorge Pey Betrán*. Universitat Politècnica de Catalunya.
- Pietrogrande, M. C., Dalpiaz, C., Dell'Anna, R., Lazzeri, P., Manarini, F., Visentin, M., Tonidandel, G. (2018). Chemical composition and oxidative potential of atmospheric coarse particles at an industrial and urban background site in the alpine

- region of northern Italy. *Atmospheric Environment*, 191, 340-350. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2018.08.022>
- Pietrogrande, M. C., Demaria, G., Colombi, C., Cuccia, E., Dal Santo, U. (2022). Seasonal and Spatial Variations of PM10 and PM2.5 Oxidative Potential in Five Urban and Rural Sites across Lombardia Region, Italy. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2022, Vol. 19, Page 7778, 19(13), 7778. <https://doi.org/10.3390/IJERPH19137778>
- Romano, S., Perrone, M. R., Becagli, S., Pietrogrande, M. C., Russo, M., Caricato, R., Lionetto, M. G. (2020). Ecotoxicity, genotoxicity, and oxidative potential tests of atmospheric PM10 particles. *Atmospheric Environment*, 221, 117085. <https://doi.org/10.1016/J.ATMOSENV.2019.117085>
- Sánchez-Piñero, J., Moreda-Piñeiro, J., Concha-Graña, E., Fernández-Amado, M., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P. (2021). Inhalation bioaccessibility estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons from atmospheric particulate matter (PM10): Influence of PM10 composition and health risk assessment. *Chemosphere*, 263, 127847. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.127847>
- Schiavo, B., Meza-Figueroa, D., Vizuite-Jaramillo, E., Robles-Morua, A., Angulo-Molina, A., Reyes-Castro, P. A., Inguaggiato, C., Gonzalez-Grijalva, B., Pedroza-Montero, M. (2022). Oxidative potential of metal-polluted urban dust as a potential environmental stressor for chronic diseases. *Environmental Geochemistry and Health*, 45, 3229-3250. <https://doi.org/10.1007/S10653-022-01403-9>
- Schwarze, P. E., Øvrevik, J., Låg, M., Refsnes, M., Nafstad, P., Hetland, R. B., Dybing, E. (2006). Particulate matter properties and health effects: consistency of epidemiological and toxicological studies. *Human and Experimental Toxicology*, 25, 559-579. <https://doi.org/10.1177/096032706072520>
- Song, M., Oh, S. H., Park, C., Bae, M. S. (2021). Review: Analytical Procedure for Dithiothreitol-based Oxidative Potential of PM2.5. 15, 1-13. <https://doi.org/10.5572/AJAE.2021.015>
- UNE (2015). UNE-EN 12341, 2015, Aire Ambiente. Método de medición gravimétrico normalizado para la determinación de la concentración másica de PM10 o PM2,5 de la materia particulada en suspensión. (2015).
- UNE (2017). UNE-EN 16450, 2017, Aire ambiente. Sistemas automáticos de medida para la medición de la concentración de materia particulada (PM10; PM2,5). (2017).
- U.S. Environmental Protection Agency | US EPA. Acceso 13 de julio de 2023, de <https://www.epa.gov/>
- Valavanidis, A., Fiotakis, K., Vlachogianni, T. (2008). Airborne Particulate Matter and Human Health: Toxicological Assessment and Importance of Size and Composition of Particles for Oxidative Damage and Carcinogenic Mechanisms. 26(4), 339-362. <https://doi.org/10.1080/10590500802494538>
- Wang, Y., Plewa, M. J., Mukherjee, U. K., Verma, V. (2018). Assessing the cytotoxicity of ambient particulate matter (PM) using Chinese hamster ovary (CHO) cells and its

- relationship with the PM chemical composition and oxidative potential. *Atmospheric Environment*, 179, 132-141. <https://doi.org/10.1016/J.ATMOSENV.2018.02.025>
- Wu, N., Lyu, Y., Lu, B., Cai, D., Meng, X., Li, X. (2022). Oxidative potential induced by metal-organic interaction from PM2.5 in simulated biological fluids. *Science of the Total Environment*, 848, 157768. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157768>
- Xunta de Galicia (2022) - *Meteogalicia, Publicacións calidade do aire de Galicia*. (2022, mayo). Datos empregados para a avaliación da calidade do aire de Galicia, ano 2021. Acceso 9 de mayo de 2023, https://www.meteogalicia.gal/Caire/informesCaire.action?request_locale=gl
- Yang, A., Jedynska, A., Hellack, B., Kooter, I., Hoek, G., Brunekreef, B., Kuhlbusch, T. A. J., Cassee, F. R., Janssen, N. A. H. (2014). Measurement of the oxidative potential of PM2.5 and its constituents: The effect of extraction solvent and filter type. *Atmospheric Environment*, 83, 35-42. <https://doi.org/10.1016/J.ATMOSENV.2013.10.049>

