



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

ESTUDIO DEL TRANSPORTE DE SUSTANCIAS POR VÍA  
CUTÁNEA O MUCOSAL

ESTUDIO DE LA PENETRACIÓN DE FENANTRENO A PARTIR  
DE MUESTRAS DE SUELO A TRAVÉS DE PIEL "EX VIVO"

EL INFORME DE SERVICIO SOCIAL  
T I T U L A C I O N  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA  
P R E S E N T A :  
A R A C E L I M O R A A N G E L E S

ASESORA DE TESIS: DRA. ADRIANA GANEM RONDERO

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

2004

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos:

El Informe de Servicio Social: Estudio del Transporte de Sustancias por Vía Cutánea o Mucosal. Estudio de la Penetración de Fenantreno a Partir de Muestras de Suelo a Través de Piel "Ex vivo".

que presenta la pasante: Araceli Mora Angeles  
con número de cuenta: 9560334-8 para obtener el título de:  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de Diciembre de 2003

PRESIDENTE	<u>MFC. Ma. Eugenia R. Posada Galarza</u>	
VOCAL	<u>QFB. Ma. Esther Revuelta Miranda</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Flora Adriana Ganem Rondero</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Dr. David Quintanar Guerrero</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MC. Norma L. Delgado Buenrostro</u>	

## **Agradecimientos y dedicatorias**

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por darme la oportunidad de formar parte de ella, y poder crecer profesionalmente.

### **Dra. Adriana Ganem Rondero:**

Agradezco su tiempo, sus conocimientos, dedicación, paciencia y la oportunidad que me brindo para realizar y concluir este trabajo.

Pero en especial le doy las gracias su amistad y sus consejos.

Agradezco a todos mis sinodales: por su ayuda consejos y tiempo dedicado, para finalizar este trabajo:

MFC. Ma. Eugenia R. Posadas

QFB Ma. Esther Revueltas

Dra. Adriana Ganem

Dr. David Quintanar

MC. Norma L. Delgado

### **A todos mis profesores:**

Agradezco a todos aquellos profesores y profesoras que directa o indirectamente contribuyeron a mi formación educativa durante toda mi vida por que de todos aprendí cada día algo nuevo.

## **Dedico este trabajo a:**

**Mis Padres Adalberto Mora y Petra Angeles:** Con mucho cariño porque me dieron la oportunidad de estudiar y por haberme enseñado que todo con esfuerzo, trabajo y dedicación se puede obtener y les doy las gracias por todo el apoyo que me han dado durante toda mi vida, por ser el motivo más grande que tengo para ser cada día mejor y porque la mejor educación que pude haber obtenido la aprendí de ellos.

**Mi hermana Alejandra Mora:** Con mucho cariño por toda la ayuda que me ha dado y por ser un ejemplo para mí como persona.

**A mi hermano Adalberto Mora:** Con todo cariño ya que siempre ha estado cuando lo necesito y por ser un gran amigo para mí.

**A Alberto Sánchez Chávez:** Por todo su apoyo, ayuda y por toda la motivación que me da para poder terminar lo que he iniciado y porque hoy forma una parte importante de mi vida.

**A todos mis amigos y compañeros** que hay contribuido directa e indirectamente con este trabajo en especial a Miriam López Jennifer C., Luis Antonio G., Gisela, Guadalupe N.

<b>Índice</b>	<b>Pag.</b>
Índice de tablas.....	I
Índice de figuras.....	II
Índice de abreviaturas.....	III
1 Introducción.....	1
2 Marco teórico.....	2
2.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	2
2.1.1. Identidad, propiedades físicas y químicas y métodos analíticos.....	4
2.1.2. Fuentes de exposición humana y ambiental.....	5
2.1.3. Niveles ambientales y exposición humana.....	7
2.2. Los HAPs están omnipresentes en el medio ambiente.....	8
2.2.1. Aire.....	8
2.2.2. Agua superficial y precipitación.....	8
2.2.3. Sedimentos.....	9
2.2.4. Suelo.....	9
2.2.5. Alimentos.....	9
2.2.6. Organismos acuáticos.....	10
2.2.7. Organismos terrestres.....	10
2.2.8. La población general.....	10
2.2.9. Exposición profesional.....	11
2.2.10. Toxicidad de los HAP.....	11
2.2.11. Normatividad de los HAP.....	14
2.3. La piel.....	16
2.3.1. Complejidad de la piel.....	16
2.3.2. Variaciones de la piel.....	17
2.3.3. Composición.....	17
2.3.3.1. Estratos epicutáneos.....	18
2.3.3.2. Epidermis.....	18
2.3.3.3. Unión dermoepidérmica.....	21
2.3.3.4. Dermis.....	21

