

Documentos guía para mediciones y modelización  
de nuevos contaminantes en calidad del aire

# Potencial oxidativo de las partículas



Autores: Pamela Dominutti (CNRS), Jean-Luc Jaffrezo (CNRS), Roy Harrison (UoB), Xavier Querol (CSIC) & Gaëlle Uzu (CNRS)

Revisado por: Katriina Kyllönen (FMI), Elli Suhonen (FMI), Tuukka Petäjä (UHEL)

Traducción al español: Inés González-de Castro (CSIC)



en colaboración con



*Imagen de portada creada con IA mediante RECRAFT*

## **Research Infrastructures Services Reinforcing Air Quality Monitoring Capacities in European Urban & Industrial Areas (RI-URBANS)**

**RI-URBANS (<http://www.RIURBANS.eu>) cuenta con el apoyo de la Comisión Europea en el marco del Programa Marco de Investigación e Innovación Horizonte 2020. H2020-GD-2020. Número de Acuerdo de Subvención: 10103624**



# Índice

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>I</b>
<b>ELEMENTOS Y ESPECIES QUÍMICAS</b> .....	<b>II</b>
<b>1. PREÁMBULO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. DEFINICIÓN DE POTENCIAL OXIDATIVO DE PM</b> .....	<b>2</b>
2.1. VARIABILIDAD ESPACIAL Y TEMPORAL DEL POTENCIAL OXIDATIVO DEL PM .....	3
2.2. RELACIÓN ENTRE EL POTENCIAL OXIDATIVO DE PM Y LOS IMPACTOS EN SALUD .....	5
<b>3. MÉTODOS DE MEDICIÓN DEL POTENCIAL OXIDATIVO DE PM Y CONTROL DE CALIDAD</b> .....	<b>7</b>
3.1. ARMONIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE MEDICIÓN .....	7
3.2. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS Y PROTOCOLOS DISPONIBLES .....	8
3.3. RECOMENDACIONES PARA LA MEDICIÓN DEL POTENCIAL OXIDATIVO DE PM .....	9
3.3.1. MUESTREO, CONSERVACIÓN Y TRATAMIENTOS PREVIOS AL ANÁLISIS .....	9
3.3.2. EL TIPO DE ENSAYOS RECOMENDADOS .....	10
3.3.3. PROTOCOLO OP <sup>DTT</sup> SIMPLIFICADO Y ARMONIZADO (OP <sup>DTT</sup> RI-URBANS' SOP) «EVALUACIÓN DE LA REACTIVIDAD ACELULAR DE LAS PARTÍCULAS MEDIANTE ENSAYO CON DITIOTREITOL (DTT)» .....	11
3.3.3.1. Método 1 - Ensayo OP <sup>DTT</sup> utilizando lectores de placas .....	11
3.3.3.2. Reactivos .....	12
3.3.3.3. Soluciones de suspensión de PM que deben analizarse - muestras .....	12
3.3.3.4. Material .....	12
3.3.3.5. Procedimiento para lectores de placas inyectados automáticamente .....	13
3.3.3.6. Procedimiento para lectores de placas sin inyectores .....	14
3.4. RESULTADOS DE LA PRIMERA COMPARACIÓN INTER-LABORATORIO DEL POTENCIAL OXIDATIVO .....	16
3.5. GESTIÓN DE DATOS .....	19
<b>4. POTENCIAL OXIDATIVO DE PM EN EUROPA</b> .....	<b>19</b>
4.1. POTENCIAL OXIDATIVO DE PM EN LA EUROPA URBANA .....	19
4.2. NIVELES DE OP EN EMPLAZAMIENTOS URBANOS DE EUROPA .....	26
4.2.1. Francia .....	26
4.2.2. Grecia .....	27
4.2.3. Hungría .....	28
4.2.4. Italia .....	28
4.2.5. España .....	29
4.2.6. Suiza .....	29
4.2.7. Países Bajos .....	30
4.2.8. Síntesis .....	31
<b>5. RECOMENDACIONES GENERALES PARA UNA MAYOR NORMALIZACIÓN DE OTROS PROTOCOLOS DE POTENCIAL OXIDATIVO DE PM</b> .....	<b>33</b>
5.1. LA SELECCIÓN DEL ENSAYO DE OP DE PM .....	33
5.2. ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS .....	33
5.3. CONDICIONES DE LABORATORIO .....	34
5.4. EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA PARA EL ENSAYO .....	34
5.5. FASE DE REACCIÓN DEL ENSAYO .....	34
5.6. DESARROLLO DE UN MATERIAL DE REFERENCIA CON UN «VALOR DE OP DE PM» CERTIFICADO .....	34
5.7. CALIBRACIÓN DE EQUIPOS .....	35
5.8. INFORME DE RESULTADOS .....	35
5.9. MEDICIÓN DE OP EN SUPERESTACIONES DE CALIDAD DEL AIRE DE LA UE .....	35
<b>6. REFERENCIAS</b> .....	<b>36</b>



## Abreviaturas

<b>ACTRIS</b>	Infraestructura de investigación de Aerosoles, Nubes y Gases traza
<b>BB</b>	Quema de biomasa
<b>BBOA</b>	Aerosol orgánico de combustión de biomasa
<b>CA</b>	Calidad del aire
<b>EC</b>	Carbono elemental
<b>EEA</b>	Agencia Europea de Medio Ambiente
<b>EPR</b>	Resonancia paramagnética electrónica
<b>ESR</b>	Resonancia de espín electrónico
<b>FOX</b>	Naranja férrico-xilenol
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>HOA</b>	Aerosol orgánico similar a los hidrocarburos
<b>ILC</b>	Comparación inter-laboratorio internacional
<b>LUR</b>	Modelo de regresión del uso del suelo
<b>LV-OOA</b>	Aerosol orgánico oxidado de baja volatilidad
<b>NDECA</b>	Nueva Directiva Europea sobre la Calidad del Aire (formalmente adoptada el 14 de octubre de 2024)
<b>OC</b>	Carbono orgánico
<b>OP</b>	Potencial oxidativo
<b>OP<sup>AA</sup></b>	Potencial oxidativo medido a través del agotamiento del ácido ascórbico, un antioxidante pulmonar.
<b>OP<sup>DTT</sup></b>	Potencial oxidativo medido a través del agotamiento del ditioneína, un sustituto del antioxidante pulmonar.
<b>OP<sup>GSH</sup></b>	Potencial oxidativo medido a través del agotamiento del glutatión, un antioxidante pulmonar.
<b>OP<sup>OH</sup></b>	Potencial oxidativo medido a través de la formación de radicales hidroxilo
<b>OP<sup>ESR</sup></b>	Potencial oxidativo medido a través de la formación de radicales libres unidos a partículas mediante resonancia paramagnética electrónica.
<b>OP<sub>v</sub></b>	Potencial oxidativo extrínseco
<b>PAH</b>	Hidrocarburo poliaromático
<b>PCA</b>	Análisis de componentes principales
<b>PM</b>	Materia particulada
<b>PM<sub>1</sub></b>	Concentración másica de partículas <1 µm
<b>PM<sub>2.5</sub></b>	Concentración másica de partículas <2.5 µm
<b>PM<sub>10</sub></b>	Concentración másica de partículas <10 µm
<b>PMF</b>	Factorización de matrices positivas, un modelo receptor para la distribución de fuentes
<b>RI-URBANS</b>	<i>Research Infrastructures Services Reinforcing Air Quality Monitoring Capacities in European Urban &amp; Industrial Areas EU-project</i>
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>SOP</b>	Procedimiento operativo estándar

## Elementos y especies químicas

<b>AA</b>	Ácido ascórbico
<b>Cr</b>	Cromo
<b>Cu</b>	Cobre
<b>DCF</b>	2,7-diclorofluoresceína
<b>DCFH</b>	Diclorodihidrofluoresceína
<b>DTNB</b>	Ácido dinitrotiobenzoico
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>Fe</b>	Hierro
<b>GSH</b>	Glutación
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>K</b>	Potasio
<b>Mn</b>	Manganeso
<b>MSA</b>	Ácido metanosulfónico
<b>Ni</b>	Níquel
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Radical superóxido
<b>•OH</b>	Radical hidroxilo
<b>TNB</b>	Trinitrobenzeno
<b>UA</b>	Ácido úrico
<b>V</b>	Vanadio
<b>Zn</b>	Zinc

# 1. PREÁMBULO

Este documento se ha traducido al español con el apoyo del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITERD). El documento está vinculado con las necesidades de la Nueva Directiva Europea de Calidad del Aire (NDECA). Ha sido preparado como parte del proyecto europeo "Research Infrastructures Services Reinforcing Air Quality Monitoring Capacities in European Urban & Industrial Areas" (RI-URBANS) que enlaza la experiencia en observación atmosférica de "Aerosols, Clouds and Trace gases Research InfraStructure Consortium", ACTRIS-ERIC con las capacidades de observación de la calidad del aire (CA) urbano de las redes de vigilancia de la CA (RVCAs).

La NDECA subraya la importancia que tienen los nuevos contaminantes sobre la CA y el bienestar de los ciudadanos. En concreto, se requiere que los nuevos contaminantes, como partículas ultrafinas (UFP), distribución de tamaño del número de UFP (PSND), *Black Carbon* (BC), carbono elemental (EC), amoníaco (NH<sub>3</sub>), un gran número de compuestos orgánicos volátiles (COVs) y las mediciones de trazadores potencialmente tóxicos de material particulado (potencial oxidativo (OP, por sus siglas en inglés) del material particulado (PM)), sean monitorizados tanto en superestaciones rurales como urbanas, con el fin de respaldar el conocimiento científico de sus efectos sobre la salud y el medio ambiente.

Este documento guía describe los pasos necesarios para realizar mediciones del OP de PM atmosférico y proporciona una actualización del estado del arte en esta armonización. Este documento guía describe los diferentes ensayos de OP. También proporciona información de los últimos estudios que comparan datos y explica su conexión con las fuentes de emisión, la composición química y el tamaño del PM. Además, ofrece recomendaciones a seguir en la implementación de mediciones de OP de PM de acuerdo con las conclusiones obtenidas en el primer ejercicio internacional de comparación inter-laboratorio desarrollado en el marco del proyecto RI-URBANS. Finalmente, se comparte un protocolo de medición simplificado desarrollado para el ensayo de OP-ditiotretitol (DTT), el más utilizado, donde los pasos más críticos se han optimizado y armonizado en el marco de una tarea específica de RI-URBANS por un conjunto de laboratorios expertos.

Esta es una guía de RI-URBANS para el protocolo / método específico que forma parte del entregable D46 (D6.1) de RI-URBANS, el cual, con el apoyo para la publicación de AXA *Research Fund*, conforma

la difusión final D55 (D7.6). Cualquier diseminación de estos resultados debe indicar que el documento solo refleja las opiniones de los autores y que ni la Comisión Europea ni el MITERD son responsables de ningún uso que se haga de la información que contiene.

## 2. DEFINICIÓN DE POTENCIAL OXIDATIVO DE PM

Los efectos sobre la salud atribuibles al PM son complejos y diversos, y en general, el PM<sub>2.5</sub> se considera actualmente el principal contribuyente ambiental a los efectos adversos para la salud a nivel mundial (WHO, 2017). El PM puede actuar a través de diferentes mecanismos, como el estrés oxidativo y la inflamación, alteraciones genómicas, deterioro de la función del sistema nervioso y alteraciones epigenéticas, entre otros. Por lo tanto, no es posible abarcar todos estos efectos mediante el monitoreo de un solo parámetro de calidad del aire.

**El potencial oxidativo del material particulado (OP de PM)** representa la capacidad del PM de provocar reacciones oxidativas o generar especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) en un medio biológico. (Bates et al., 2015; Cho et al., 2005; Sauvain et al., 2008; Uzu et al., 2011). Las ROS pueden ser transportadas por el PM o ser inducidas/producidas a partir de sus interacciones con el sistema biológico (por ejemplo, fluidos, células y tejidos) y cuantificarse mediante diferentes metodologías (Goldsmith et al., 1997; Landreman et al., 2008; Sarnat et al., 2016). El OP se puede calcular para diferentes moléculas objetivo, como el 1.4-ditiotreitól (OP<sup>DTT</sup>), ácido ascórbico (OP<sup>AA</sup>), glutatión (OP<sup>GSH</sup>), ácido úrico (OP<sup>UA</sup>), y 2,7-diclorodihidrofluoresceína (OP<sup>DCFH</sup>), entre los más utilizados. Estos se conocen como ensayos de depleción de OP (Janssen et al., 2014; Shen et al., 2022). Además, el ensayo (OP<sup>ESR</sup>) mide el OP en función de la capacidad del PM para generar radicales hidroxilo ( $\bullet$ OH) en presencia de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), y la trampa de espín 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO) (Janssen et al., 2014), el ensayo OP<sup>OH</sup> mide la formación del radical hidroxilo ( $\bullet$ OH) en el líquido pulmonar sustitutivo que contiene los principales antioxidantes pulmonares, mientras que el ensayo de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR, por sus siglas en inglés) mide los radicales libres unidos a partículas (Shen et al., 2022).

El OP suele ser una medición cinética basada en la tasa de agotamiento de antioxidantes o sustitutivos cuando entran en contacto con PM. El OP puede ser normalizado en masa (OP<sub>m</sub>

expresado en  $\text{nmolAnti-Ox.min}^{-1}.\mu\text{g}^{-1}$ ) representando la capacidad inherente de un  $\mu\text{g}$  de PM para oxidar el pulmón y está relacionado con la “nocividad” de dicho PM. El OP también puede ser normalizado por volumen (OPv expresado en  $\text{nmolAnti-Ox.min}^{-1}.\text{m}^{-3}$ ) en relación con la exposición de la población a compuestos oxidantes atmosféricos. Cabe destacar que el OPv de PM suele abreviarse como OP de PM y el OPm también se denomina «OP intrínseco» en la literatura científica.

## 2.1. Variabilidad espacial y temporal del potencial oxidativo del PM

La actividad del OP del PM puede variar en función de la existencia de fuentes de emisión, sus características químicas (p. ej., especiación y solubilidad), así como del tamaño y la superficie de la partícula. Puede considerarse una métrica integral asociada con la toxicidad de las partículas a través del estrés oxidativo, como sugieren Calas et al. (2018). Partiendo del concepto de que la exposición al PM puede desencadenar estrés oxidativo, el OP del PM puede contribuir a identificar los componentes del PM responsables de ciertos efectos observados sobre la salud.

Los niveles de OP se pueden medir mediante diferentes pruebas acelulares que involucran diferentes antioxidantes/sustitutos (ver secciones adicionales) que pueden brindar información sobre el OP intrínseco (OP normalizado en masa en  $\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ ) y la exposición al OP (volumen normalizado de OP en  $\text{nmol min}^{-1} \text{m}^{-3}$ ).

Los niveles de OP de PM pueden variar de un lugar a otro, ya que se ven afectados por la composición química, las fuentes de emisión que impactan en el PM y el tamaño y la carga de PM en cada lugar específico. En los últimos 10 años, se han conseguido mejoras muy importantes en los métodos de asignación de fuentes para determinar y cuantificar las principales fuentes y procesos que influyen en el PM medido en una ubicación determinada. Además, algunos estudios se han centrado en vincular el OP del PM con contribuciones de fuentes de emisión específicas (Bates et al., 2019 y sus referencias) o en establecer modelos de regresión predictiva basados en las concentraciones de los componentes del PM (Weber et al., 2018; Weichenthal et al., 2016). Muchos estudios han desarrollado recientemente técnicas de contribución de fuentes al PM, como el análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés), factorización de matrices positivas (PMF, por sus siglas en inglés), análisis de *random forest* y modelos neuronales de perceptrón multicapa (Borlaza et al., 2021; Daellenbach et al., 2020; Grange et al., 2022; in 't Veld et al., 2023; Shen et al., 2022; Srivastava et al., 2018; Weber et al., 2021. 2019) que aplicados a series de PM de las que se

tiene especiación química y OP, pueden ser muy útiles para identificar que fuentes son las causantes del OP del PM.