7. Anexos

7.1 Anexo 1. Toma de muestras.

Tabla 13: Filtros de los cuales se tomó muestra para el análisis de PM₁₀.

| Nº filtro PM ₁₀ | Feb. | Mar. | Abr. | May. | Jun. | Jul. | Ago. | Sep. | Oct. | Nov. |
|----------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | 31/01/2021 | 01/03/2021 | 01/04/2021 | 01/05/2021 | 01/06/2021 | 01/07/2021 | 01/08/2021 | 01/09/2021 | 01/10/2021 | 01/11/2021 |
| 2 | 01/02/2021 | 02/03/2021 | 01/04/2021 | 02/05/2021 | 02/06/2021 | 02/07/2021 | 02/08/2021 | 02/09/2021 | 02/10/2021 | 02/11/2021 |
| 3 | 02/02/2021 | 03/03/2021 | 02/04/2021 | 03/05/2021 | 03/06/2021 | 03/07/2021 | 03/08/2021 | 03/09/2021 | 03/10/2021 | 03/11/2021 |
| 4 | 02/02/2021 | 04/03/2021 | 03/04/2021 | 04/05/2021 | 04/06/2021 | 04/07/2021 | 04/08/2021 | 04/09/2021 | 04/10/2021 | 04/11/2021 |
| 5 | 03/02/2021 | 05/03/2021 | 04/04/2021 | 05/05/2021 | 05/06/2021 | 05/07/2021 | 05/08/2021 | 05/09/2021 | 05/10/2021 | 05/11/2021 |
| 6 | 04/02/2021 | 06/03/2021 | 05/04/2021 | 06/05/2021 | 06/06/2021 | 06/07/2021 | 06/08/2021 | 06/09/2021 | 06/10/2021 | 06/11/2021 |
| 7 | 05/02/2021 | 07/03/2021 | 06/04/2021 | 07/05/2021 | 07/06/2021 | 07/07/2021 | 07/08/2021 | 07/09/2021 | 07/10/2021 | 07/11/2021 |
| 8 | 06/02/2021 | 08/03/2021 | 07/04/2021 | 08/05/2021 | 08/06/2021 | 08/07/2021 | 08/08/2021 | 08/09/2021 | 08/10/2021 | 08/11/2021 |
| 9 | 07/02/2021 | 09/03/2021 | 07/04/2021 | 09/05/2021 | 09/06/2021 | 09/07/2021 | 09/08/2021 | 09/09/2021 | 09/10/2021 | 09/11/2021 |
| 10 | 08/02/2021 | 10/03/2021 | 08/04/2021 | 10/05/2021 | 10/06/2021 | 10/07/2021 | 10/08/2021 | 10/09/2021 | 10/10/2021 | 10/11/2021 |
| 11 | 09/02/2021 | 11/03/2021 | 09/04/2021 | 11/05/2021 | 11/06/2021 | 11/07/2021 | 11/08/2021 | 11/09/2021 | 11/10/2021 | 11/11/2021 |
| 12 | 10/02/2021 | 12/03/2021 | 10/04/2021 | 12/05/2021 | 12/06/2021 | 12/07/2021 | 12/08/2021 | 12/09/2021 | 12/10/2021 | 12/11/2021 |
| 13 | 11/02/2021 | 13/03/2021 | 11/04/2021 | 15/05/2021 | 13/06/2021 | 13/07/2021 | 13/08/2021 | 13/09/2021 | 13/10/2021 | 04/12/2021 |
| 14 | 12/02/2021 | 14/03/2021 | 12/04/2021 | 16/05/2021 | 14/06/2021 | 14/07/2021 | 14/08/2021 | 14/09/2021 | 14/10/2021 | 05/12/2021 |
| 15 | 13/02/2021 | 15/03/2021 | 13/04/2021 | 17/05/2021 | 15/06/2021 | 15/07/2021 | 15/08/2021 | 15/09/2021 | 15/10/2021 | 06/12/2021 |
| 16 | 14/02/2021 | 16/03/2021 | 14/04/2021 | 18/05/2021 | 16/06/2021 | 16/07/2021 | 16/08/2021 | 16/09/2021 | 16/10/2021 | 07/12/2021 |
| 17 | 15/02/2021 | 17/03/2021 | 14/04/2021 | 18/05/2021 | 17/06/2021 | 17/07/2021 | 17/08/2021 | 17/09/2021 | 17/10/2021 | 08/12/2021 |
| 18 | 16/02/2021 | 18/03/2021 | 15/04/2021 | 19/05/2021 | 18/06/2021 | 18/07/2021 | 18/08/2021 | 18/09/2021 | 18/10/2021 | 09/12/2021 |
| 19 | 17/02/2021 | 19/03/2021 | 16/04/2021 | 20/05/2021 | 19/06/2021 | 19/20/21 | 19/08/2021 | 19/09/2021 | 19/10/2021 | 10/12/2021 |
| 20 | 18/02/2021 | 20/03/2021 | 17/04/2021 | 21/05/2021 | 20/06/2021 | 20/07/2021 | 20/08/2021 | 20/09/2021 | 20/10/2021 | 11/12/2021 |
| 21 | 19/02/2021 | 21/03/2021 | 18/04/2021 | 22/05/2021 | 21/06/2021 | 21/07/2021 | 21/08/2021 | 21/09/2021 | 21/10/2021 | 12/12/2021 |
| 22 | 20/02/2021 | 22/03/2021 | 19/04/2021 | 23/05/2021 | 22/06/2021 | 22/07/2021 | 22/08/2021 | 22/09/2021 | 22/10/2021 | 13/12/2021 |
| 23 | 21/02/2021 | 23/03/2021 | 20/04/2021 | 24/05/2021 | 23/06/2021 | 23/07/2021 | 23/08/2021 | 23/09/2021 | 23/10/2021 | 14/12/2021 |
| 24 | 22/02/2021 | 24/03/2021 | 21/04/2021 | 25/05/2021 | 24/06/2021 | 24/07/2021 | 24/08/2021 | 24/09/2021 | 24/10/2021 | 15/12/2021 |
| 25 | 23/02/2021 | 25/03/2021 | 21/04/2021 | 26/05/2021 | 25/06/2021 | 25/07/2021 | 25/08/2021 | 25/09/2021 | 25/10/2021 | 16/12/2021 |
| 26 | 24/02/2021 | 26/03/2021 | 22/04/2021 | 27/05/2021 | 26/06/2021 | 26/07/2021 | 26/08/2021 | 26/09/2021 | 26/10/2021 | 17/12/2021 |
| 27 | 25/02/2021 | 27/03/2021 | 22/04/2021 | 28/05/2021 | 27/06/2021 | 27/07/2021 | 27/08/2021 | 27/09/2021 | 27/10/2021 | 18/12/2021 |
| 28 | 26/02/2021 | 28/03/2021 | 29/04/2021 | 29/05/2021 | 28/06/2021 | 28/07/2021 | 28/08/2021 | 28/09/2021 | 28/10/2021 | 19/12/2021 |