2.3.3.5. Hipodermis.....	23
2.3.4. Accesorios de la piel.....	23
2.3.4.1. Pelos.....	23
2.3.4.2. Uñas.....	24
2.3.4.3. Glándulas sudoríparas.....	24
2.3.4.4. Glándulas sebáceas.....	24
2.3.4.5. Factores importantes de la piel.....	25
2.3.5. Sentido del tacto.....	27
2.3.6. Función protectora.....	27
2.3.7. Respiración de la piel.....	28
2.3.8. Regulación térmica.....	29
2.3.9. Funciones secretoras.....	29
2.3.10. Defensa inmunológica.....	31
2.3.11. Pérdida de agua.....	31
2.3.12. Protección contra agentes tóxicos.....	32
2.3.13. Coeficiente de partición.....	32
2.3.14. Microorganismos.....	33
2.3.15. Mecanismos inmunes.....	34
2.4. Absorción percutánea.....	35
2.5. Técnica del tape stripping.....	40
3. Propiedades del fenantreno.....	42
4. Hipótesis .....	43
5. Objetivos.....	44
6. Metodología.....	46
6.1. Material y reactivos.....	46
6.2. Obtención de la piel.....	47
6.3. Preparación del solvente para la curva.....	47
6.4. Curva de calibración.....	47
6.5. Preparación de las muestras con fenantreno.....	48
6.6. Permeaciones.....	48
6.7. Técnica de Tape-stripping.....	49

6.8. Tratamiento de los datos.....	49
7. Resultados y análisis de resultados.....	50
8. Conclusiones.....	67
9. Perspectivas.....	69
10. Agradecimientos.....	70
11. Bibliografía.....	71
12. Glosario.....	77
13. Anexos.....	81
Anexo 1 Curva de calibración.....	82
Anexo 2 Cálculo de la linealidad del sistema.....	83
Anexo 3 Análisis de varianza: distancia máxima de penetración en función del tiempo.....	84
Anexo 4 Prueba de Duncan.....	85
Anexo 5 Análisis de varianza: microgramos permeados de fenantreno en función del tiempo.....	86
Anexo 6 Prueba de Kolmogorov.....	87

# Índice de figuras

Figura	Nombre	Página
1.	Estructuras de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos	3
2.	Composición de la piel.....	17
3.	Estructura microscópica de la piel.....	19
4.	Vascularización de la piel.....	22
5.	Accesorios de la piel.....	25
6.	Estructura de la piel.....	35
7.	Rutas de permeación a través del estrato córneo.....	36
8.	Tape stripping .....	40
9.	Estructura del fenantreno.....	42
10.	Celda de perfusión .....	49
11.	Espectro de absorción del fenantreno utilizando como solvente etanol absoluto en una concentración de 10.6 $\mu$ g /ml.....	50
12.	Espectro de la tierra elegida para este trabajo con solución etanol-estrato córneo.....	51
13.	Espectro de absorción del fenantreno utilizando como solvente etanol-estrato córneo previamente preparado.....	52
14.	Curva de calibración de fenantreno en solución etanólica preparada con estrato córneo .....	53
15.	Gráfica del perfil que siguió el fenantreno en contacto con piel durante 1h	55
16.	Gráfica del perfil que siguió el fenantreno en contacto con piel durante 2h	56
17.	Gráfica del perfil que siguió el fenantreno en contacto con piel durante 3h	56
18.	Gráfica del perfil que siguió el fenantreno en contacto con piel durante 4h	57
19.	Gráfica del perfil que siguió el fenantreno en contacto con piel durante 6h	57
20.	Gráfica del perfil que siguió el fenantreno en contacto con piel durante 24h.....	58
21.	Gráfica de tiempo contra distancia máxima de penetración.....	62
22.	Gráfica de $\mu$ g de fenantreno absorbidos en estrato córneo.....	63