Debido a la estacionalidad de las fuentes de emisiones (por ejemplo, la quema de biomasa residencial en invierno), algunos estudios han obtenido diferencias importantes entre el OP del PM para diferentes épocas del año, mientras que otros no (Borlaza et al., 2021; Calas et al., 2019; Cesari et al., 2019; Dominutti et al., 2023; Paraskevopoulou et al., 2019; Perrone et al., 2016; Pietrogrande et al., 2018; Zhou et al., 2019). En general, los estudios realizados en regiones con fuertes cambios estacionales (zonas montañosas) presentan mayores diferencias de contribuciones de fuentes que los realizados en zonas templadas (zonas costeras). Además, varios estudios ya han demostrado que las diferentes contribuciones de fuentes de PM tienen distinta sensibilidad a las pruebas de OP (Bates et al., 2015; Cesari et al., 2019; Daellenbach et al., 2020; Dominutti et al., 2023; Fang et al., 2016; Paraskevopoulou et al., 2019; Verma et al., 2014; Weber et al., 2018; Zhou et al., 2019). En particular, las fuentes con altas concentraciones de metales de transición, como el tráfico rodado, el polvo de rodadura y las fuentes industriales, parecen tener un mayor potencial intrínseco que otras fuentes de PM para un tipo de OP determinado. Sin embargo, aún existe un número limitado de estudios que integran el monitoreo composicional de PM a largo plazo, y solo en ocasiones consideran la variabilidad estacional. Por consiguiente, es posible que no abarquen una variabilidad completa de las fuentes de emisión para un sitio determinado, omitiendo algunas características importantes sobre el OP de PM relacionado con las fuentes. Esta limitación es aún mayor en términos de distribución espacial. La mayoría de los estudios se desarrollaron en regiones de alto desarrollo económico, donde las discrepancias relacionadas con las fuentes de emisión son menos significativas.

Finalmente, obtener un modelo general que vincule el OP de PM con los componentes del PM específicos del sitio, o las contribuciones de las fuentes de emisión, es un desafío, ya que el OP depende no solo de las concentraciones de especies redox activas, sino también de factores que influyen en la diversidad de reacciones redox y la formación de ROS en el cuerpo humano (Shahpoury et al., 2022). Por lo tanto, la selección de los ensayos de OP para obtener una amplia gama de determinantes de OP dependerá del conocimiento previo sobre las características del PM en una ubicación determinada. La combinación de dos o tres ensayos de OP con sensibilidades complementarias proporcionará información más exhaustiva sobre las características del PM que subyacen a los efectos del OP en la salud humana.

## 2.2. Relación entre el potencial oxidativo de PM y los impactos en salud

La investigación sobre mediciones del OP de PM comenzó en 2005, y se han dedicado considerables esfuerzos al desarrollo de protocolos de medición y a la vinculación de este nuevo parámetro con los compuestos de PM, sus fuentes de emisión y sus efectos adversos para la salud. Los avances recientes en técnicas de laboratorio de alto rendimiento y en métodos en tiempo real para la medición de OP de PM, así como en la atribución del OP de PM a la contribución de fuentes de PM, tendrán un impacto significativo en la identificación de las principales fuentes de emisión responsables del daño oxidativo pulmonar. Esto, a su vez, permitirá desarrollar estrategias más efectivas para mitigar los efectos negativos de la contaminación atmosférica sobre la salud. El valor añadido del OP de PM parece ser una propiedad esencial de las partículas, que constituye un factor unificador entre las fuentes de PM y sus efectos sobre la salud.

Recientemente, el OP de PM y sus fuentes relacionadas se han vinculado con ciertos impactos en salud. Sin embargo, aún se necesitan evidencias más claras del OP de PM como indicador de los efectos en salud, y hasta la fecha no existe consenso sobre uno o varios métodos estandarizados para medir el OP de PM. En los últimos años, cada vez hay más evidencia que asocia ensayos OP<sup>DTT</sup> y OP<sup>AA</sup> con ciertos efectos en salud (Bates et al., 2015; Borlaza et al., 2022; Canova et al., 2014; Fang et al., 2017b; Janssen et al., 2015; Marsal et al., 2023; Strak et al., 2017; Weichenthal et al., 2016; Yang et al., 2016). Algunos estudios han evaluado las asociaciones entre los ensayos de OP y los efectos en salud, utilizando observaciones del OP de PM mediante mediciones y utilizando estas en modelización (como los modelos de regresión del uso del suelo, LUR), para evaluar la variabilidad espacial del OP del PM cuando no se disponía de mediciones (Bates et al., 2015; Gulliver et al., 2018; Strak et al., 2017).

Numerosos estudios basados en la medida del OP<sup>AA</sup> no encontraron efectos significativos en la salud para los primeros años de vida, la mortalidad respiratoria y cardiovascular, las emergencias cardiorrespiratorias y la mortalidad por cáncer de pulmón (Borlaza et al., 2022; Fang et al., 2017a; Maikawa et al., 2016; Marsal et al., 2023; Weichenthal et al., 2016). No obstante, se identificaron ciertas asociaciones positivas entre el OP<sup>AA</sup> de PM y biomarcadores inflamatorios sistémicos, así como para el OP<sup>ESR</sup>, en estudios centrados en la exposición a corto plazo (Janssen et al., 2015; Liu et al., 2018; Marsal et al., 2024). Estos resultados sugieren que el OP<sup>AA</sup> proporciona una visión limitada de la conexión entre el OP de PM y los efectos adversos para la salud. Sin embargo, el conjunto de

estudios existentes es insuficiente para descartar su capacidad predictiva de los resultados para la salud. Los estudios de Korsiak et al. (2022) y Toyib et al. (2022) establecieron fuertes asociaciones entre el PM<sub>2.5</sub> en exteriores, los gases oxidantes, las hospitalizaciones respiratorias de niños y la mortalidad cuando los niveles de metales, azufre y el OP de PM (especialmente para OP<sup>GSH</sup> y, en casos específicos, OP<sup>AA</sup>) eran elevados.

Por otro lado, dos sondas tiol-base han mostrado asociaciones más positivas con la salud. En varios estudios, el OP<sup>DTT</sup> se ha relacionado con diversos síntomas de valoración cardíacos (por ejemplo, infarto de miocardio) y respiratorios agudos (Abrams et al., 2017; Bates et al., 2015; Delfino et al., 2005; Fang et al., 2017b, 2016; He et al., 2021; Janssen et al., 2015; Weichenthal et al., 2016; Yang et al., 2016). Una cohorte canadiense (193.000 participantes) mostró cierta asociación significativa entre el OP<sup>GSH</sup> y la mortalidad por causas específicas, así como el cáncer de pulmón (Weichenthal et al., 2016). Recientemente, Marsal et al. (2023), en un estudio de cohortes a largo plazo, han establecido una asociación consistente entre el OP<sup>DTT</sup> prenatal personal y varios parámetros de la función pulmonar en los primeros años de vida relacionados con la restricción del crecimiento pulmonar. Estos resultados concuerdan con estudios pioneros que utilizan la cohorte de nacimiento PIAMA (*Prevention and Incidence of Asthma and Mite Allergy*) para demostrar que los efectos en la salud respiratoria estaban más fuertemente asociados con el OP<sup>DTT</sup> que con la masa de PM<sub>2.5</sub> (Yang et al., 2016). Del mismo modo, dos estudios de cohortes hallaron algunas asociaciones positivas entre el OP personal de PM<sub>2.5</sub> y las restricciones del crecimiento fetal, concretamente la disminución del peso y la altura al nacer se correlacionaron con el OP<sup>DTT</sup> y el OP<sup>GSH</sup> (Borlaza et al., 2022; Lavigne et al., 2018). En general, un punto clave de la mayoría de los estudios publicados es que el OP de PM era más predictivo sobre los efectos en salud que otros componentes, incluida la masa de PM.

Por último, un estudio con el método de OP emergente que evalúa una medición directa del radical •OH en el líquido de revestimiento halló algunas asociaciones positivas para el OP<sup>OH</sup> y asma, enfermedades cardiovasculares y bajo peso al nacer (también visto para OP<sup>DTT</sup>) en Los Ángeles (Shen et al., 2022). En cuanto al OP<sup>ESR</sup>, se necesitan más estudios con el OP<sup>OH</sup> para evaluar algunas estadísticas sobre estas metodologías que son prometedoras.

Estos estudios aumentan la evidencia sobre la relevancia del OP de PM como una métrica de exposición útil basada en los efectos en la salud. También promueven el uso de ensayos del OP basados en sondas antioxidantes a base de tioles con una sensibilidad amplia y equilibrada a los

compuestos de PM: el OP<sup>DTT</sup> y el OP<sup>GSH</sup> son hasta la fecha los análisis de OP más prometedores (probablemente con una pequeña ventaja para el OP<sup>DTT</sup> debido a su mayor aplicación en más estudios epidemiológicos por ser el ensayo más antiguo), pero no se pueden descartar otros análisis. En general, las pruebas epidemiológicas siguen siendo limitadas porque este campo de investigación es relativamente reciente. La aplicación del OP de PM en estudios de efectos en la salud se ha hecho posible muy recientemente (menos de 10 años), con la aparición de metodologías de OP que son más rápidas. Sin embargo, estos estudios deben realizarse con protocolos estandarizados de OP de PM para informar sobre: i) la capacidad del OP de PM como predictor de efectos de salud complementario a las mediciones de las concentraciones máxicas de PM y ii) cómo las características del PM y los diferentes análisis de OP pueden relacionar los efectos agudos y crónicos sobre la salud asociados a la contaminación atmosférica.

### 3. MÉTODOS DE MEDICIÓN DEL POTENCIAL OXIDATIVO DE PM Y CONTROL DE CALIDAD

#### 3.1. Armonización de los métodos de medición

Hasta ahora no se ha desarrollado un protocolo armonizado de medición del OP de PM. Diferentes grupos de investigación utilizan sus propios protocolos basados en diferentes sondas o con diferentes pasos con respecto a la extracción, o la propia medición, haciendo que las mediciones no sean comparables.

Aunque se han desarrollado varios análisis acelulares de OP, y en los últimos años se han producido muchas mejoras en el estado de los conocimientos sobre los ensayos del OP, aún son necesarios más avances para lograr la estandarización de los diferentes ensayos de OP. Esto es necesario para alcanzar un consenso científico en cuanto a comparabilidad de mediciones, y así para permitir un uso amplio y preciso de esta medida. Para ello, un grupo de investigadores de la UE, en el marco del proyecto RI-URBANS de la UE, ha desarrollado un protocolo simplificado para un ensayo de OP, el protocolo OP<sup>DTT</sup> (denominado OP<sup>DTT</sup> RI-URBANS' SOP), para poner en marcha el primer ejercicio internacional de comparación entre laboratorios. Las siguientes secciones muestran las recomendaciones actuales para los análisis de OP, los OP<sup>DTT</sup> RI-URBANS' SOP asociados y los resultados de la inter-comparación.

### 3.2. Descripción de los métodos y protocolos disponibles

Como indicador de las propiedades oxidativas del PM, el OP de PM se mide para reflejar la capacidad del PM para generar ROS, ya sea a través del consumo de antioxidantes o de la producción de oxidantes durante el proceso de interacción del PM con el sistema biológico (Goldsmith et al., 1997; Landreman et al., 2008). El OP de PM se puede evaluar en muestras atmosféricas tanto en el laboratorio como en el tiempo real (hasta la fecha sólo hay prototipos de investigación disponibles para este último). El método RI-URBANS se centra en mediciones en el laboratorio a partir de muestras de filtros de PM que se extraen en suspensión líquida (coexisten varios procedimientos) antes de someterlas a los diferentes ensayos.

Se han utilizado dos tipos de métodos para medir el OP de PM, incluidos los ensayos celulares y acelulares. Los ensayos acelulares comúnmente utilizados incluyen el uso de antioxidantes pulmonares o sustitutos tales como DTT, AA, GSH, UA, y DCFH y, en consecuencia, se denominan OP<sup>Anti-Ox</sup>. Concretamente, los ensayos OP<sup>DTT</sup>, OP<sup>AA</sup> y OP<sup>GSH</sup> se basan en la incubación de los antioxidantes (DTT, AA, GSH) en extractos acuosos de PM en agua, metanol o líquido pulmonar simulado (Calas et al., 2017). Las tasas de pérdida (agotamiento) de los antioxidantes proporcionaron una estimación del OP de PM (Massimi et al., 2020). En cambio, el método DCFH se basa en evaluar la reacción ROS del PM con DCFH, un reactivo no fluorescente, en presencia de peroxidasa de rábano picante. Esta reacción produce un compuesto fluorescente, la 2,7-diclorofluoresceína (DCF). Dado que no todos los oxidantes pueden reaccionar con el DCFH, la intensidad de la fluorescencia generada a partir de la reacción no capta necesariamente la capacidad oxidativa total y proporciona solo una aproximación del OP de PM (Massimi et al., 2020; Perrone et al., 2016). De forma similar al ensayo OP<sup>DCFH</sup>, se han desarrollado otros dos métodos para medir la generación continua de ROS a lo largo del tiempo, utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con sondas fluorescentes y resonancia de espín electrónico (ESR) (Bates et al., 2019). En particular, la ESR mide la formación de radicales hidroxilo inducida por PM ( $\bullet\text{OH}$ ) mediante la detección de las señales de resonancia paramagnética de electrones (EPR, por sus siglas en inglés) (Hellack et al., 2014; Shi, 2003). Los métodos HPLC miden una serie de sustancias que se generan por la reacción ROS con sustancias químicas específicamente seleccionadas para el ensayo (Shen et al., 2011). Los diferentes ensayos acelulares se centran en diferentes reacciones redox. Por ejemplo, los métodos ESR y HPLC son más sensibles a ROS específicos, incluyendo al peróxido de hidrógeno

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y al radical OH, mientras que el ensayo OP<sup>DTT</sup> es más sensible al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y al radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Bates et al., 2019; Xiong et al., 2017). Por otra parte, los ensayos de AA y GSH no respondieron específicamente a una ROS en particular, incluyendo •OH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bates et al., 2019). El hecho de centrarse en diferentes reacciones redox podría ser una de las principales causas de las diferencias en el rendimiento de los métodos. Por ejemplo, el OP examinado por el ensayo OP<sup>AA</sup> y el ensayo OP<sup>GSH</sup> en las mismas muestras de PM sólo tienen una correlación moderada ( $r^2 = 0.43-0.45$ ) (Maikawa et al., 2016).

### 3.3. Recomendaciones para la medición del potencial oxidativo de PM

Las recomendaciones que aquí se resumen proceden de los estudios realizados en el marco de RI-URBANS y publicados por Dominutti et al. (2024).

#### 3.3.1. Muestreo, conservación y tratamientos previos al análisis

En la actualidad, las mediciones del OP de PM se realizan principalmente en el laboratorio con muestreadores de filtros que recogen y acumulan PM durante un periodo de tiempo determinado. El muestreo de los filtros puede realizarse con filtros de teflón o de fibra de cuarzo utilizando captadores de bajo volumen/alto volumen, en calidad del aire con equipos de referencia para PM<sub>10</sub> o PM<sub>2.5</sub>, garantizando una carga mínima de PM que permita obtener una concentración de extracción de 25µgPM.ml<sup>-1</sup>. El análisis del OP también requiere utilizar blancos de campo para calcular el OP definitivo.

El método RI-URBANS se centra en las mediciones en el laboratorio de muestras de filtros de PM que se extraen en suspensión líquida (coexisten varios procedimientos) para su posterior incubación y análisis.