| | | | | | | | | | | |
|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 29 | 27/02/2021 | 29/03/2021 | 30/04/2021 | 30/05/2021 | 29/06/2021 | 29/07/2021 | 29/08/2021 | 29/09/2021 | 29/10/2021 | 20/12/2021 |
| 30 | 28/02/2021 | 30/03/2021 | 30/04/2021 | 31/05/2021 | 30/06/2021 | 30/07/2021 | 30/08/2021 | 30/09/2021 | 30/10/2021 | 21/12/2021 |

Tabla 14: Filtros de los cuales se tomó muestra para el análisis de PM_{2.5}

| N° filtro PM _{2.5} | Feb. | Mar. | Abr. | May. | Jun. | Jul. | Ago. | Sep. | Oct. | Nov. |
|-----------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | 28/01/2021 | 01/03/2021 | 01/04/2021 | 01/05/2021 | 01/06/2021 | 01/07/2021 | 01/08/2021 | 01/09/2021 | 03/10/2021 | 05/11/2021 |
| 2 | 31/01/2021 | 02/03/2021 | 01/04/2021 | 01/05/2021 | 02/06/2021 | 02/07/2021 | 02/08/2021 | 01/09/2021 | 03/10/2021 | 06/11/2021 |
| 3 | 01/02/2021 | 03/03/2021 | 02/04/2021 | 02/05/2021 | 04/06/2021 | 06/07/2021 | 03/08/2021 | 02/09/2021 | 04/10/2021 | 07/11/2021 |
| 4 | 01/02/2021 | 04/03/2021 | 03/04/2021 | 03/05/2021 | 05/06/2021 | 07/07/2021 | 05/08/2021 | 02/09/2021 | 05/10/2021 | 08/11/2021 |
| 5 | 04/02/2021 | 04/03/2021 | 04/04/2021 | 03/05/2021 | 06/06/2021 | 08/07/2021 | 06/08/2021 | 04/09/2021 | 06/10/2021 | 09/11/2021 |
| 6 | 05/02/2021 | 06/03/2021 | 04/04/2021 | 05/05/2021 | 07/06/2021 | 09/07/2021 | 07/08/2021 | 04/09/2021 | 06/10/2021 | 10/11/2021 |
| 7 | 06/02/2021 | 07/03/2021 | 05/04/2021 | 05/05/2021 | 07/06/2021 | 09/07/2021 | 08/08/2021 | 18/09/2021 | 07/10/2021 | 11/11/2021 |
| 8 | 07/02/2021 | 08/03/2021 | 07/04/2021 | 06/05/2021 | 08/06/2021 | 10/07/2021 | 09/08/2021 | 18/09/2021 | 08/10/2021 | 12/11/2021 |
| 9 | 08/02/2021 | 09/03/2021 | 07/04/2021 | 07/05/2021 | 09/06/2021 | 11/07/2021 | 10/08/2021 | 19/09/2021 | 08/10/2021 | 04/12/2021 |
| 10 | 08/02/2021 | 10/03/2021 | 08/04/2021 | 09/05/2021 | 10/06/2021 | 12/07/2021 | 11/08/2021 | 19/09/2021 | 09/10/2021 | 05/12/2021 |
| 11 | 09/02/2021 | 11/03/2021 | 09/04/2021 | 12/05/2021 | 11/06/2021 | 13/07/2021 | 12/08/2021 | 20/09/2021 | 09/10/2021 | 06/12/2021 |