## Índice de tablas

<b>Tabla</b>	<b>Nombre</b>	<b>Pagina</b>
1.	Efectos tóxicos de los HAP sobre organismos acuáticos.....	13
2.	Coefficientes individuales para cada punto de la curva de calibración.	52
3.	Datos de la Curva de calibración.....	53
4.	Resultados de las permeaciones.....	59
5.	ANOVA para determinar las diferencias entre distancias máximas a los diferentes tiempos de contacto	60
6.	Promedio de distancias máximas de permeación acumuladas y promedios calculados de la tabla de Duncan.....	61
7.	Diferencias entre promedios de las distancias acumuladas.....	61
8.	ANOVA para determinar las diferencias entre microgramos totales absorbidos a los diferentes tiempos de contacto.....	64

## Lista de abreviaturas

ANOVA	Análisis de Varianza
AIRC	Instituto Americano de Investigación del Cáncer
cc	Centímetros cúbicos
C E	Confederación Europea
cm <sup>2</sup>	Centímetros cuadrados
DNA	Ácido desoxirribonucleico
g	Gramos
h	Hora
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
INSHT	Instituto Nacional de Seguridad e Higiene del Trabajo
km	Kilómetros
LC <sub>50</sub>	Concentración letal mínima para el 50% de la población
m <sup>3</sup>	Metros cúbicos
MFO	Mixes Funtion Oxidasas
mg	Miligramos
mm	Milímetros
m.s.	Masa de suelo
μg	Microgramos
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud (WHO)
WHO	World Health Organization (OMS)

# 1. Introducción

Indudablemente existen diferentes contaminantes en nuestro medio ambiente que pueden afectar en algún determinado momento nuestro organismo. Es por ello que en este trabajo se estudió la permeación de un hidrocarburo aromático (fenantreno) a través de la piel, considerando que puede ser un contaminante del suelo, con el que cualquier persona puede entrar en contacto. Es bien sabido que existen diferentes medios de intoxicación, pero se ha tomado muy poco en cuenta la vía transdérmica.

La piel se considera como una envoltura de protección para todo nuestro organismo, además de ser un órgano completamente complejo, ya que a través de ella secretamos diferentes sustancias como: agua en forma de sudor, lípidos, fármacos, etc. Así como estas sustancias son secretadas, hay sustancias que pueden penetrar a través de ella. Esta propiedad de la piel es muy útil en el transporte de fármacos con acción sistémica o tópica ya que cuenta con diferentes rutas de absorción.

No obstante, las rutas de absorción percutánea también pueden ser usadas por otras sustancias que se encuentran en el medio ambiente y con las que la piel puede entrar en contacto. Aunque algunas de estas sustancias pueden ser inofensivas para el organismo, existen otras que pueden ser realmente tóxicas.

A pesar de que los hidrocarburos se consideran como agentes cancerígenos, los cuales los podemos encontrar en una gran variedad de productos químicos como: lacas, barnices, pinturas, derivados de petróleo, contaminantes como el humo del escape de los autos, en la combustión en general y en los derrames petroleros, pero poco se ha estudiado acerca de la penetración a través de la piel, de estos contaminantes