Huelga decir que no sólo la preparación, sino también la conservación de las muestras antes de la extracción e incubación afecta a los resultados del OP. En consecuencia, las muestras de filtros PM **tienen que conservarse congelados (o mantenerse a ≤4°C en frío si el análisis es rápido tras la recogida) desde la toma de muestras hasta el análisis, para evitar la pérdida de especies reactivas**. Además de la conservación antes del análisis, el protocolo de extracción de las fracciones de PM de los filtros también es un parámetro clave que hay que armonizar. El PM pueden extraerse utilizando agua, metanol o líquido de revestimiento; con tiempos diversos, ultrasonidos, vórtex o agitación suave. Este paso necesita una mayor estandarización, pero RI-URBANS recomienda una

extracción con un líquido que sea lo más parecido a los del pulmón, es decir, a base de agua (agua ultrapura o tampón a base de agua o líquido de revestimiento pulmonar simulado en base de agua) a pH7.4, y 37.4°C con una extracción en vórtex durante 75 min para extraer todos los compuestos de PM. La sonicación es menos recomendable que la extracción en vórtex porque crea algunos extra-ROS en el medio.

A continuación, los ensayos implican la obtención de extracto de PM filtrado (OP soluble en agua) o suspensiones de PM sin filtrar (OP total, incluidas las fracciones solubles en agua e insolubles) para incubarlas posteriormente con reactivos químicos que influyan en la respuesta. Dado que el PM entra en contacto con los pulmones con compuestos solubles e insolubles, recomendamos evaluar el OP con suspensiones de PM sin filtrar para tener en cuenta tanto la fracción soluble como la insoluble. Cuando se utilizan diferentes protocolos y condiciones, se pueden obtener discrepancias en las mediciones de OP, y este paso crucial necesita una mayor estandarización (Calas et al., 2018; Yang et al., 2014).

### 3.3.2. El tipo de ensayos recomendados

Como se ha mostrado en secciones anteriores, existen diferentes ensayos de OP. La selección de estos influirá en las contribuciones de las fuentes de PM que registrarán los valores del OP de PM con el ensayo seleccionado. Así, el OP<sup>AA</sup> probablemente se verá más afectado por metales específicos y pocos orgánicos específicos, mientras que el OP<sup>DTT</sup> se ve influido por una gama más amplia de contribuciones. En consecuencia, hay que tener en cuenta que la elección del ensayo de OP afecta a la clasificación del OP de la contribución de fuentes del PM, lo que puede complicar el mensaje a transmitir a las partes interesadas locales para las acciones de mitigación (Dominutti et al., 2023; Gao et al., 2020). **Sin embargo, la futura elección del mejor ensayo (o combinación) de OP no depende de la relación que se haga con los compuestos y fuentes de PM, sino de los efectos en salud.**

Actualmente se han evaluado cinco tipos de análisis de OP, y de ellos tres con más detalle, en lo referente a los efectos en la salud. Hasta ahora, se han encontrado pocas asociaciones entre el OP<sup>AA</sup> y efectos en salud, pero sí con biomarcadores de inflamación (Marsal et al., 2024). También faltan estudios concluyentes para los nuevos ensayos directos de OP (OP<sup>OH</sup> y OP<sup>ESR</sup>), aunque parezcan prometedores (Yang et al., 2016). Por ello, a falta de otros ensayos con un número suficiente de estudios, los ensayos de OP basados en tioles, a saber, OP<sup>DTT</sup> y OP<sup>GSH</sup>, emergen como los ensayos de

OP más prometedores en cuanto a su asociación sobre efectos en la salud (Abrams et al., 2017; Borlaza-Lacoste et al., 2024; Fang et al., 2016; Janssen et al., 2015; Weichenthal et al., 2016; Yang et al., 2016). Estas evidencias son suficientes para recomendar un seguimiento rutinario adicional a mayor escala temporal y espacial. El monitoreo de rutina del OP de PM, si se realiza en ciudades europeas, mejorará en gran medida el poder de los estudios epidemiológicos, utilizando el OP como parámetro de calidad del aire para relacionar los efectos en la salud. Para ser más informativo, sería esencial monitorizar simultáneamente PM<sub>2.5</sub>, PM<sub>10</sub> y NO<sub>2</sub> para evaluar el valor añadido en epidemiología de la medida del OP de PM.

Se recomiendan **al menos dos ensayos complementarios y simultáneos, una prueba basada en tioles (OP<sup>DTT</sup> o OP<sup>GSH</sup>) y otra (entre OP<sup>OH</sup>, OP<sup>AA</sup>, u otra) para obtener información de una amplia gama de especies redox-activas**. Se considera que de este modo se evaluará con más profundidad el rango de componentes/contribución de fuentes de PM más oxidantes, y se podrá evaluar mejor su relación en los efectos en la salud. Por último, la selección de las pruebas de OP complementarias que se aplican en un lugar determinado debe evaluarse con prudencia y dependerá en gran medida de los conocimientos previos sobre la geoquímica de las contribuciones de fuentes a PM, las concentraciones y la composición química del PM. Esta estrategia también es esencial, ya que afecta al mensaje que se transmitirá sobre las fuentes objetivo en futuras políticas de mitigación.

En cuanto al uso de un protocolo, el protocolo OP<sup>DTT</sup> se simplificó y armonizó durante el proyecto RI-URBANS, y el mismo se puede encontrar detallado a continuación.

### 3.3.3. Protocolo OP<sup>DTT</sup> simplificado y armonizado (OP<sup>DTT</sup> RI-URBANS' SOP) «Evaluación de la reactividad acelular de las partículas mediante ensayo con ditiotreitól (DTT)»

#### 3.3.3.1. Método 1 - Ensayo OP<sup>DTT</sup> utilizando lectores de placas

Antes de las mediciones de absorbancia de las muestras, se ha de realizar una calibración del dispositivo analítico utilizando una curva de calibración DTT para un rango de concentración entre 0 y 60 µM (valoración con 1mM DTNB y lectura de la formación de TNB a 412 nm) e informe de los resultados en el archivo Excel proporcionado.

### 3.3.3.2. Reactivos

#### *Preparación de la solución tampón de fosfato potásico (0.1 M) a pH 7,4*

Pesar 13,41 g de fosfato dipotásico ( $K_2HPO_4$ , CAS [7758-11-4]) y 3.13 g de dihidrogenofosfato potásico ( $KH_2PO_4$ , CAS [7778-77-0]) y mezclarlos en un matraz aforado de 1000 ml con agua ultrapura MilliQ. Comprobar el pH con un pH-metro; la lectura debe ser igual a  $7.4 \pm 0.1$ .

#### *Preparación de la solución madre de DTT (8,3 mM)*

Pesar 38.6 mg de 1.4-Ditiotreitol (DTT, CAS [3483-12-3]) y añadir 30 ml de solución amortiguadora de fosfato de potasio (A2.1). Mantener la solución bajo un baño de hielo o en el frigorífico hasta su uso.

#### *Preparación de la solución hija de DTT (0.25 mM)*

Esta solución se obtiene a partir de 1.20 ml de la solución de DTT 8.3 mM (A2.2) y se enrasa a un volumen final de 40 ml con solución tampón de fosfato potásico (A2.1). Mantener la solución bajo un baño de hielo o en el frigorífico hasta su uso.

#### *Preparación de la solución madre de ácido dinitrotiobenzoico (DTNB) (10 mM)*

Pesar 118.8 mg de 5,5'-Ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB, CAS [69-78-3]) y añadir 30 ml de la solución amortiguadora de fosfato de potasio (A2.1). Mantener la solución en un baño de hielo o en el frigorífico hasta su utilización.

#### *Preparación de la solución hija DTNB (1 mM)*

Esta solución se obtiene diluyendo 4ml de la solución de DTNB 10mM (A2.4), enrasando hasta un volumen total de 40 ml con la solución tampón de fosfato potásico (A2.1). Conservar la solución bajo un baño de hielo o en el frigorífico hasta su uso.

### 3.3.3.3. Soluciones de suspensión de PM que deben analizarse - muestras

Ejemplo dado a continuación para el análisis de 4 muestras de PM extraídas a  $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}$  en condiciones fisiológicas (pH7.4,  $37.5^\circ\text{C}$ ) y sin filtrar.

### 3.3.3.4. Material

Una placa transparente de 96 cubetas es suficiente para procesar todas las muestras por triplicado. Se puede utilizar otra placa de 96 cubetas para la curva de calibración de DTT.

Las muestras deben estar en agitación durante el tiempo del experimento a  $37.4^\circ\text{C}$ .

Se necesita un baño de hielo para mantener el DTT y el DTNB fríos (al menos mantener la solución de reactivo fresca en el congelador hasta su uso).

### 3.3.3.5. Procedimiento para lectores de placas inyectados automáticamente

#### Exposición DTT y análisis DTNB

Ajustar la temperatura del lector de placas a 37.4°C durante todo el ensayo.

- Trazar una cuadrícula para placa de 96 cubetas y ubicar las muestras SP1 a SP4 como en la tabla siguiente, dejando las primeras 3x4 cubetas para el *Controlox* (oxidación de fondo inherente al DTT).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Controlox	Controlox	Controlox	SP1	SP1	SP1	SP2	SP2	SP2	SP3	SP3	SP3	T=0
B	Controlox	Controlox	Controlox	SP1	SP1	SP1	SP2	SP2	SP2	SP3	SP3	SP3	T=10
C	Controlox	Controlox	Controlox	SP1	SP1	SP1	SP2	SP2	SP2	SP3	SP3	SP3	T=20
D	Controlox	Controlox	Controlox	SP1	SP1	SP1	SP2	SP2	SP2	SP3	SP3	SP3	T=30
E	SP4	SP4	SP4										T=0
F	SP4	SP4	SP4										T=10
G	SP4	SP4	SP4										T=20
H	SP4	SP4	SP4										T=30

- Colocar 20 µl de muestras SP1 a SP4 en cada cubeta y 20 µl de agua ultrapura en las cubetas *Controlox*
- Añadir 220 µl de la solución tampón de fosfato potásico (A2.1) en las cubetas de muestras SP1 a SP4 y en las cubetas *Controlox*.
- Preparar el lector de placas a 37.4°C.
- Colocar la placa en el lector e incubar durante 10 minutos.
- Agitar la placa con el equipo durante un minuto.
- Leer la absorbancia intrínseca de las muestras/control a 412 nm.
- A T= 0 min, programar el inyector A para dispensar 50µL de DTT 0.25 mM (A2.2) en TODAS las cubetas. Mantener la solución bajo un baño de hielo o en el frigorífico hasta su uso.
- A T=0 min, programar el inyector B para dispensar 50µL de DTNB 1 mM (A2.5) en las cubetas T=0 (líneas A y E). Mantener la solución bajo un baño de hielo o en el frigorífico hasta su uso.
- Agitar la placa junto al lector durante 30 segundos cada minuto durante 10 minutos.
- A los T=10 minutos, verter 50 µl de DTNB 1 mM (A2.5) en las cubetas T=10 (líneas B y F) para detener la reacción de consumo de DTT por las muestras.

- Agitar la placa con el dispositivo durante 30 segundos cada minuto durante 10 minutos.
- A los T=20 minutos, verter 50  $\mu$ l de DTNB 1 mM (A2.5) en las cubetas T=20 (líneas C y G).
- Agitar la placa con el dispositivo durante 30 segundos cada minuto durante 10 minutos.
- A los T=30 minutos, verter 50  $\mu$ l de DTNB 1 mM (A2.5) en las cubetas T=30 (líneas D y H).
- Agitar la placa durante 60 segundos, esperar 10 segundos y leer la absorbancia final a 412 nm. El compuesto amarillo (TNB) formado es estable durante dos horas; sólo es necesaria una medición de absorbancia final.
- Calcular la cinética de la oxidación del DTT como:
  - o nmol DTT/min se obtiene restando tanto la absorción intrínseca de cada muestra (para eliminar un posible efecto matriz entre muestras, el valor obtenido en el paso 7) como la tasa de autooxidación de DTT inherente (pendiente de la muestra *Controlox*) de la tasa de consumo de DTT en presencia de partículas (SP1-4).
  - o nmol DTT/min/ $\mu$ g se obtiene restando la absorción intrínseca de cada muestra y la tasa de autooxidación inherente del DTT de la tasa de consumo de DTT en presencia de PM y dividiéndola por la masa de PM en la reacción.
  - o El % de DTT consumido/ $\mu$ g/min se obtiene por el % de DTT perdido durante la reacción con las muestras en relación con la autooxidación inherente del DTT y normalizado por el tiempo de reacción y por  $\mu$ g de PM.
  - o Todas estas fórmulas están pre-incluidas en la hoja de cálculo Excel proporcionada.
  - o Usarlo para añadir los resultados utilizando el número de referencia de laboratorio, el protocolo analítico y el equipo usado y el número de referencia de cada muestra.

### 3.3.3.6. Procedimiento para lectores de placas sin inyectores

#### Exposición DTT y análisis DTNB:

Ajustar la temperatura del lector de placas a 37.4°C durante todo el ensayo.

- Dibujar una cuadrícula para placa de 96 cubetas y ubicar las muestras SP1 a SP4 como en la tabla anterior, dejando las primeras 3x4 cubetas para la muestra de control (oxidación de fondo inherente al DTT).
- Colocar 20  $\mu$ l de las muestras SP1 a SP4 en cada cubeta y 20  $\mu$ l de agua ultrapura en las cubetas *Controlox*.

- Añadir 220  $\mu\text{l}$  de la solución tampón de fosfato potásico (A2.1) en las cubetas de muestras SP1 a SP5 y en las cubetas de muestras de control.
- Introducir la placa en el lector y leer la absorbancia intrínseca de las soluciones a 412 nm.
- Inyectar 50  $\mu\text{L}$  de DTNB 1mM (A2.5) en las cubetas T=0 min (líneas A y E) (esto se hace para evitar el agotamiento del DTT con las muestras en t=0 con inyección manual, que es más lenta que las inyectoras). Mantener la solución de DTNB bajo un baño de hielo o en el frigorífico hasta su uso.
- Dispensar 50  $\mu\text{l}$  de DTT 0.25 mM (A2.2) en TODAS las cubetas. Mantener la solución de DTT bajo un baño de hielo o en el frigorífico hasta su uso.
- Preparar el lector de placas a 37.4  $^{\circ}\text{C}$ .
- Introducir la placa en el lector de placas e incubar durante 10 minutos.
- Agitar la placa junto al con el equipo durante 30 segundos cada minuto durante 10 minutos.
- A los T=10 minutos, retirar la placa del equipo e inyectar 50  $\mu\text{l}$  de DTNB 1mM (A2.5) en las cubetas T=10 (líneas B y F) para detener la reacción de consumo de DTT por las muestras.
- Volver a colocar la placa en el lector y agitar durante 30 segundos cada minuto durante 10 minutos.
- A los T=20 minutos, retirar la placa del lector e inyectar 50  $\mu\text{L}$  de DTNB 1mM (A2.5) en las cubetas T=20 (líneas C y G).
- Volver a colocar la placa en el lector y agitar durante 30 segundos cada minuto durante 10 minutos.
- A los T=30 minutos, retirar la placa del lector y dispensar 50  $\mu\text{L}$  de DTNB 1 mM (A2.5) en las cubetas T=30 (líneas D y H).
- Volver a colocar la placa en el lector y agitar durante 60 segundos, esperar 10 segundos y leer la absorbancia final a 412 nm. El compuesto amarillo (TNB) formado es estable durante dos horas; solo se necesita una medición final de la absorbancia.
- Calcular la cinética de la oxidación del DTT como:
  - o La nmol DTT/min se obtiene restando tanto la absorción intrínseca de cada muestra (para eliminar un posible efecto de matriz, valor obtenido en el paso 4) como la tasa de autooxidación de DTT inherente del blanco (pendiente de la muestra *Controlox*) de la tasa de consumo de DTT en presencia de partículas (SP1-4).