| 12 | 10/02/2021 | 12/03/2021 | 09/04/2021 | 12/05/2021 | 12/06/2021 | 14/07/2021 | 13/08/2021 | 20/09/2021 | 10/10/2021 | 06/12/2021 |
| 13 | 11/02/2021 | 12/03/2021 | 10/04/2021 | 21/05/2021 | 13/06/2021 | 15/07/2021 | 13/08/2021 | 21/09/2021 | 11/10/2021 | 07/12/2021 |
| 14 | 12/02/2021 | 13/03/2021 | 11/04/2021 | 21/05/2021 | 14/06/2021 | 15/07/2021 | 14/08/2021 | 21/09/2021 | 12/10/2021 | 08/12/2021 |
| 15 | 13/02/2021 | 14/03/2021 | 12/04/2021 | 22/05/2021 | 14/06/2021 | 16/07/2021 | 15/08/2021 | 22/09/2021 | 12/10/2021 | 09/12/2021 |
| 16 | 13/02/2021 | 15/03/2021 | 13/04/2021 | 22/05/2021 | 15/06/2021 | 17/07/2021 | 16/08/2021 | 22/09/2021 | 13/10/2021 | 09/12/2021 |
| 17 | 14/02/2021 | 16/03/2021 | 13/04/2021 | 24/05/2021 | 16/06/2021 | 18/07/2021 | 17/08/2021 | 23/09/2021 | 13/10/2021 | 10/12/2021 |
| 18 | 15/02/2021 | 17/03/2021 | 14/04/2021 | 24/05/2021 | 19/06/2021 | 21/07/2021 | 18/08/2021 | 23/09/2021 | 14/10/2021 | 11/12/2021 |
| 19 | 15/02/2021 | 18/03/2021 | 14/04/2021 | 25/05/2021 | 20/06/2021 | 21/07/2021 | 20/08/2021 | 24/09/2021 | 14/10/2021 | 11/12/2021 |
| 20 | 17/02/2021 | 19/03/2021 | 15/04/2021 | 26/05/2021 | 21/06/2021 | 22/07/2021 | 21/08/2021 | 24/09/2021 | 15/10/2021 | 12/12/2021 |
| 21 | 20/02/2021 | 23/03/2021 | 16/04/2021 | 26/05/2021 | 22/06/2021 | 23/07/2021 | 22/08/2021 | 25/09/2021 | 19/10/2021 | 13/12/2021 |
| 22 | 21/02/2021 | 24/03/2021 | 17/04/2021 | 27/05/2021 | 23/06/2021 | 23/07/2021 | 23/08/2021 | 25/09/2021 | 19/10/2021 | 13/12/2021 |
| 23 | 22/02/2021 | 25/03/2021 | 17/04/2021 | 27/05/2021 | 23/06/2021 | 24/07/2021 | 24/08/2021 | 26/09/2021 | 20/10/2021 | 14/12/2021 |
| 24 | 22/02/2021 | 26/03/2021 | 18/04/2021 | 28/05/2021 | 24/06/2021 | 25/07/2021 | 25/08/2021 | 26/09/2021 | 20/10/2021 | 21/12/2021 |
| 25 | 23/02/2021 | 26/03/2021 | 19/04/2021 | 28/05/2021 | 25/06/2021 | 26/07/2021 | 26/08/2021 | 27/09/2021 | 21/10/2021 | 22/12/2021 |
| 26 | 25/02/2021 | 27/03/2021 | 20/04/2021 | 29/05/2021 | 26/06/2021 | 27/07/2021 | 27/08/2021 | 28/09/2021 | 21/10/2021 | 23/12/2021 |
| 27 | 26/02/2021 | 28/03/2021 | 29/04/2021 | 30/05/2021 | 27/06/2021 | 28/07/2021 | 28/08/2021 | 28/09/2021 | 22/10/2021 | 28/12/2021 |