## **2. Marco teórico**

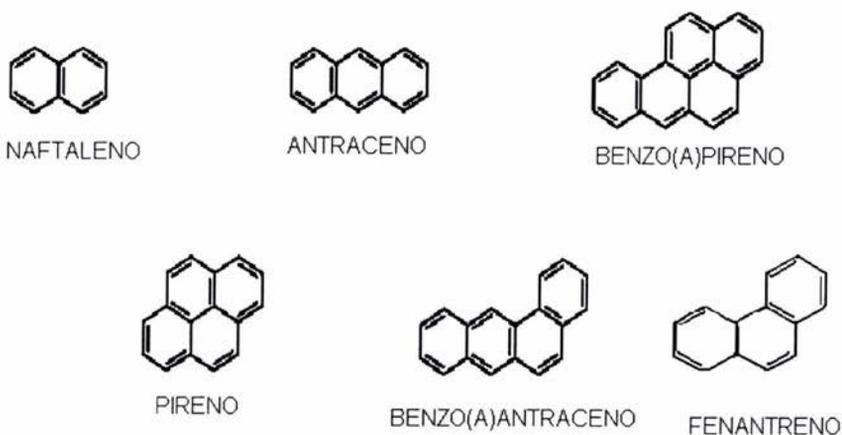
### **2.1. Hidrocarburos aromáticos Policíclicos .**

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) han estado presentes como contaminantes desde los inicios de la vida del hombre, ya que son compuestos naturales presentes en el medio ambiente. Sin embargo, el crecimiento industrial ha puesto un aumento de gran número de contaminantes en el entorno natural, entre ellos los HAPs.

El estudio científico de los HAPs y sus efectos datan de 1775, al atribuirse el cáncer padecido por los limpiadores de chimeneas a la exposición del hollín y la ceniza que suponía su actividad. Investigaciones posteriores sugirieron que los agentes causantes del cáncer eran los HAPs contenidos en el hollín. A lo largo de los años 30 se demostró que algunos de los HAPs presentaban un fuerte potencial cancerígeno, mientras se estudiaban similares propiedades de otros.

La familia de los HAPs es un grupo de hidrocarburos que consisten en moléculas que contienen dos o más anillos aromáticos de 6 carbonos fusionados. Los anillos fusionados son aquellos que comparten dos átomos de carbono y un enlace entre ellos. Como característica común presentan una baja solubilidad en agua, además de ser la mayoría de ellos lipofílicos. A medida que aumenta el número de anillos aromáticos fusionados, como en antraceno y fenantreno, continúa decreciendo la energía de resonancia por anillo y los compuestos se hacen más reactivos.

Los HAPs constituyen una clase muy amplia de compuestos, y durante la combustión incompleta o la pirólisis de materia orgánica pueden liberarse cientos de sustancias distintas, que son una fuente importante de exposición humana. Los estudios de diversas matrices aplicables al medio ambiente, como los efluentes de la combustión de carbón, los gases de escape de los vehículos de motor, el aceite lubricante de motores usados y el humo del tabaco, han demostrado que los HAPs de esas mezclas son los principales responsables de su potencial carcinogénico. Existen diferentes hidrocarburos aromáticos los cuales son potencialmente carcinogénicos, pero para nuestro estudio utilizamos el fenantreno que es un HAPs que está formado por tres anillos aromáticos, como se muestra en la figura 1 (Hertel et al. 1998)



**Figura 1. Estructuras de los Hidrocarburos** (Antón, 2001)

### **2.1.1. Identidad, propiedades físicas y químicas y métodos analíticos**

El término "hidrocarburos aromáticos policíclicos" se refiere en general a una clase muy amplia de compuestos orgánicos de dos o más anillos aromáticos condensados formados por átomos de carbono y de hidrógeno. A temperatura ambiente, los HAPs son sólidos, con puntos de fusión y ebullición elevados y solubilidad en agua muy baja, que tiende a disminuir con el aumento de peso molecular. También son solubles en muchos disolventes orgánicos y muy lipofílicos. Desde el punto de vista químico son bastante inertes. Las reacciones que tienen interés con respecto a su destino en el medio ambiente y a las posibles fuentes de pérdida durante el muestreo atmosférico son la fotodescomposición y las reacciones con óxidos de nitrógeno, ácido nítrico, óxido de azufre, ozono y radicales hidroxilo.

Se toman muestras del aire del ambiente recogiendo partículas suspendidas en filtros de fibra de vidrio, de politetrafluoroetileno o de fibra de cuarzo mediante muestreadores de alto volumen o pasivos. Los HAPs en fase de vapor, podrían volatilizarse de los filtros durante el muestreo, por lo que se suelen retener por absorción en espuma de poliuretano. La fase de muestreo es la fuente más importante de variabilidad de los resultados.