- o El nmol DTT/min/ $\mu\text{g}$  se obtiene restando tanto la absorción intrínseca de cada muestra como la tasa de autooxidación inherente de DTT de la tasa de consumo de DTT en presencia de partículas y dividiéndola por la masa de PM en la reacción.
- o El % de DTT consumido/ $\mu\text{g}/\text{min}$  se obtiene por el % de DTT perdido durante la reacción con muestras en relación con la autooxidación inherente de DTT y normalizado por el tiempo de reacción y por  $\mu\text{g}$  de PM.
- o Todas estas fórmulas están incluidas previamente en la hoja de cálculo de Excel proporcionada.
- o Usarlo para agregar los resultados utilizando el número de referencia de laboratorio, el protocolo analítico y el equipo usado y el número de referencia de cada muestra.

### 3.4. Resultados de la primera comparación inter-laboratorio del potencial oxidativo

El ILC RI-URBANS se propuso para evaluar las discrepancias y puntos en común de las mediciones del OP de PM obtenidas por los diferentes laboratorios participantes. Se decidió priorizar el ensayo OP<sup>DTT</sup> para este primer intento de inter-comparación internacional debido a su amplia adopción y longevidad en la comunidad de investigación. Esta elección busca facilitar la amplia participación de los laboratorios en el campo de la investigación. El ejercicio de ILC se realizó con tres muestras (muestras 1, 2 y 3), que incluían diferentes concentraciones de PM ambiental y un control positivo comercial (naftoquinona), todas extraídas en agua ultrapura preparada por el laboratorio de referencia.

Un total de 20 grupos de investigación participaron en el ejercicio: 14 de ellos de Europa, incluyendo Reino Unido, Italia, Francia, Suiza, Grecia, Alemania, Serbia, República Checa, Países Bajos y Suecia; 3 grupos de Estados Unidos, 2 grupos de Canadá y 1 de Australia. Se invitó a los participantes a contribuir al proyecto RI-URBANS mediante una convocatoria pública lanzada en la conferencia del IAC en Atenas (en septiembre de 2022) debido a su participación activa en la comunidad científica de OP o porque contactaron directamente con el laboratorio de referencia. El ejercicio requirió participación anónima; por lo tanto, el número asignado aleatoriamente a cada laboratorio/grupo se utilizará para presentar los resultados.

Se solicitó a los participantes que comunicaran los resultados de OP<sup>DTT</sup> según el RI-URBANS' SOP para cada muestra en tres réplicas, en unidades específicas (nmol DTT  $\text{min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ ) con tres

decimales. Además, se les invitó a informar, con el mismo formato, los valores de otras pruebas de OP, como  $OP^{DTT}$ ,  $OP^{AA}$ ,  $OP^{DCFH}$ ,  $OP^{OH}$ ,  $OP^{ESR}$ ,  $OP^{GSH}$  (aplicadas rutinariamente por cada grupo) en las mismas muestras.

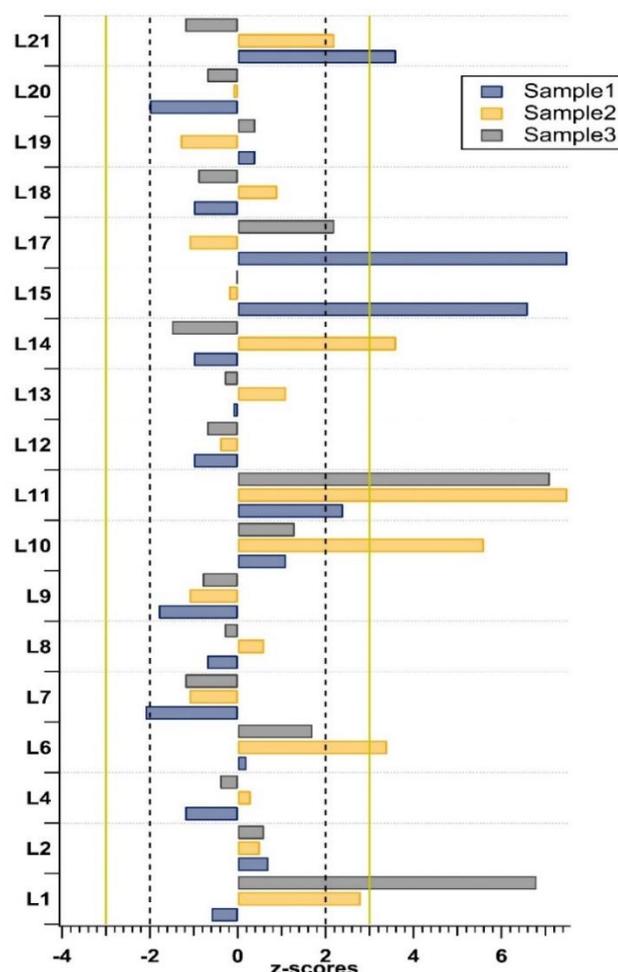
Cada participante (20 laboratorios en total) informó de sus resultados utilizando el RI-URBANS'  $OP^{DTT}$  SOP para las tres muestras diferentes (muestras 1 a 3) por triplicado. Los valores asignados a cada muestra se obtuvieron del promedio de los resultados obtenidos de un número específico de participantes, seleccionados (sin conocer sus resultados) por su experiencia pionera en el desarrollo de protocolos y mediciones de OP, así como por su sólida experiencia en el campo (más de 10 publicaciones en el campo).

La evaluación del rendimiento del laboratorio integró el sesgo en los resultados de los grupos de participantes en comparación con los valores asignados y su desviación estándar asociada para cada muestra. La muestra 1 presentó las mayores varianzas, con un rango de entre el 130 % y el -35 %, y solo 5 grupos mostraron diferencias dentro del  $\pm 10$  %. En la muestra 2, las diferencias se situaron en un rango más estrecho, del 43 % al -7 %, lo que favoreció principalmente las sobreestimaciones. Para esta muestra, 12 participantes obtuvieron resultados con un margen de error de  $\pm 10\%$  respecto al valor asignado. Finalmente, los resultados de la muestra 3 mostraron la menor variación entre los participantes, con diferencias que oscilaron entre el 30% y el -6%, y 16 participantes con un margen de error de  $\pm 10\%$  respecto al valor asignado, lo que nuevamente favorece la sobreestimación. Es interesante observar que, aparentemente, no existe un patrón sistemático que permita a un participante obtener resultados fuera de rango para todas las muestras. Los resultados son muy contrastados, y la mayoría de los participantes pudieron obtener buenos resultados para una o dos muestras asociadas con un valor atípico. Esto subraya la necesidad de realizar más investigaciones sobre las causas de las variaciones observadas, posiblemente en la próxima ILC.

Los resultados de la ILC fueron analizados estadísticamente por el Centro Común de Investigación Europeo (JRC, por sus siglas en inglés), que proporciona ciencia y conocimiento independientes y basados en evidencia para respaldar las políticas de la UE y la realización de la ILC en general.

El rendimiento individual de cada grupo se evaluó mediante puntuaciones  $z$ , una métrica que indica la desviación de cada punto de datos respecto al valor asignado. Para cada laboratorio y muestra de prueba, la puntuación  $z$  se calcula mediante la fórmula:  $z = (x_i - X) / \sigma^*$ , donde  $x_i$  es el resultado del participante  $i$ ,  $X$  es el valor asignado a la muestra, y  $\sigma^*$  es la desviación típica del valor asignado. Se

activa una «señal de acción» si la entrada de un participante produce un sesgo superior a  $z=+3$  o inferior a  $z=-3$ , lo que indica una desviación de más de 3 desviaciones estándar del valor asignado. Del mismo modo, se emite una «señal de advertencia» si el sesgo de laboratorio es superior a  $z=+2$  o inferior a  $z=-2$ , lo que representa una desviación de entre 2 y 3 desviaciones típicas. Un sesgo del laboratorio entre  $z=-2$  y  $z=+2$  significa un rendimiento satisfactorio en relación con la desviación típica para la evaluación de la aptitud. Los resultados se presentan en la Figura 1.



**Figura 1.** Puntuaciones z obtenidas para evaluar el rendimiento de cada participante en la comparación inter-laboratorios para cada muestra analizada tras el RI-URBANS OP<sup>DTT</sup> SOP (procedente de Dominutti et al., 2024).

Además de lo expuesto, todas las subestimaciones se situaron dentro del intervalo aceptable. Cabe destacar que ningún laboratorio presentó resultados insatisfactorios en las tres muestras; en prácticamente todos los participantes, si bien una muestra podía presentar malos resultados, las otras dos eran aceptables. De nuevo, esto exige explicaciones que no sean sesgos sistemáticos en los análisis. Aunque factores como la falta de homogeneidad de la muestra pueden estar en juego

(sobre todo en el caso de la muestra 1), otras cuestiones, como la variabilidad en el manejo del análisis, pueden haber influido. Por lo tanto, los participantes que presenten desviaciones significativas ( $|z\text{-scores}| > 2$ ) en algunos de sus resultados deberán examinar a fondo sus procedimientos y, posiblemente, aplicar las medidas correctoras adecuadas para evitar resultados similares en futuras comparaciones entre laboratorios. Sin embargo, en general, la mitad de los participantes obtuvieron resultados dentro de los límites aceptables de esta prueba. A pesar de las disparidades, estos resultados son realmente prometedores, sobre todo si se tiene en cuenta que se trata del primer ejercicio de este tipo realizado hasta la fecha (Dominutti et al., 2024). Estos resultados son similares a los obtenidos con algunas de las primeras ILC para los PAH (Grandesso et al., 2012; Verlhac et al., 2014), por ejemplo.

### 3.5. Gestión de datos

Actualmente, esto aún no es necesario, ya que el OP de PM no se compila todavía a nivel europeo. Los datos son recogidos por grupos de investigación individuales y están disponibles en varias publicaciones científicas. Se espera que, en los próximos años, la Agencia Europea de Medio Ambiente (EEA, por sus siglas en inglés), por ejemplo, haga posible la comunicación centralizada de los datos de OP de PM, y para ello produzca información de unidades y formato al respecto.

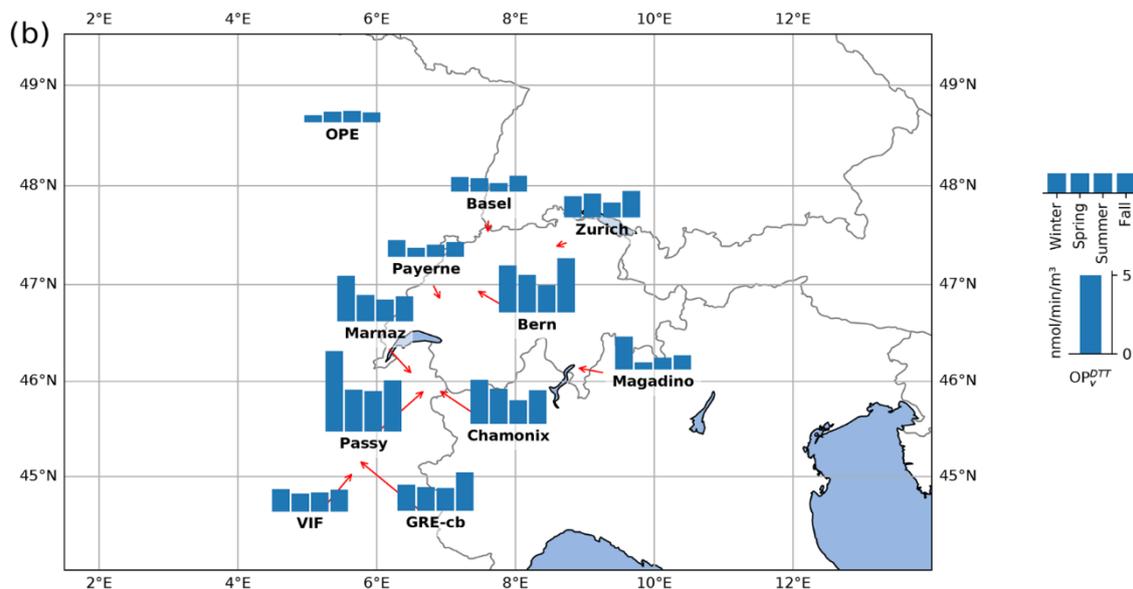
## 4. POTENCIAL OXIDATIVO DE PM EN EUROPA

### 4.1. Potencial Oxidativo de PM en la Europa urbana

En los últimos años, se ha producido un aumento de los estudios que examinan el OP de PM en toda Europa. Se sospecha que las especies reactivas de oxígeno asociadas al PM inducen estrés oxidativo *in vivo*, lo que puede provocar efectos adversos para la salud (como problemas respiratorios y cardiovasculares). A pesar de las sugerencias de que el OP juega un papel importante en los impactos agudos del PM en la salud, los efectos específicos siguen sin estar claros. Las investigaciones sobre los componentes del PM que presentan actividad oxidativa han arrojado resultados contradictorios, por lo que aún queda mucho por saber sobre las fuentes de PM que pueden influir en su OP relativo. En consecuencia, existe un interés creciente por explorar los riesgos

para la salud asociados a la exposición al PM a través de la medición del OP del PM, especialmente en el contexto europeo. En este informe, profundizamos en los principales hallazgos recogidos de estudios realizados en Europa.

Un estudio realizado en España (In 't Veld et al., 2023) incluyó la evaluación de muestras de PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub>, y PM<sub>1</sub> recogidas aproximadamente cada cuatro días en una estación de fondo urbano y en otra de fondo rural. Este es uno de los pocos estudios en Europa que evalúa el OP de PM en tres tamaños diferentes de PM a lo largo de un año, y también compara dos tipologías de emplazamientos diferentes. La evaluación de la composición química del PM permitió obtener la contribución de fuentes a PM mediante modelo receptor (PMF). En paralelo, se determinaron los OP<sup>DTT</sup> y OP<sup>AA</sup> de cada muestra de PM. Finalmente, para relacionar las fuentes con el OP de PM medido, se aplicaron modelos de regresión lineal múltiple a ambos conjuntos de datos. Los resultados mostraron que, en Barcelona, el OP de PM<sub>10</sub> era notablemente superior al de PM<sub>2.5</sub> y PM<sub>1</sub>. Por el contrario, en la zona rural, los niveles de OP de todos los tamaños de PM estaban dentro de un rango similar, pero eran notablemente inferiores a los observados en la zona urbana. En la zona urbana, varias fuentes antropogénicas resultaron ser los principales factores de influencia del OP en PM<sub>10</sub> (incluida la combustión, el polvo de rodadura, la combustión de fueloil y el aerosol orgánico secundario) y PM<sub>2.5</sub> (polvo de rodadura y PM de combustión). Por el contrario, en la zona rural no se observaron factores distintos que influyeran en el OP de la evolución del PM, lo que probablemente explica la ausencia de una diferencia notable en el OP entre PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub>, y PM<sub>1</sub>. Este estudio subraya la importancia de las fracciones de tamaño en la determinación del OP en función del contexto ambiental. En entornos urbanos, el OP de PM está influido tanto por las fracciones de tamaño PM<sub>10</sub> como PM<sub>1</sub>, mientras que en entornos rurales, el tamaño de partícula afecta mucho menos (in 't Veld et al., 2023).