| | | | | | | | | | | |
|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 28 | 27/02/2021 | 29/03/2021 | 29/04/2021 | 30/05/2021 | 28/06/2021 | 29/07/2021 | 29/08/2021 | 29/09/2021 | 22/10/2021 | 29/12/2021 |
| 29 | 28/02/2021 | 30/03/2021 | 30/04/2021 | 31/05/2021 | 29/06/2021 | 30/07/2021 | 30/08/2021 | 30/09/2021 | 23/10/2021 | 30/12/2021 |
| 30 | 28/02/2021 | 31/03/2021 | 30/04/2021 | 31/05/2021 | 30/06/2021 | 31/07/2021 | 31/08/2021 | 30/09/2021 | 23/10/2021 | 31/12/2021 |

Tabla 15: Filtros de los cuales se tomó muestra para los blancos compuestos.

| N° filtro PM ₁₀ | Días seleccionados* | | N° filtro PM _{2,5} | Días seleccionados* |
|----------------------------|---------------------|--|-----------------------------|---------------------|
| 1 | 26/01/2021 | | 1 | 02/02/2021 |
| 2 | 23/02/2021 | | 2 | 17/02/2021 |
| 3 | 11/03/2021 | | 3 | 01/03/2021 |
| 4 | 26/03/2021 | | 4 | 16/03/2021 |
| 5 | 27/04/2021 | | 5 | 27/04/2021 |
| 6 | 27/05/2021 | | 6 | 02/06/2021 |
| 7 | 08/06/2021 | | 7 | 29/06/2021 |
| 8 | 21/06/2021 | | 8 | 03/08/2021 |
| 9 | 09/07/2021 | | 9 | 18/08/2021 |
| 10 | 05/08/2021 | | 10 | 02/09/2021 |
| 11 | 18/08/2021 | | 11 | 16/09/2021 |
| 12 | 02/09/2021 | | 12 | 14/10/2021 |
| 13 | 14/10/2021 | | 13 | 02/12/2021 |
| 14 | 26/10/2021 | | 14 | 17/12/2021 |
| 15 | 02/12/2021 | | 15 | 26/10/2021 |

*Se toman dos sacabocados de cada filtro.

7.2 Anexo 2. Datos experimentales.

Tabla 16: Datos experimentales PM₁₀ ensayo DTT

| PM ₁₀ DTT | Absorbancia | | | | | | | | | | |
|-------------------------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Tiempo (s) | Feb. | Mar. | Abr. | May. | Jun. | Jul. | Ago. | Sep. | Oct. | Nov. |
| 0 | | 0,474 | 0,464 | 0,484 | 0,497 | 0,482 | 0,491 | 0,511 | 0,495 | 0,507 | 0,501 |
| 5 | | 0,461 | 0,448 | 0,467 | 0,468 | 0,456 | 0,466 | 0,500 | 0,478 | 0,491 | 0,475 |
| 10 | | 0,441 | 0,426 | 0,457 | 0,424 | 0,462 | 0,454 | 0,488 | 0,454 | 0,469 | 0,444 |

| | | | | | | | | | | |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 15 | 0,434 | 0,406 | 0,441 | 0,382 | 0,441 | 0,434 | 0,461 | 0,436 | 0,445 | 0,408 |
| 20 | 0,410 | 0,381 | 0,407 | 0,356 | 0,424 | 0,424 | 0,428 | 0,414 | 0,423 | 0,372 |