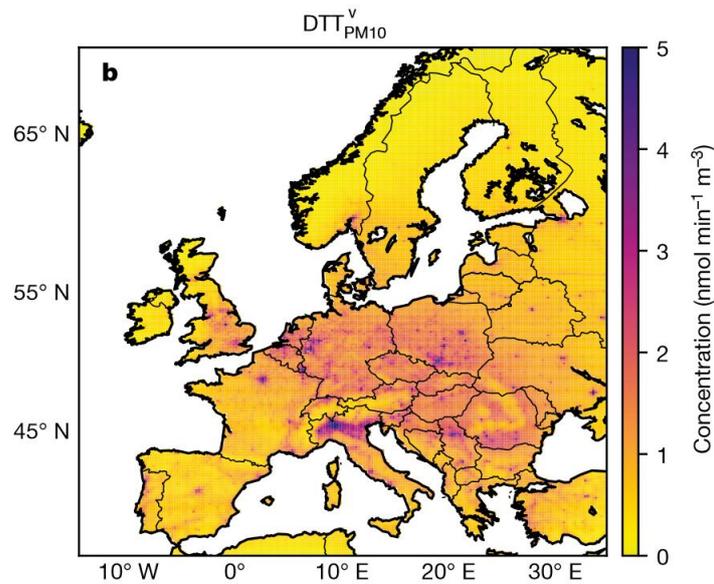
**Figure 2.** Medidas volumétricas (medias estacionales) de  $OP^{DTT}$  para cinco emplazamientos suizos, y seis franceses incluidos en este análisis. Los datos de los puntos de muestreo proceden de Weber et al. (2021) y Grange et al. (2022).

Del mismo modo, una campaña intensiva de muestreo de PM y OP de PM realizada en los emplazamientos suizos entre 2018 y 2019 demostró que el OPv era variable en el tiempo y el espacio, como se observa en la Figura 2 (Grange et al., 2022). Los patrones de OPv reflejaban la distribución típica de los contaminantes atmosféricos, con zonas urbanas que mostraban mayores niveles de contaminación en comparación con las regiones rurales, especialmente durante el invierno. A pesar de las notables diferencias en la masa de PM entre las zonas rurales y urbanas, las métricas de OP mostraron sistemáticamente una variación aún mayor, lo que indica un mayor nivel de heterogeneidad en el OP de PM en comparación con la masa de PM en los emplazamientos muestreados en Suiza. Los resultados mostraron variaciones estacionales más pronunciadas para los ensayos de  $OP^{AA}$  y  $OP^{DTT}$  en comparación con el tercer ensayo de  $OP^{DCFH}$ , lo que hace que los primeros enfoques sean más útiles para el análisis de datos. Las fuentes de  $PM_{10}$  y  $PM_{2.5}$  identificadas por los modelos PMF pusieron de relieve dos importantes fuentes de emisiones antropogénicas, como son el tráfico rodado y la combustión de madera, como importantes impulsores del OP en el país. Por el contrario, las fuentes secundarias inorgánicas de nitrato y sulfato mostraron en general bajos niveles de «OP intrínseco» (OP normalizado por  $\mu g$  de partículas, OPm) en toda Suiza. Esto sugiere una posible discrepancia entre la concentración total de masa de PM y el OPm, lo que ha provocado un cambio en las prioridades de gestión de cara a abordar los impactos en la salud en lugar de centrarse únicamente en la masa total. Si bien la causalidad de las fuentes

identificadas en la determinación de OPv garantiza una mayor investigación sobre los mecanismos biológicos, los resultados concuerdan con la bibliografía existente y proporcionan una orientación clara sobre hacia dónde deben dirigirse los futuros esfuerzos de investigación. Además, las distintas características del OPv en las fracciones de tamaño  $PM_{10}$  y  $PM_{2.5}$  subrayaron la importancia de un seguimiento continuo, en particular de  $PM_{10}$  (Grange et al., 2022).

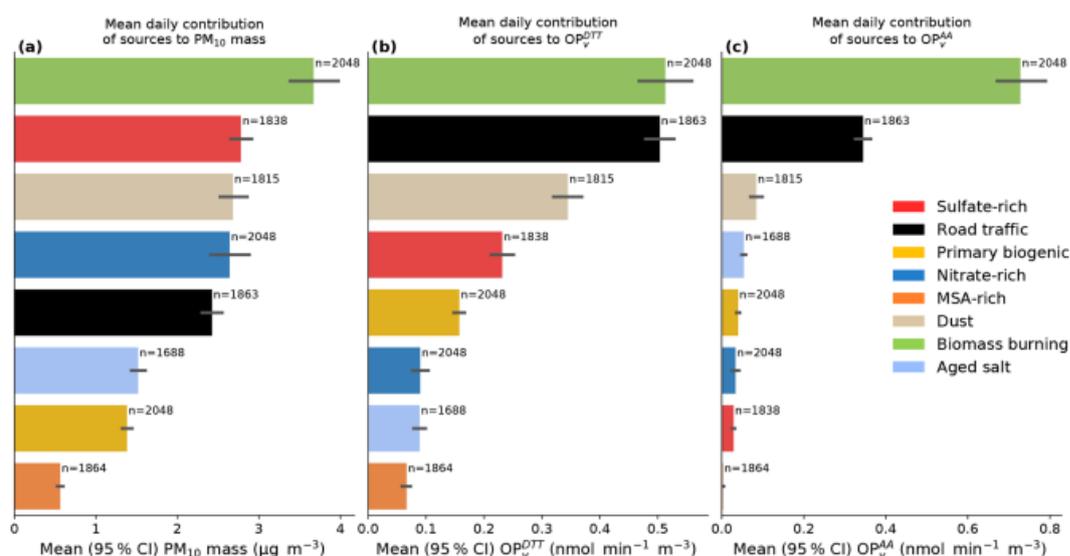
En los últimos años, algunos avances en los estudios de OP están relacionados con el uso de herramientas de modelización para comprender mejor la variabilidad espacial del OP de PM asociada a las fuentes de emisión de PM (Figura 3). En el estudio de Daellenbach (2020) se utilizaron observaciones de campo y modelización de la calidad del aire para evaluar los orígenes primarios y secundarios del PM y del OP de PM en toda Europa. Las principales conclusiones coincidieron con los resultados observados en Suiza (Grange et al., 2022), y mostraron que la concentración en masa de PM está influida predominantemente por componentes inorgánicos secundarios, materiales de la corteza terrestre y aerosoles orgánicos biogénicos secundarios. Mientras que para las fuentes antropogénicas los principales contribuyentes a las actividades de OP fueron los aerosoles orgánicos secundarios de tamaño fino de partícula procedentes de la combustión de biomasa residencial y los metales de tamaño grueso ( $PM_{2.5-10}$ ) procedentes de emisiones del desgaste de frenos y ruedas de los vehículos.

También se obtuvieron resultados similares en las mediciones de OP de PM realizadas mediante dos ensayos celulares distintos (DTT y AA) en muestras de  $PM_{10}$  recogidas en Francia entre 2013 y 2018 en 14 ubicaciones distintas (Figura 4). Así, en el ensayo  $OP^{DTT}$  se observó una actividad redox positiva distinta para el tráfico rodado primario, la quema de biomasa, el polvo, las fuentes ricas en ácido metanosulfónico (MSA) y las fuentes biogénicas primarias. Por otro lado, en el ensayo  $OP^{AA}$  mostraron una actividad significativa la quema de biomasa y las fuentes de tráfico rodado. De esta forma, la contribución media diaria de cada fuente al  $OP^{DTT}$  total puso de relieve la influencia del tráfico rodado como fuente primaria predominante, mientras que tanto la quema de biomasa como las fuentes de tráfico rodado contribuyeron por igual al  $OP^{AA}$  observado (Weber et al., 2021). También se observó que el OPv era comparable entre los conjuntos de datos franceses y los suizos mediante los mismos procedimientos de muestreo y laboratorio.



**Figure 3.** Niveles de  $OP^{DTT^v}$  de  $PM_{10}$  en Europa.  $OP^v$  en Europa para el año 2011 (procedente de Daellenbach et al., 2020).

En consecuencia, la quema de biomasa residencial y el tráfico rodado destacan como los principales objetivos a priorizar para reducir significativamente los niveles de OP de PM en Europa Occidental. Además, las estrategias centradas únicamente en la reducción de las concentraciones máxicas de PM pueden no disminuir eficazmente los niveles de OP de PM, por lo que centrarse en fuentes específicas de PM en lugar de en la masa total de PM podría ser un enfoque de mitigación más eficaz, dada la relación entre el OP y sus efectos sobre la salud (Daellenbach et al., 2020; Weber et al., 2021).

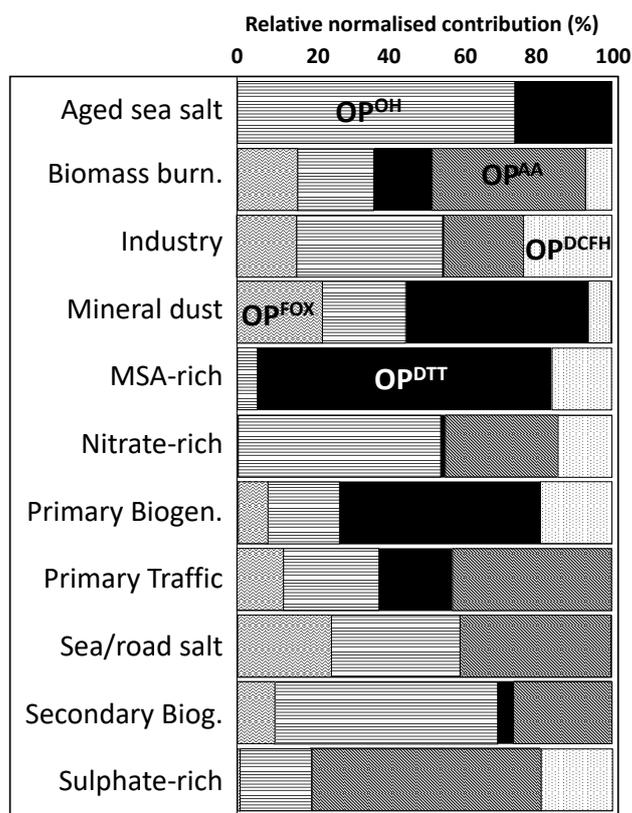


**Figure 4.** Contribución diaria media de las fuentes a (a) la masa de PM, (b) el  $OP^{DTT}_v$  y (c) el  $OP^{AA}_v$ . Las barras representan la media, y las barras de error representan el intervalo de confianza del 95 % de la media (Weber et al., 2021).

A pesar del desarrollo de diversos ensayos acelulares para evaluar el OP de PM, hay una falta de consenso respecto a las metodologías y protocolos empleados para su medición. Esta ausencia de estandarización también afecta a los procedimientos de cuantificación y calibración, lo que dificulta la comparación entre estudios. Tampoco hay un acuerdo claro sobre qué ensayos de OP deben utilizarse para obtener una evaluación integral del OP, especialmente considerando las fuentes predominantes de PM en distintos emplazamientos.

Dominutti et al. (2023) exploraron cinco ensayos distintos de OP acelular, su sensibilidad a la composición química de PM<sub>10</sub> atmosférico y sus fuentes de emisión observadas en una ciudad urbana alpina de Francia, así como la evaluación de ensayos bien establecidos como AA, DTT y DCFH, junto con ensayos novedosos como el Naranja Férrico-Xilenol (FOX) y la cuantificación directa de ROS a través del radical OH. Los principales resultados obtenidos subrayaron una influencia significativa de la estacionalidad en las contribuciones de las fuentes y las actividades de los OP. Así, en invierno, cuando dominan las emisiones antropogénicas, todos los ensayos de OP mostraron una gran concordancia; mientras que, en los meses más cálidos, con una influencia antropogénica reducida, los aerosoles biogénicos y secundarios relacionados con la materia orgánica tuvieron un mayor impacto. Además, observaron distintas sensibilidades de cada ensayo de OP a las fuentes de

PM<sub>10</sub>, lo que probablemente refleja diferencias en la composición química y los procesos (Dominutti et al., 2023, Figura 5).



**Figure 5.** Influencia de cada fuente de PM en la sensibilidad de los ensayos de OP. Contribución relativa normalizada de los ensayos de OP a las fuentes de PM<sub>10</sub>. Los colores representan cada ensayo de OP evaluado (procedente de Dominutti et al., 2023).

Los resultados también destacan la necesidad de emplear múltiples ensayos de OP para captar las diversas sensibilidades a las especies redox-activas, proporcionando una visión más profunda de la capacidad intrínseca de las fuentes de PM para inducir reacciones de OP. Dada la heterogeneidad de fuentes identificadas por diferentes ensayos de OP para una determinada exposición a PM ambiental, la selección de uno o varios métodos de OP de PM debe considerarse cuidadosamente como parte de la estrategia de evaluación, dado que pueden proporcionar información valiosa sobre las fuentes, y permitir una mejor orientación de políticas de reducción específicas (Dominutti et al., 2023).

## 4.2. Niveles de OP en emplazamientos urbanos de Europa

### 4.2.1. Francia

En Grenoble (Francia), el  $OP^{AA}$  de  $PM_{10}$  llegó a  $2.38 \pm 1.66$  y  $0.72 \pm 0.39$   $nmol\ min^{-1}\ m^{-3}$  en invierno y verano, respectivamente (Dominutti et al., 2023). En 14 estaciones urbanas y de tráfico francesas Weber (2021) y Weber et al. (2021) encontraron valores de  $OP^{AA}$  de  $PM_{10}$  de  $2.3 \pm 2.2$   $nmol\ min^{-1}\ m^{-3}$  en fondo urbano con alta contribución de la quema de biomasa, y  $1.7 \pm 1.1$   $nmol\ min^{-1}\ m^{-3}$  en otras estaciones de fondo urbano. En dos estaciones de tráfico, el  $OP^{AA}$  de  $PM_{10}$  alcanzó los valores de 2.1 y 1.3  $nmol\ min^{-1}\ m^{-3}$ .

Asimismo, en Grenoble (Francia), el  $OP^{DTT}$  de  $PM_{10}$  alcanzó  $1.92 \pm 1.31$  y  $1.46 \pm 0.71$   $nmol\ min^{-1}\ m^{-3}$  en invierno y verano, respectivamente (Dominutti et al., 2023). En 14 estaciones urbanas y de tráfico francesas Weber (2021) y Weber et al. (2021) hallaron valores de  $OP^{DTT}$  de  $PM_{10}$  de 2.7–1.5  $nmol\ min^{-1}\ m^{-3}$  para todas las estaciones de fondo urbano, con la excepción de un valle urbano de alta combustión de biomasa, con 4.4  $nmol\ min^{-1}\ m^{-3}$  y 2.6 y 2.4  $nmol\ min^{-1}\ m^{-3}$  para las dos estaciones de tráfico.

Dominutti et al. (2023) también encontraron una buena concordancia con las fuentes antropogénicas que rigen la principal exposición de OP de PM (principalmente la quema de biomasa y el tráfico primario) para los cinco ensayos de OP evaluados durante el invierno. Sin embargo, esta tendencia cambia durante los meses cálidos, con una reducción de la cuota de OP de las emisiones antropogénicas directas y un mayor impacto de los aerosoles biogénicos y secundarios relacionados con la materia orgánica (antropogénicos y biogénicos). Utilizando PMF dedujeron que el  $OP^{AA}$  y el  $OP^{DTT}$  eran impulsados principalmente en la estación fría por las siguientes fuentes ( $nmol\ min^{-1}\ m^{-3}$ ) en el orden de mayor a menor:

$OP^{AA}$ : quema de biomasa (BB) > PM primario de tráfico >> PM rico en sulfatos = Industrial > nitrato,  
 $OP^{DTT}$ : BB >> PM primario de tráfico >> polvo mineral > biogénico primario > rico en ácido metano sulfónico;

mientras que en la estación cálida estas fuentes eran de mayor a menor las siguientes:

$OP^{AA}$ : PM primario de tráfico >> aerosoles biogénicos secundarios = PM rico en sulfatos > BB = Industrial,

OP<sup>DTT</sup>: rico en ácido metano sulfónico >> polvo mineral > biogénico primario > tráfico primario  
>>BB = biogénico secundario.