Tabla 17: Datos experimentales de blancos PM₁₀ ensayo DTT

| PM₁₀ DTT | Absorbancia | | | |
|--------------------------------|--------------------|-------|-------|-------|
| | Tiempo (s) | BC1 | BC2 | BC3 |
| 0 | 0,531 | 0,485 | 0,477 | 0,508 |
| 5 | 0,498 | 0,463 | 0,469 | 0,49 |
| 10 | 0,478 | 0,434 | 0,449 | 0,478 |
| 15 | 0,475 | 0,409 | 0,444 | 0,447 |
| 20 | 0,465 | 0,388 | 0,441 | 0,425 |

Tabla 18: Datos experimentales PM_{2.5} ensayo DTT

| PM_{2.5} DTT | Absorbancia | | | | | | | | | |
|---------------------------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Tiempo (s) | Feb. | Mar. | Abr. | May. | Jun. | Jul. | Ago. | Sep. | Oct. |
| 0 | 0,521 | 0,506 | 0,507 | 0,486 | 0,43 | 0,48 | 0,428 | 0,433 | 0,436 | 0,435 |
| 5 | 0,512 | 0,509 | 0,495 | 0,477 | 0,414 | 0,474 | 0,439 | 0,442 | 0,445 | 0,442 |
| 10 | 0,521 | 0,492 | 0,503 | 0,475 | 0,412 | 0,484 | 0,431 | 0,445 | 0,441 | 0,447 |
| 15 | 0,506 | 0,496 | 0,506 | 0,474 | 0,414 | 0,486 | 0,43 | 0,435 | 0,439 | 0,439 |
| 20 | 0,504 | 0,503 | 0,508 | 0,480 | 0,410 | 0,484 | 0,427 | 0,441 | 0,438 | 0,441 |

Tabla 19: Datos experimentales de blancos PM_{2.5} ensayo DTT

| PM_{2.5} DTT | Absorbancia | | |
|---------------------------------|--------------------|-------|-------|
| | Tiempo (s) | BC1 | BC2 |
| 0 | 0,476 | 0,463 | 0,428 |
| 5 | 0,478 | 0,464 | 0,425 |
| 10 | 0,477 | 0,465 | 0,427 |
| 15 | 0,466 | 0,467 | 0,426 |
| 20 | 0,479 | 0,460 | 0,427 |

Tabla 20: Datos experimentales PM₁₀ ensayo AA

| PM ₁₀ AA | Absorbancias | | | | | | | | | |
|------------------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Tiempo (s) | Feb. | Mar. | Abr. | May. | Jun. | Jul. | Ago. | Sep. | Oct. |
| 0 | 1,432 | 1,437 | 1,243 | 1,195 | 1,589 | 1,637 | 1,481 | 1,829 | 1,546 | 1,723 |
| 2 | 1,398 | 1,399 | 1,199 | 1,13 | 1,573 | 1,596 | 1,389 | 1,653 | 1,458 | 1,465 |
| 4 | 1,360 | 1,342 | 1,145 | 1,097 | 1,529 | 1,56 | 1,358 | 1,564 | 1,398 | 1,442 |
| 6 | 1,336 | 1,288 | 1,092 | 1,106 | 1,492 | 1,517 | 1,315 | 1,543 | 1,345 | 1,391 |
| 8 | 1,312 | 1,236 | 1,039 | 1,093 | 1,477 | 1,473 | 1,271 | 1,500 | 1,295 | 1,351 |
| 10 | 1,288 | 1,184 | 0,986 | 1,061 | 1,464 | 1,431 | 1,224 | 1,451 | 1,246 | 1,292 |
| 12 | 1,264 | 1,134 | 0,933 | 1,026 | 1,427 | 1,390 | 1,183 | 1,415 | 1,195 | 1,244 |
| 14 | 1,241 | 1,085 | 0,882 | 0,992 | 1,399 | 1,351 | 1,138 | 1,376 | 1,146 | 1,196 |
| 16 | 1,217 | 1,036 | 0,832 | 0,959 | 1,373 | 1,311 | 1,094 | 1,340 | 1,096 | 1,148 |
| 18 | 1,195 | 0,989 | 0,782 | 0,929 | 1,352 | 1,273 | 1,052 | 1,301 | 1,047 | 1,103 |
| 20 | 1,172 | 0,943 | 0,733 | 0,899 | 1,341 | 1,235 | 1,007 | 1,266 | 0,998 | 1,060 |