Weber et al. (2021) evaluaron las contribuciones de las fuentes del OP<sup>AA</sup> y del OP<sup>DTT</sup> de PM<sub>10</sub> para 15 ciudades francesas utilizando PMF y encontraron que normalizado por µg de contribución de masa de las diferentes fuentes se encontró el siguiente orden de OP (nmol min<sup>-1</sup> µg<sup>-1</sup>):

OP<sup>AA</sup>: BB > tráfico rodado >>> sal marina envejecida = biogénica primaria > polvo mineral = rico en sulfatos,

OP<sup>DTT</sup>: tráfico rodado >> biogénico primario = BB = metano rico en ácido sulfónico = polvo mineral > rico en sulfatos >> sal marina envejecida = nitrato;

Al considerar la contribución de cada fuente a los niveles medios diarios de PM<sub>10</sub> (al contrario que en el caso anterior), se constató la siguiente contribución (nmol min<sup>-1</sup> m<sup>-3</sup>):

OP<sup>AA</sup>: BB >> tráfico rodado >>> polvo mineral >> sal marina envejecida = biogénico primario = rico en nitratos = rico en sulfatos,

OP<sup>DTT</sup>: BB = tráfico rodado >> polvo mineral > rico en sulfatos > biogénico primario > sal marina envejecida = nitrato > rico en ácido metanosulfónico.

Así pues, la quema de biomasa, seguida del tráfico rodado y del polvo mineral, resultaron ser las principales fuentes de OP<sup>AA</sup> y OP<sup>DTT</sup>.

#### 4.2.2. Grecia

Paraskevopoulou et al. (2019) informaron del OP<sup>DTT</sup> de PM<sub>2.5</sub> y PM<sub>10</sub> (PM<sub>2.5</sub>+PM<sub>2.5-10</sub>) de 0.33 y 0.43 nmol min<sup>-1</sup> m<sup>-3</sup>, respectivamente, para una estación de fondo urbano en Atenas. Encontraron que el OP<sup>DTT</sup> estaba influido por:

$$PM_{2.5} OP^{DTT} = 0.13 + 0.028 * BBOA + 0.071 * LV-OOA + 0.017 * HOA (R^2=0.65)$$

donde, BBOA es la concentración de aerosol orgánico de combustión de biomasa, LV-OOA es la concentración de aerosol orgánico secundario de baja volatilidad y HOA es la concentración de aerosoles orgánicos de combustión de combustibles fósiles (similares a los hidrocarburos), en µg m<sup>-3</sup>.

Argyropoulos et al. (2016) encontraron para Tesalónica valores de OP<sup>DTT</sup> de 1.16 y 1.09 nmol min<sup>-1</sup> m<sup>-3</sup> durante el invierno y el verano en estaciones de tráfico, y de 3.10 y 0.84 nmol min<sup>-1</sup> m<sup>-3</sup> en

estaciones de fondo urbano durante el invierno y el verano. Descubrieron que la quema de biomasa era el principal factor que contribuía a los elevados valores de  $OP^{DTT}$  registrados en estaciones de fondo urbano en invierno. En estaciones de tráfico, el PM relacionado con el tráfico era el factor principal.

### 4.2.3. Hungría

Vörösmarty et al. (2023) notificaron valores de  $OP^{AA}$  de  $PM_{2.5}$  de  $2.4-2.1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ m}^{-3}$  para estaciones urbanas y suburbanas de Budapest, con los niveles más altos en estaciones suburbanas. Para el  $OP^{DTT}$  los valores alcanzaron  $2.9-1.9 \text{ nmol min}^{-1} \text{ m}^{-3}$ , con los valores más altos obtenidos en estaciones urbanas. Descubrieron que el  $OP^{AA}$  y el  $OP^{DTT}$  estaban determinados por:

#### Urbano

$$PM_{2.5} OP^{AA} = 1.07 * BB + 0.36 * \text{tráfico rodado} + 0.14 * \text{industrial} + 0.03 * \text{polvo} + 0.02 * \text{desgaste del vehículo} - 0.08 \quad (R^2=0.86)$$

$$PM_{2.5} OP^{DTT} = 0.79 * BB + 0.89 * \text{tráfico rodado} + 0.49 * \text{combustión de petróleo} + 0.09 * \text{polvo} + 0.09 * \text{desgaste del vehículo} - 0.36 \quad (R^2=0.81)$$

#### Suburbano

$$PM_{2.5} OP^{AA} = 0.79 * BB + 0.57 * \text{polvo} + 0.52 * \text{combustión de petróleo} + 0.17 * \text{industrial} + - 0.47 \quad (R^2=0.72)$$

$$PM_{2.5} OP^{DTT} = 0.97 * \text{combustión de petróleo} + 0.62 * BB + 0.18 * \text{tráfico rodado} + 0.09 * \text{industrial} + 0.02 * \text{polvo} - 0.50 \quad (R^2=0.78)$$

### 4.2.4. Italia

Pietrogrande et al. (2019) revisaron los estudios de OP de  $PM_{10}$  y  $PM_{2.5}$  realizados en estaciones urbanas e industriales de varias ciudades italianas. En ellos (y en sus referencias) se informaron de que el  $OP^{AA}$  de  $PM_{10}$  alcanzaba 1.4 y 0.7 para estaciones industriales y urbanas de Trentino, respectivamente, y  $0.2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ m}^{-3}$  para estaciones urbanas de Lecce. Para  $OP^{DTT}$ , los valores alcanzaron 0.6 para estaciones industriales de Trentino, 0.6 para estaciones urbanas de Trentino y  $0.2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ m}^{-3}$  para estaciones urbanas de Lecce. Para  $PM_{2.5}$ , el  $OP^{AA}$  alcanzó 0.6 y 0.1  $\text{nmol min}^{-1} \text{ m}^{-3}$  en Bolonia y Lecce, respectivamente. El  $OP^{DTT}$  alcanzó 0.8, 0.2 y  $0.2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ m}^{-3}$  en Bolonia, Lecce y Trentino, respectivamente.

Encontraron mayores niveles de OP de PM en invierno en comparación con el verano, especialmente cuando la quema de biomasa influyó en los niveles de PM. Además, el OP<sup>AA</sup> se vio influenciado por los metales industriales y del tráfico rodado, mientras que el OP<sup>DTT</sup> se vio más afectado por los componentes carbonosos del PM.

Visentin et al. (2016) descubrieron que, aunque ambos ensayos responden a las mismas especies redox-activas, es decir, quinonas y metales de transición, no se encontraron correlaciones entre las respuestas de OP<sup>DTT</sup> y OP<sup>AA</sup> a diferentes compuestos estándar, así como a muestras ambientales, lo que pone de relieve que la sensibilidad de cada ensayo es diferente. El OP<sup>DTT</sup> en PM<sub>2.5</sub> se vio afectado por los metales (Cu, Zn, Cr, Fe, Ni, Mn), mientras que el OP<sup>AA</sup> sólo mostró una correlación moderada con el Cu y el Mn.

#### 4.2.5. España

In 't Veld et al. (2023) informaron para la ciudad de Barcelona de un OP<sup>AA</sup> de PM<sub>10</sub> de 1.9 para estaciones de fondo urbano y 1.0 para estaciones de fondo regional, y de un OP<sup>AA</sup> de PM<sub>2.5</sub> de 0.4 para estaciones de fondo urbano y 0.3 nmol min<sup>-1</sup>m<sup>-3</sup>, para estaciones de fondo regional. En el caso del OP<sup>DTT</sup> de PM<sub>10</sub>, los valores alcanzaron 2.5 y 1.2, para estaciones de fondo urbano y regional, respectivamente; y el OP<sup>DTT</sup> de PM<sub>2.5</sub> fue de 0.5 y 0.4 nmol min<sup>-1</sup> m<sup>-3</sup>, para estaciones de fondo urbano y regional, respectivamente.

También descubrieron que las contribuciones de la combustión de biomasa al PM eran muy bajas, y que la industria (metales), la combustión de petróleo pesado (V y Ni) y el tráfico rodado contribuían más al OP<sup>DTT</sup> y el OP<sup>AA</sup> en PM<sub>10</sub>, mientras que el polvo de rodadura y la industria contribuían a PM<sub>2.5</sub> y la industria a PM<sub>1</sub>, aunque en todos los casos los orgánicos secundarios también tenían un impacto.

#### 4.2.6. Suiza

Grange et al. (2022) informaron de que el OP<sup>AA</sup> de PM<sub>10</sub> alcanzó 4.1–1.7 nmol min<sup>-1</sup> m<sup>-3</sup> y el OP<sup>AA</sup> de PM<sub>2.5</sub> fue de 1.6–1.7 nmol min<sup>-1</sup> m<sup>-3</sup> en cuatro estaciones urbanas y suburbanas de Suiza, con los niveles más altos en la estación de tráfico. Así pues, el OP<sup>AA</sup> tiende a ser mayor en la fracción más gruesa, donde destacan los metales procedentes de emisiones del desgaste de frenos y ruedas de los vehículos. Para el OP<sup>DTT</sup>, los valores de PM<sub>10</sub> alcanzaron 3.0–0.8 y los valores de PM<sub>2.5</sub> alcanzaron 1.0–0.6 nmol min<sup>-1</sup> m<sup>-3</sup>, mientras que para OP<sup>DCFH</sup> los valores fueron 0.4–0.7 nmol min<sup>-1</sup> m<sup>-3</sup> tanto para PM<sub>10</sub> como para PM<sub>2.5</sub>.

El mismo estudio, utilizando modelos de regresión multilínea (MLR, por sus siglas en inglés), halló que la combinación de trazadores de la combustión de biomasa (levoglucosano, galactosano, manosano, K, OC, EC, dependiendo del emplazamiento) y los procedentes de emisiones del desgaste de frenos y ruedas de los vehículos (Fe, Cu, Sb, Mn) explicaban la mayor parte del OP<sup>AA</sup> y el OP<sup>DTT</sup> tanto en PM<sub>10</sub> como en PM<sub>2.5</sub>, con R<sup>2</sup>=0.79- 0.97.

Como ejemplos de estos resultados de MLR se enumeran algunas ecuaciones:

**Berna-Estaciones de tráfico:** PM<sub>10</sub> OP<sup>AA</sup>=109\*galactosano + 319\*Mn (R<sup>2</sup>=89)

$$PM_{2.5} OP^{AA}=18*manosano + 107*Cu (R^2=90)$$

Esto indica que, en el caso del OP<sup>AA</sup>, un mayor peso se debe a las del desgaste de frenos y ruedas de los vehículos (Cu, Mn) que a la combustión de biomasa (galactosano y manosano).

$$PM_{10} OP^{DTT}= 2*EC + 0.85*NH_4^+ (R^2=80)$$

$$PM_{2.5} OP^{DTT}= 31*galactosano + 475*Ti + 0.3*NH_4^+ (R^2=88)$$

Esto, por otra parte, indica que para OP<sup>DTT</sup> el mayor peso se debe a las emisiones del desgaste de frenos y ruedas de los vehículos y al polvo de rodadura (Ti) que a la quema de biomasa (galactosano).

**Basilea-Estación de fondo urbano** PM<sub>10</sub> OP<sup>AA</sup>=96\*galactosano + 130\*Cu (R<sup>2</sup>=96)

$$PM_{2.5} OP^{AA}=2.5*levoglucosano + 614*Sb (R^2=88)$$

Esto indica que para el OP<sup>AA</sup> un mayor peso se debe a las emisiones del desgaste de frenos y ruedas de los vehículos (Cu, Sb) que a la quema de biomasa (galactosano y levoglucosano) en la estación de fondo urbano.

$$PM_{10} OP^{DTT}= 1.5*Fe + 0.44*NH_4^+ (R^2=90)$$

$$PM_{2.5} OP^{DTT}= 31*galactosano + 129*Cu + 0.1*NH_4^+ (R^2=89)$$

De nuevo, esto indica de forma similar que en el OP<sup>DTT</sup> el mayor peso se debe a emisiones del desgaste de frenos y ruedas de los vehículos (Fe, Cu) que a la quema de biomasa (galactosano).

#### 4.2.7. Países Bajos

Janssen et al. (2014) informaron que en los Países Bajos el OP<sup>DTT</sup> de PM<sub>10</sub> alcanzaba 3.7 y 2.6 para dos estaciones de tráfico y 1.7 nmol min<sup>-1</sup> m<sup>-3</sup> para una estación de fondo urbano. En el caso de

PM<sub>2.5</sub>, los valores alcanzaron 3.3, 1.7 6 para dos estaciones de tráfico y 1.4 nmol min<sup>-1</sup> m<sup>-3</sup> para una estación de fondo urbano.

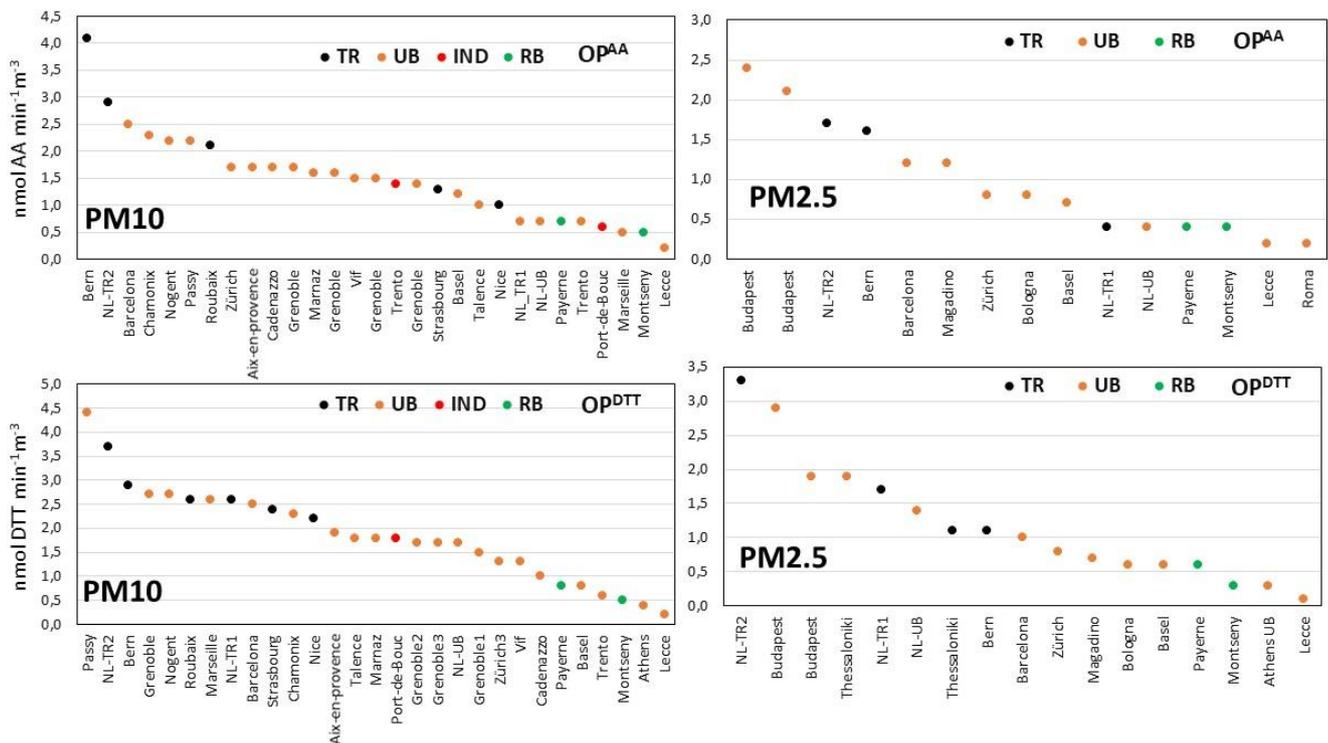
El OP<sup>ESR</sup> y el OP<sup>AA</sup> se debieron a los componentes del PM relacionados con el tráfico (es decir, EC, Fe, Cu, PAHs), mientras que el OP<sup>DTT</sup> se debió a las masas de PM y al OC.