Tabla 21: Datos experimentales de blancos PM₁₀ ensayo AA

| PM ₁₀ AA | Absorbancias | | | |
|------------------------|--------------|-------|-------|-------|
| | Tiempo (s) | BC1 | BC5 | BC3 |
| 0 | 1,498 | 1,239 | 1,572 | 1,503 |
| 2 | 1,480 | 1,192 | 1,513 | 1,425 |
| 4 | 1,466 | 1,136 | 1,506 | 1,380 |
| 6 | 1,453 | 1,082 | 1,487 | 1,336 |
| 8 | 1,439 | 1,027 | 1,464 | 1,287 |
| 10 | 1,424 | 0,972 | 1,451 | 1,240 |
| 12 | 1,411 | 0,917 | 1,435 | 1,197 |
| 14 | 1,396 | 0,864 | 1,415 | 1,143 |
| 16 | 1,383 | 0,811 | 1,394 | 1,094 |
| 18 | 1,370 | 0,761 | 1,372 | 1,044 |
| 20 | 1,356 | 0,710 | 1,350 | 0,993 |

Tabla 22: Datos experimentales PM_{2.5} ensayo AA

| PM _{2.5} AA | Absorbancias | | | | | | | | | |
|-------------------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Tiempo (s) | Feb. | Mar. | Abr. | May. | Jun. | Jul. | Ago. | Sep. | Oct. |
| 0 | 1,149 | 1,327 | 1,297 | 1,372 | 1,367 | 1,269 | 1,256 | 1,207 | 1,230 | 1,274 |
| 2 | 1,139 | 1,304 | 1,258 | 1,344 | 1,366 | 1,267 | 1,255 | 1,206 | 1,227 | 1,272 |
| 4 | 1,143 | 1,303 | 1,260 | 1,338 | 1,360 | 1,267 | 1,253 | 1,204 | 1,225 | 1,272 |
| 6 | 1,141 | 1,298 | 1,254 | 1,337 | 1,355 | 1,264 | 1,250 | 1,202 | 1,222 | 1,269 |
| 8 | 1,136 | 1,299 | 1,243 | 1,332 | 1,349 | 1,261 | 1,248 | 1,199 | 1,220 | 1,266 |
| 10 | 1,133 | 1,293 | 1,239 | 1,327 | 1,343 | 1,259 | 1,246 | 1,197 | 1,218 | 1,264 |
| 12 | 1,132 | 1,287 | 1,234 | 1,324 | 1,338 | 1,257 | 1,244 | 1,195 | 1,213 | 1,262 |
| 14 | 1,130 | 1,284 | 1,231 | 1,320 | 1,332 | 1,254 | 1,242 | 1,192 | 1,213 | 1,259 |
| 16 | 1,128 | 1,282 | 1,229 | 1,315 | 1,326 | 1,252 | 1,239 | 1,190 | 1,210 | 1,256 |
| 18 | 1,125 | 1,280 | 1,224 | 1,311 | 1,320 | 1,249 | 1,237 | 1,188 | 1,208 | 1,254 |
| 20 | 1,124 | 1,277 | 1,221 | 1,308 | 1,313 | 1,247 | 1,235 | 1,185 | 1,206 | 1,251 |

Tabla 23: Datos experimentales de blancos PM_{2.5} ensayo AA

| PM _{2.5} AA | Absorbancias | | |
|-------------------------|--------------|-------|-------|
| | Tiempo (s) | BC1 | BC2 |
| 0 | 1,324 | 1,388 | 1,276 |
| 2 | 1,282 | 1,383 | 1,274 |
| 4 | 1,272 | 1,382 | 1,272 |
| 6 | 1,272 | 1,380 | 1,270 |
| 8 | 1,267 | 1,378 | 1,267 |
| 10 | 1,264 | 1,376 | 1,266 |
| 12 | 1,256 | 1,373 | 1,263 |
| 14 | 1,253 | 1,372 | 1,262 |
| 16 | 1,251 | 1,371 | 1,259 |
| 18 | 1,249 | 1,367 | 1,257 |
| 20 | 1,246 | 1,365 | 1,255 |

Tabla 24: Datos experimentales de PM₁₀ para el cálculo de PO

| PM ₁₀ | | | | | |
|------------------|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Muestra | V _m (m ³) | n ₀ ^{DTT} (nmol) | n _r ^{DTT} (nmol) | n ₀ ^{AA} (nmol) | n _r ^{AA} (nmol) |
| Feb. | 27,5108 | 45,8662 | 39,6733 | 298,7736 | 244,5270 |
| Mar. | 27,2970 | 45,8662 | 37,6617 | 298,7736 | 196,0637 |
| Abr. | 27,5124 | 51,4739 | 43,2849 | 307,8015 | 198,5264 |
| May. | 27,5701 | 51,4739 | 36,8706 | 308,3125 | 231,9439 |
| Jun. | 27,6327 | 51,4739 | 45,2799 | 308,3125 | 260,1933 |
| Jul. | 27,7707 | 51,4739 | 44,4499 | 308,3125 | 232,5999 |
| Ago. | 27,7903 | 50,3394 | 42,1629 | 299,9659 | 203,9606 |
| Sep. | 27,7732 | 50,3394 | 42,1020 | 299,9659 | 207,6309 |
| Oct. | 27,6677 | 50,3394 | 41,9991 | 299,9659 | 193,6391 |
| Nov. | 27,3683 | 50,3394 | 37,3777 | 299,9659 | 184,5409 |
| BC1 | 27,5893 | 45,8662 | 40,1653 | 298,7736 | 270,4519 |
| BC2 | 27,5893 | 51,4739 | 41,1791 | | |
| BC3 | 27,5893 | 51,4739 | 47,5891 | 308,3125 | 264,7722 |
| BC4 | 27,5893 | 50,3394 | 42,1146 | 299,9659 | 198,1811 |
| BC5 | 27,5893 | | | 307,8014 | 193,4803 |

Tabla 25: Datos experimentales de PM_{2.5} para el cálculo de PO

| PM _{2.5} | | | | | |
|-------------------|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Muestra | V _m (m ³) | n ₀ ^{DTT} (nmol) | n _r ^{DTT} (nmol) | n ₀ ^{AA} (nmol) | n _r ^{AA} (nmol) |
| Feb. | 26,4240 | 50,3394 | 48,6968 | 298,0922 | 291,606 |
| Mar. | 26,3447 | 50,3394 | 50,0409 | 298,0922 | 286,8604 |
| Abr. | 26,5321 | 50,3394 | 50,4387 | 298,0922 | 280,6250 |
| May. | 26,3088 | 52,3166 | 51,6708 | 323,1320 | 308,0587 |
| Jun. | 26,3373 | 52,3166 | 49,8833 | 323,1320 | 310,3674 |
| Jul. | 26,5502 | 52,3166 | 52,7526 | 323,1320 | 317,5300 |
| Ago. | 26,9097 | 51,5063 | 51,3859 | 298,4329 | 293,4432 |
| Sep. | 26,3841 | 51,5063 | 52,4579 | 298,4329 | 292,9933 |
| Oct. | 26,3500 | 51,50623 | 51,7426 | 298,4329 | 292,6098 |
| Nov. | 26,3508 | 51,5063 | 52,2167 | 298,4329 | 293,0452 |

| | | | | | |
|------------|---------|---------|---------|----------|----------|
| BC1 | 26,4492 | 50,3394 | 50,6566 | 298,0922 | 280,5309 |
| BC2 | 26,4492 | 52,3166 | 51,9777 | 323,1320 | 317,7775 |
| BC3 | 26,4492 | 51,5063 | 51,3859 | 298,4329 | 293,5214 |

Tabla 26: Datos experimentales para el cálculo de PO con extracción en ultrasonidos

| PM_{2.5} | | | | | |
|-------------------------|--------------------------------------|---|---|--|--|
| Muestra | V_m (m³) | n₀^{DTT} (nmol) | n_f^{DTT} (nmol) | n₀^{AA} (nmol) | n_f^{AA} (nmol) |
| Mar. | 26,3447 | 51,3118 | 51,0163 | 300,1363 | 292,1495 |
| Nov. | 26,3508 | 51,3118 | 51,1086 | 300,1363 | 291,4102 |
| BC. | 26,4492 | 51,3118 | 51,3118 | 300,1363 | 294,8818 |