#### 4.2.8. Síntesis

La Figura 6 resume los valores de OP<sup>AA</sup> y OP<sup>DTT</sup> en volumen (nmol min<sup>-1</sup> m<sup>-3</sup>) de los estudios notificados para cada país (Janssen et al., 2014; Argyropoulos et al., 2016; Visentin et al., 2016; Paraskevopoulou et al., 2019; Pietrogrande et al., 2019, and references therein; Weber, 2021; Weber et al., 2021; Grange et al., 2022; Dominutti et al., 2023; In 't Veld et al., 2023; Vörösmarty et al., 2023).

La siguiente comparación de los valores de OP en toda la Europa urbana debe tratarse con cautela, ya que no todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el mismo protocolo. No obstante, proporcionan una indicación de los niveles observados en Europa y está pendiente de publicar otro informe basado en mediciones armonizadas para precisar los niveles de OP de PM en Europa (Tassel et al., enviado a *Nature* el 24/10/2024).

Las concentraciones volumétricas de OP<sup>DTT</sup> alcanzaron en PM<sub>10</sub> alrededor de 4.5 a 0.2 nmol min<sup>-1</sup> m<sup>-3</sup> en la Europa urbana. Los valores más elevados (>1.5 nmol min<sup>-1</sup> m<sup>-3</sup>) se obtuvieron en estaciones de tráfico y fondo urbano con elevadas contribuciones de PM procedente de la combustión de biomasa (por ejemplo, Passy, Chamonix) o del tráfico-industria (por ejemplo, Barcelona, Marsella). Las estaciones que recibieron PM influenciado por un elevado tráfico y la combustión de biomasa registraron valores de OP<sup>DTT</sup> en torno a 2.5 nmol min<sup>-1</sup> m<sup>-3</sup>, mientras que la mayoría de las demás estaciones alcanzaron alrededor de 1.7 nmol min<sup>-1</sup> m<sup>-3</sup>. Varias estaciones de fondo urbano alcanzaron valores inferiores, de 1.5 a 0.2 nmol min<sup>-1</sup> m<sup>-3</sup>. En el caso de PM<sub>2.5</sub>, los valores oscilaron entre 3.3 y 0.2 nmol min<sup>-1</sup> m<sup>-3</sup>, con los valores más altos en una estación de tráfico y otra de fondo urbano de Budapest; sin embargo, la mayoría de las estaciones de tráfico y de fondo urbano se situaron entre 2.0 y 0.5 nmol min<sup>-1</sup> m<sup>-3</sup>.



**Figure 6.** Valores medios ( $\text{nmol min}^{-1} \text{m}^{-3}$ ) de  $\text{OP}^{\text{AA}}$  y  $\text{OP}^{\text{DTT}}$  en volumen de PM en estaciones (en su mayoría) urbanas, comunicados por Janssen et al. (2014), Argyropoulos et al. (2016), Visentin et al. (2016), Paraskevopoulou et al. (2019), Pietrogrande et al. (2019, and references therein), Weber (2021), Weber et al. (2021), Grange et al. (2022), Dominutti et al. (2023), In 't Veld et al. (2023) and Vörösmarty et al. (2023).

En cuanto al  $\text{OP}^{\text{AA}}$  de  $\text{PM}_{10}$  se observaron tendencias muy similares a las registradas para  $\text{OP}^{\text{DTT}}$ , con los valores más altos obtenidos en dos estaciones de tráfico (4.1-2.9  $\text{nmol min}^{-1} \text{m}^{-3}$ ). La mayoría de las estaciones de fondo urbano y de tráfico alcanzaron valores de 2.5 a 1.0  $\text{nmol min}^{-1} \text{m}^{-3}$ , y los valores más altos se registraron en las estaciones de fondo urbano de las ciudades con contribuciones principalmente elevadas de tráfico y/o quema de biomasa. En  $\text{PM}_{2.5}$ , los valores disminuyeron mucho en comparación con  $\text{PM}_{10}$ , especialmente para las estaciones de tráfico, probablemente porque el  $\text{OP}^{\text{AA}}$  está muy influido por los metales procedentes de las emisiones de PM del desgaste de frenos y ruedas de los vehículos, que se reducen notablemente en  $\text{PM}_{2.5}$  en comparación con  $\text{PM}_{10}$ .

Todos estos resultados indican que tanto el  $\text{OP}^{\text{AA}}$  como el  $\text{OP}^{\text{DTT}}$  son sensibles a las especies orgánicas y a los metales arrastrados por el PM, pero en distinta medida. De hecho, el  $\text{OP}^{\text{DTT}}$  – en un ensayo basado en tioles- muestra una respuesta más equilibrada a todos los compuestos atmosféricos que el  $\text{OP}^{\text{AA}}$ , siendo más específico a unas pocas especies concretas (principalmente metálicas, o relacionadas con compuestos de combustión de biomasa).

## 5. RECOMENDACIONES GENERALES PARA UNA MAYOR NORMALIZACIÓN DE OTROS PROTOCOLOS DE POTENCIAL OXIDATIVO DE PM

A partir de los resultados de la comparación inter-laboratorios de RI-URBANS, se sugieren algunas recomendaciones para seguir normalizando los protocolos de OP. Entre ellas se incluyen directrices para la preparación de las muestras y las condiciones de laboratorio, la calibración de equipos y la notificación de los resultados. Además, debería proponerse un material de referencia (naftoquinona, cobre u otra solución de concentración conocida) para la medición del OP de PM con el fin de facilitar las comparaciones entre laboratorios. También es necesario armonizar los procedimientos para garantizar la comparabilidad de los datos, aunque se observaron algunas diferencias en los resultados obtenidos con el uso del SOP simplificado de RI-URBANS (Dominutti et al., 2024). A continuación, se describen los puntos clave que importan en la evaluación del OP de PM y que deben tenerse en cuenta para la armonización de los ensayos de OP en general. De hecho, en ausencia de un vínculo claro entre los estudios epidemiológicos y un único o un conjunto específico de ensayos de OP, debe continuar el desarrollo y las pruebas de diversos ensayos de OP con sensibilidades más amplias a las especies redox activas.

### 5.1. La selección del ensayo de OP de PM

Hasta la fecha, se recomienda el uso complementario de dos ensayos de OP, una sonda basada en tioles (como  $OP^{DTT}$  o  $OP^{GSH}$ ) y otro (como  $OP^{OH}$ ,  $OP^{AA}$ , u otro), con el fin de ofrecer una caracterización más completa de los posibles daños oxidativos inducidos por los compuestos de MP y fortalecer así la solidez de los estudios epidemiológicos. De hecho, la elección de la mejor prueba OP (o combinación) debe basarse en pruebas epidemiológicas que sólo se han estudiado recientemente y que necesitan más retrospectiva para determinarse.

### 5.2. Almacenamiento de las muestras

Las muestras de PM deben transportarse inmediatamente al laboratorio después del muestreo, y además deben mantenerse fríos (a  $4^{\circ}C$  o menos si el análisis de OP se realiza pocos días después de la recolección o  $<-20^{\circ}C$  si el análisis se retrasa). Dado que la vida útil de las ROS puede ser muy corta, y que el tiempo afecta también a las mediciones en los filtros, se deben realizar estudios de

envejecimiento para cada ensayo de OP a largo plazo con el fin de definir el tiempo máximo de almacenamiento en frío y en condiciones ambientales para los filtros de aerosoles.

### 5.3. Condiciones de laboratorio

Los ensayos OP son ensayos «traza» que requieren condiciones ambientales limpias para su manipulación, como una sala blanca o una campana de flujo laminar, para evitar la contaminación de las muestras. También se recomienda utilizar materiales completamente limpios, por lo que deben lavarse los viales, conos y espátulas antes de su uso utilizando un baño ácido y aclarándolos con agua ultrapura. Por último, se deben medir y controlar la temperatura del laboratorio y la exposición a la luz.

### 5.4. Extracción de la muestra para el ensayo

El paso de extracción puede ser muy variable según los procedimientos, y se sabe que varios parámetros influyen en los resultados del OP de PM, como la elección del disolvente, la concentración del tampón, la forma de agitación y la concentración obtenida tras la extracción de la muestra de PM. Recomendamos que todos estos parámetros se controlen explícitamente y se armonicen para cada prueba de OP que se desarrolle.

### 5.5. Fase de reacción del ensayo

Varios aspectos del proceso de reacción afectan al valor de OP de PM, como la concentración inicial de reactivos, la relación reactivo/muestra, el tiempo y la temperatura de reacción y el tipo de medidas (cinéticas o de valor final). Si bien la bibliografía actual aborda los parámetros de extracción o de reacción por separado, nosotros aconsejamos que ambos factores se evalúen conjuntamente para cuantificar su impacto relativo en los resultados, a fin de formular recomendaciones.

### 5.6. Desarrollo de un material de referencia con un «valor de OP de PM» certificado

El uso de un material de referencia con un valor de OP de PM asociado podría ayudar a algunos laboratorios a probar y formarse en el protocolo de OP antes de probar las muestras ciegas.

## 5.7. Calibración de equipos

Se aconseja investigar la frecuencia óptima para la calibración de espectrofotómetros para este tipo de ensayos.

## 5.8. Informe de resultados

El cálculo de la actividad  $OP^{DTT}$  durante el SOP de RI-URBANS implicó una conversión mediante una curva de calibración. Para futuros ejercicios de comparación, será necesario incorporar cierta estandarización en el informe de presentación de resultados. Además, se debería considerar la posibilidad de explorar métodos alternativos para el cálculo del OP.

## 5.9. Medición de OP en superestaciones de calidad del aire de la UE

Este documento guía evidencia la complejidad inherente a la obtención de mediciones precisas de OP a partir de filtros atmosféricos. Dado que se trata de una medición de naturaleza cinética sus resultados pueden verse afectados por diversas condiciones experimentales y de laboratorio si no se encuentran debidamente armonizadas. Las mediciones de OP recomendadas en las superestaciones de calidad del aire de la UE están orientadas a proporcionar series temporales a largo plazo para estudios epidemiológicos, por lo que es crucial una armonización metodológica a escala europea.

Dicho esto, mientras no se disponga de métodos de medición de OP en tiempo real, se recomienda que las mediciones de OP en laboratorio basadas en filtros en las estaciones urbanas de la UE, se realicen en laboratorios con experiencia en análisis de OP de PM, y concentrar las mediciones, siempre que sea posible, en un número limitado de laboratorios por país.

## 6. REFERENCIAS

- Abrams, J.Y., Weber, R.J., Klein, M., Samat, S.E., Chang, H.H., Strickland, M.J., Verma, V., ... & Tolbert, P.E., 2017. Associations between Ambient Fine Particulate Oxidative Potential and Cardiorespiratory Emergency Department Visits. *Environ. Health Perspect.* 125, 107008. <https://doi.org/10.1289/EHP1545>
- Argyropoulos, G., Basis, A., Voutsas, D., Samara, C., Sowlat, M.H., Hasheminassab S., 2016. Source apportionment of the redox activity of urban quasi-ultrafine particles (PM<sub>0.49</sub>) in Thessaloniki following the increased biomass burning due to the economic crisis in Greece. *Sci. Total Environ.*, 568 124-136, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.217>
- Bates, J.T., Fang, T., Verma, V., Zeng, L., Weber, R.J., Tolbert, P.E., Abrams, J.Y., ... & Russell, A.G., 2019. Review of Acellular Assays of Ambient Particulate Matter Oxidative Potential: Methods and Relationships with Composition, Sources, and Health Effects. *Environ. Sci. Technol.* 53, 4003–4019. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b03430>
- Bates, J.T., Weber, R.J., Abrams, J., Verma, V., Fang, T., Klein, M., Strickland, M.J., ... & Russell, A.G., 2015. Reactive Oxygen Species Generation Linked to Sources of Atmospheric Particulate Matter and Cardiorespiratory Effects. *Environ. Sci. Technol.* 49, 13605–13612. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02967>
- Borlaza, L.J.S., Uzu, G., Ouidir, M., Lyon-Caen, Sarah, Marsal, A., Weber, S., Siroux, V., ... & Morlot, A., 2022. Personal exposure to PM<sub>2.5</sub> oxidative potential and its association to birth outcomes. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* <https://doi.org/10.1038/s41370-022-00487-w>
- Borlaza, L.J.S., Weber, S., Jaffrezo, J.-L., Houdier, S., Slama, R., Rieux, C., Albinet, A., Micallef, S., Trébluchon, C., Uzu, G., 2021. Disparities in particulate matter (PM<sub>10</sub>) origins and oxidative potential at a city scale (Grenoble, France) – Part 2: Sources of PM<sub>10</sub>; oxidative potential using multiple linear regression analysis and the predictive applicability of multilayer perceptron neural network analysis. *Atmospheric Chem. Phys.* 21. 9719–9739. <https://doi.org/10.5194/acp-21-9719-2021>
- Borlaza-Lacoste, L., Mardoñez, V., Marsal, A., Hough, I., Dinh, V.N.T., Dominutti, P., Jaffrezo, J.-L., ... & Uzu, G., 2024. Oxidative potential of particulate matter and its association to respiratory health endpoints in high-altitude cities in Bolivia. *Environ. Res.* 255, 119179. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.119179>
- Calas, A., Uzu, G., Besombes, J.L., Martins, J.M.F., Redaelli, M., Weber, S., Charron, A., ... & Jaffrezo, J.L., 2019. Seasonal variations and chemical predictors of oxidative potential (OP) of particulate matter (PM), for seven urban French sites. *Atmosphere* 10. 1–20. <https://doi.org/10.3390/atmos10110698>
- Calas, A., Uzu, G., Kelly, F.J., Houdier, S., Martins, J.M.F., Thomas, F., Molton, F., Charron, A., ... & Jaffrezo, J.-L., 2018. Comparison between five acellular oxidative potential measurement assays performed with detailed chemistry on PM<sub>10</sub> samples from the city of Chamonix (France). *Atmospheric Chem. Phys.* 18, 7863–7875. <https://doi.org/10.5194/acp-18-7863-2018>
- 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. *Sci. Rep.* 7, 11617. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11979-3>
- Canova, C., Minelli, C., Dunster, C., Kelly, F., Shah, P., Caneja, C., Tumilty, M, Burney, P, 2014. PM<sub>10</sub> Oxidative Properties and Asthma and COPD. *Epidemiology, Letters* 25. <https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000085>

- Cesari, D., Merico, E., Grasso, F.M., Decesari, S., Belosi, F., Manarini, F., Nuntii, P.D., Rinaldi, M., ... & Contini, D., 2019. Source Apportionment of PM<sub>2.5</sub> and of its Oxidative Potential in an Industrial Suburban Site in South Italy. *Atmosphere* 10. 758. <https://doi.org/10.3390/atmos10120758>
- Cho, A.K., Sioutas, C., Miguel, A.H., Kumagai, Y., Schmitz, D.A., Singh, M., Eiguren-Fernandez, A., Froines, J.R., 2005. Redox activity of airborne particulate matter at different sites in the Los Angeles Basin. *Environ. Res.* 99, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2005.01.003>
- Daellenbach, K.R., Uzu, G., Jiang, J., Cassagnes, L.-E., Leni, Z., Vlachou, A., Stefanelli, G., .... & Prévôt, A.S.H., 2020. Sources of particulate-matter air pollution and its oxidative potential in Europe. *Nature* 587, 414–419. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2902-8>
- Delfino, R.J., Sioutas, C., Malik, S., 2005. Potential role of ultrafine particles in associations between airborne particle mass and cardiovascular health. *Environ. Health Perspect.* 113, 934–946. <https://doi.org/10.1289/ehp.7938>
- Dominutti, P.A., Borlaza, L.J.S., Sauvain, J.J., Thuy, V.D.N, Houdier, S., Suarez, G., Jaffrezo, J.-L., Tobin, S., .... & Uzu, G., 2023. Source apportionment of oxidative potential depends on the choice of the assay: insights into 5 protocols comparison and implications for mitigation measures. *Environ. Sci.: Atmos.*, 3, 1497, <https://doi.org/10.1039/D3EA00007A>
- Dominutti, P. A., Jaffrezo, J.-L., Marsal, A., Mhadhbi, T., Elazzouzi, R., Rak, C., Cavalli, F., .... Uzu, G., 2024. An interlaboratory comparison to quantify oxidative potential measurement in aerosol particles: challenges and recommendations for harmonisation. *Atmos. Meas. Tech. Discuss.*, <https://doi.org/10.5194/amt-2024-107>
- Fang, T., Guo, H., Zeng, L., Verma, V., Nenes, A., Weber, R.J., 2017a. Highly Acidic Ambient Particles, Soluble Metals, and Oxidative Potential: A Link between Sulfate and Aerosol Toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 51. 2611–2620. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b06151>
- Fang, T., Verma, V., Bates, J.T., Abrams, J., Klein, M., Strickland, J.M., Sarnat, E.S., ... & Weber, J.R., 2016. Oxidative potential of ambient water-soluble PM<sub>2.5</sub> in the southeastern United States: Contrasts in sources and health associations between ascorbic acid (AA) and dithiothreitol (DTT) assays. *Atmospheric Chem. Phys.* 16, 3865–3879. <https://doi.org/10.5194/acp-16-3865-2016>
- Fang, T., Zeng, L., Gao, D., Verma, V., Stefaniak, A.B., Weber, R.J., 2017b. Ambient Size Distributions and Lung Deposition of Aerosol Dithiothreitol-Measured Oxidative Potential: Contrast between Soluble and Insoluble Particles. *Environ. Sci. Technol.* 51. 6802–6811. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01536>
- Gao, D., Mulholland, J.A., Russell, A.G., Weber, R.J., 2020. Characterization of water-insoluble oxidative potential of PM<sub>2.5</sub> using the dithiothreitol assay. *Atmos. Environ.* 224, 117327. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2020.117327>
- Goldsmith, C.-A., Frevert, C., Imrich, A., Sioutas, C., Kobzik, L., 1997. Alveolar Macrophage Interaction with Air Pollution Particulates. *Environ. Health Perspect.* 105, 1191. <https://doi.org/10.2307/3433531>
- Grandesso, E., Kowalewski, K., Perez Ballesta, P., 2012. First EC-JRC PAHs inter-laboratory comparison on PM<sub>10</sub> quartz filters. (No. EUR 25170 EN-2012). European Commission. Joint Research Centre. Institute for Environment and Sustainability., Luxembourg.
- Grange, S.K., Uzu, G., Weber, S., Jaffrezo, J., Hueglin, C., 2022. Linking Switzerland’s PM<sub>10</sub> and PM<sub>2.5</sub> oxidative potential (OP) with emission sources. *Atmospheric Chem. Phys.* 22, 7029–7050. <https://doi.org/10.5194/acp-22-7029-2022>

- Gulliver, J., Morley, D., Dunster, C., McCrea, A., van Nunen, E., Tsai, M.-Y., Probst-Hensch, N., .... & Kelly, F.J., 2018. Land use regression models for the oxidative potential of fine particles (PM 2.5 ) in five European areas. *Environ. Res.* 160. 247–255. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.10.002>
- He, L., Norris, C., Cui, X., Li, Z., Barkjohn, K.K., Brehmer, C., Teng, Y., Fang, L., Lin, L., Wang, Q., ... & Zhang, J.J., 2021. Personal Exposure to PM<sub>2.5</sub> Oxidative Potential in Association with Pulmonary Pathophysiologic Outcomes in Children with Asthma. *Environ. Sci. Technol.* 55, 3101–3111. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c06114>
- Hellack, B., Yang, A., Cassee, F.R., Janssen, N.A.H., Schins, R.P.F., Kuhlbusch, T.A.J., 2014. Intrinsic hydroxyl radical generation measurements directly from sampled filters as a metric for the oxidative potential of ambient particulate matter. *J. Aerosol Sci.* 72, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2014.02.003>
- in 't Veld, M., Pandolfi, M., Amato, F., Pérez, N., Reche, C., Dominutti, P., Jaffrezo, J., Alastuey, A., Querol, X., Uzu, G., 2023. Discovering oxidative potential (OP) drivers of atmospheric PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub>, and PM<sub>1</sub> simultaneously in North-Eastern Spain. *Sci. Total Environ.* 857, 159386. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159386>
- Janssen, N.A.H., Strak, M., Yang, A., Hellack, B., Kelly, F.J., Kuhlbusch, T.A.J., Harrison, R.M., ... & Hoek, G., 2015. Associations between three specific a-cellular measures of the oxidative potential of particulate matter and markers of acute airway and nasal inflammation in healthy volunteers. *Occup. Environ. Med.* 72, 49–56. <https://doi.org/10.1136/oemed-2014-102303>
- Korsiak, J., Lavigne, E., You, H., Pollitt, K., Kulka, R., Hatzopoulou, M., Evans, G., Burnett, R.T., Weichenthal, S., 2022. Air Pollution and Pediatric Respiratory Hospitalizations: Effect Modification by Particle Constituents and Oxidative Potential. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 206, 1370–1378. <https://doi.org/10.1164/rccm.202205-0896OC>
- Landreman, A.P., Shafer, M.M., Hemming, J.C., Hannigan, M.P., Schauer, J.J., 2008. A Macrophage-Based Method for the Assessment of the Reactive Oxygen Species (ROS) Activity of Atmospheric Particulate Matter (PM) and Application to Routine (Daily-24 h) Aerosol Monitoring Studies. *Aerosol Sci. Technol.* 42, 946–957. <https://doi.org/10.1080/02786820802363819>
- Lavigne, É., Burnett, R.T., Stieb, D.M., Evans, G.J., Godri Pollitt, K.J., Chen, H., van Rijswijk, D., Weichenthal, S., 2018. Fine Particulate Air Pollution and Adverse Birth Outcomes: Effect Modification by Regional Nonvolatile Oxidative Potential. *Environ. Health Perspect.* 126, 077012. <https://doi.org/10.1289/EHP2535>
- Liu, L., Urch, B., Szyszkowicz, M., Evans, G., Speck, M., Van Huang, A., Leingartner, K., ... & Silverman, F.S., 2018. Metals and oxidative potential in urban particulate matter influence systemic inflammatory and neural biomarkers: A controlled exposure study. *Environ. Int.* 121. 1331–1340. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.10.055>
- Maikawa, C.L., Weichenthal, S., Wheeler, A.J., Dobbin, N.A., Smargiassi, A., Evans, G., Liu, L., Goldberg, M.S., Pollitt, K.J.G., 2016. Particulate Oxidative Burden as a Predictor of Exhaled Nitric Oxide in Children with Asthma. *Environ. Health Perspect.* 124, 1616–1622. <https://doi.org/10.1289/EHP175>
- Marsal, A., Sauvain, J.-J., Thomas, A., Lyon-Caen, S., Borlaza, L.J.S., Philippat, C., Jaffrezo, J.-L., ... & Uzu, G., 2024. Effects of personal exposure to the oxidative potential of PM<sub>2.5</sub> on oxidative stress biomarkers in pregnant women. *Sci. Total Environ.* 911. 168475. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168475>

- Marsal, A., Slama, R., Lyon-Caen, S., Borlaza, L.J.S., Jaffrezo, J.-L., Boudier, A., .... & Siroux, V., 2023. Prenatal Exposure to PM2.5 Oxidative Potential and Lung Function in Infants and Preschool- Age Children: A Prospective Study. *Environ. Health Perspect.* 131. 017004. <https://doi.org/10.1289/EHP11155>
- Massimi, L., Ristorini, M., Astolfi, M.L., Perrino, C., Canepari, S., 2020. High resolution spatial mapping of element concentrations in PM10: A powerful tool for localization of emission sources. *Atmospheric Res.* 244, 105060. <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2020.105060>
- Paraskevopoulou, D., Bougiatioti, A., Stavroulas, I., Fang, T., Lianou, M., Liakakou, E., ... & Mihalopoulos, N., 2019. Yearlong variability of oxidative potential of particulate matter in an urban Mediterranean environment. *Atmos. Environ.* 206, 183–196. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2019.02.027>
- Perrone, M.G., Zhou, J., Malandrino, M., Sangiorgi, G., Rizzi, C., Ferrero, L., Dommen, J., Bolzacchini, E., 2016. PM chemical composition and oxidative potential of the soluble fraction of particles at two sites in the urban area of Milan, Northern Italy. *Atmos. Environ.* 128, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2015.12.040>
- 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. *Atmos. Environ.* 191. 340–350. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2018.08.022>
- Sarnat, S.E., Chang, H.H., Weber, R.J., 2016. Ambient PM2.5 and Health: Does PM2.5 Oxidative Potential Play a Role? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 194, 530–531. <https://doi.org/10.1164/rccm.201603-0589ED>
- Sauvain, J.J., Deslarzes, S., Riediker, M., 2008. Nanoparticle reactivity toward dithiothreitol. *Nanotoxicology* 2, 121–129. <https://doi.org/10.1080/17435390802245716>
- Shahpoury, P., Zhang, Z.W., Filippi, A., Hildmann, S., Lelieveld, S., Mashtakov, B., Patel, B.R., .... & Tong, H., 2022. Inter-comparison of oxidative potential metrics for airborne particles identifies differences between acellular chemical assays. *Atmospheric Pollut. Res.* 13, 101596. <https://doi.org/10.1016/j.apr.2022.101596>
- Shen, J., Taghvaei, S., La, C., Oroumiyeh, F., Liu, J., Jerrett, M., Weichenthal, S., Del Rosario, I., ... & Paulson, S.E., 2022. Aerosol Oxidative Potential in the Greater Los Angeles Area: Source Apportionment and Associations with Socioeconomic Position. *Environ. Sci. Technol.* 56, 17795–17804. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c02788>
- Shi, T., 2003. Temporal variation of hydroxyl radical generation and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation by coarse and fine particulate matter. *Occup. Environ. Med.* 60. 315–321. <https://doi.org/10.1136/oem.60.5.315>
- Srivastava, D., Tomaz, S., Favez, O., Lanzafame, G.M., Golly, B., Besombes, J.-L., Alleman, L.Y., ... & Albinet, A., 2018. Speciation of organic fraction does matter for source apportionment. Part 1: A one-year campaign in Grenoble (France). *Sci. Total Environ.* 624, 1598–1611. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.135>
- Strak, M., Janssen, N., Beelen, R., Schmitz, O., Karssenberg, D., Houthuijs, D., van den Brink, C., ... & Hoek, G., 2017. Associations between lifestyle and air pollution exposure: Potential for confounding in large administrative data cohorts. *Environ. Res.* 156, 364–373. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.03.050>
- Toyib, O., Lavigne, E., Traub, A., Umbrio, D., You, H., Ripley, S., Pollitt, K., Shin, T., Kulka, R., ... & Weichenthal, S., 2022. Long-term Exposure to Oxidant Gases and Mortality: Effect Modification by PM2.5 Transition

Metals and Oxidative Potential. *Epidemiology* 33, 767–776.  
<https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000001538>

- Uzu, G., Sauvain, J.J., Baeza-Squiban, A., Riediker, M., Hohl, M.S.S., Val, S., Tack, K., Denys, S., Pradère, P., Dumat, C., 2011. In vitro assessment of the pulmonary toxicity and gastric availability of lead-rich particles from a lead recycling plant. *Environ. Sci. Technol.* 45, 7888–7895.  
<https://doi.org/10.1021/es200374c>
- Verlhac, S., Leoz, E., Albinet, A., Cabillic, J., Lalere, B., Fallot, C., 2014. Comparaison interlaboratoires sur l'analyse des HAP dans l'air ambiant (No. DRC-14-144350-09750A). Laboratoire Central de Surveillance de la Qualité de l'Air.
- Verma, V., Fang, T., Guo, H., King, L., Bates, J.T., Peltier, R.E., Edgerton, E., Russell, A.G., Weber, R.J., 2014. Reactive oxygen species associated with water-soluble PM<sub>2.5</sub>; in the southeastern United States: spatiotemporal trends and source apportionment. *Atmospheric Chem. Phys.* 14, 12915–12930.  
<https://doi.org/10.5194/acp-14-12915-2014>
- Visentin, M., Pagnoni, A., Sarti, E. and Pietrogrande, M.C., 2016. Urban PM<sub>2.5</sub> oxidative potential: Importance of chemical species and comparison of two spectrophotometric cell-free assays, *Environ. Pollut.*, 219, 72–79, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.047>
- Vörösmarty, M., Uzu, G., Jaffrezo, J. L., Dominutti, P., Kertész, Z., Papp, E., and Salma, I., 2023. Oxidative potential in rural, suburban and city centre atmospheric environments in central Europe. *Atmos. Chem. Phys.*, 23, 22, 14255-14269, <https://doi.org/10.5194/acp-23-14255-2023>
- Weber, S., 2021. Source apportionment of the Oxidative Potential of aerosols, A visualisation tool and supplementary information, <http://getopstandop.u-ga.fr/>
- Weber, S., Salameh, D., Albinet, A., Alleman, L.Y., Waked, A., Besombes, J.L., Jacob, V., ... & Favez, O., 2019. Comparison of PM<sub>10</sub> sources profiles at 15 french sites using a harmonized constrained positive matrix factorization approach. *Atmosphere* 10. 1–22. <https://doi.org/10.3390/atmos10060310>
- Weber, S., Uzu, G., Calas, A., Chevrier, F., Besombes, J.-L., Charron, A., Salameh, D., ... & Jaffrezo, J.-L., 2018. An apportionment method for the oxidative potential of atmospheric particulate matter sources: application to a one-year study in Chamonix, France. *Atmospheric Chem. Phys.* 18, 9617–9629.  
<https://doi.org/10.5194/acp-18-9617-2018>
- Weber, S., Uzu, G., Favez, O., Borlaza, L.J.S., Calas, A., Salameh, D., Chevrier, F., Allard, J., ... & Jaffrezo, J.-L., 2021. Source apportionment of atmospheric PM<sub>10</sub> oxidative potential: synthesis of 15 year-round urban datasets in France. *Atmospheric Chem. Phys.* 21. 11353–11378. <https://doi.org/10.5194/acp-21-11353-2021>
- Weichenthal, S., Lavigne, E., Evans, G., Pollitt, K., Burnett, R.T., 2016. Ambient PM<sub>2.5</sub> and risk of emergency room visits for myocardial infarction: impact of regional PM<sub>2.5</sub> oxidative potential: a case-crossover study. *Environ. Health* 15, 46. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0129-9>
- WHO, 2021. WHO global air quality guidelines Particulate matter (PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub>), ozone, nitrogen dioxide, sulfur dioxide and carbon monoxide. 22 September 2021.  
<https://www.who.int/publications/i/item/9789240034228>
- Xiong, Q., Yu, H., Wang, R., Wei, J., Verma, V., 2017. Rethinking Dithiothreitol-Based Particulate Matter Oxidative Potential: Measuring Dithiothreitol Consumption versus Reactive Oxygen Species Generation. *Environ. Sci. Technol.* 51. 6507–6514. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01272>

- Yang, A., Janssen, N.A.H., Brunekreef, B., Cassee, F.R., Hoek, G., Gehring, U., 2016. Children's respiratory health and oxidative potential of PM<sub>2.5</sub>: the PIAMA birth cohort study. *Occup. Environ. Med.* 73, 154–160. <https://doi.org/10.1136/oemed-2015-103175>
- 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 PM<sub>2.5</sub> and its constituents: The effect of extraction solvent and filter type. *Atmos. Environ.* 83, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2013.10.049>
- Zhou, J., Elser, M., Huang, R.-J., Krapf, M., Fröhlich, R., Bhattu, D., Stefenelli, G., Zotter, P., ... & Dommen, J., 2019. Predominance of secondary organic aerosol to particle-bound reactive oxygen species activity in fine ambient aerosol. *Atmospheric Chem. Phys.* 19, 14703–14720. <https://doi.org/10.5194/acp-19-14703-2019>