Se han descrito numerosas técnicas de extracción y purificación. En función a la matriz, los HAPs se extraen de las muestras con un aparato de Soxhlet, por ultrasonido, mediante reparto líquido-líquido o tras la disolución o la digestión alcalina de la muestra con un disolvente selectivo. También se ha utilizado la extracción de fluidos supercríticos a partir de diversos sólidos del medio ambiente. La eficacia de la extracción depende en gran medida del disolvente utilizado aunque muchos de los que se utilizaban en el pasado no eran apropiados. Las muestras extraídas se suelen purificar por cromatografía en columna, en particular sobre alúmina, sílica gel o Sephadex LH-20, pero también por cromatografía en capa fina.

La identificación y la cuantificación se realizan habitualmente mediante cromatografía de gases con detección por ionización de llama o mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detección por ultravioleta o

fluorescencia, generalmente en serie. En la cromatografía de gases se utilizan columnas capilares de sílice fundida con polisiloxanos (SE-54 y SE-52) como fases estacionarias; en HPLC se suelen utilizar columnas de sílice -C18. Con frecuencia se acopla un detector de espectrometría de masas o una columna de fase gaseosa a fin de confirmar la identidad de los picos (Lee et. al. 1976; Hertel et. al. 1998 )

### **2.1.2. Fuentes de exposición humana y ambiental**

Es poca la información disponible acerca de la producción y elaboración de HAPs, pero es posible que solo se desprendan pequeñas cantidades como resultado directo de algunas actividades. Los HAPs que se encuentran se utilizan sobre todo como productos intermedios en la producción de cloruro de polivinilo y de agentes plastificantes (naftaleno), pigmentos (acenafteno, pireno), tintes (antraceno, fluoranteno) y plaguicidas (fenantreno).

Las mayores emisiones de HAPs se derivan de la combustión incompleta de materia orgánica durante procesos industriales y en otras actividades humanas, en particular:

- Elaboración de carbón, de petróleo crudo y de gas natural, incluida la coquificación de carbono, el refinado de petróleo y la producción de negro de humo, de creosota, de alquitrán de hulla y de betún.
- Calefacción en centrales de energía y en residencias y cocinado.
- Combustión de basura.
- Tráfico de vehículos de motor.
- Humo de tabaco en el medio ambiente.
- Producción de aluminio (principalmente en ánodos especiales de carbono), de hierro y de acero y los aglutinantes utilizados en la arena de moldeo de las fundiciones.

En cocinas y calefacción de viviendas: Los principales componentes que se emiten son fenantreno, fluoranteno, pireno, y criseno. Las emisiones de los hornillos de leña son 25-1000 veces superiores a las que se producen en los de carbón. En las zonas donde predomina el uso de leña en las viviendas, la mayor proporción de HAPs en suspensiones pueden derivarse de esta fuente, especialmente en invierno. Por consiguiente, se supone que la liberación de HAPs en la calefacción de las viviendas es una fuente importante en los países en desarrollo, donde con frecuencia se quema biomasa en hornillos relativamente simples <sup>(WHO 1987)</sup>.

Cocinado: Pueden emitirse HAPs durante la combustión incompleta de combustibles, del aceite de cocina y de los alimentos que se cocinan.

Tráfico de vehículos de motor: Los principales compuestos que se liberan de los vehículos de gasolina son el fluoranteno y el pireno, mientras que en los gases de escape de los vehículos de motor de diésel abundan el naftaleno y el acenafteno. Aunque los motores de gasolina emiten una proporción elevada de ciclopentapireno, su concentración en los gases de escape de los motores diésel está apenas por encima del límite de detección. Las tasas de emisión, que dependen de la sustancia, el tipo de vehículo, estado del motor y las condiciones de prueba, oscilan entre unos pocos nanogramos por kilómetro y  $>1000\text{mg/Km}$ . Las emisiones de HAPs de los vehículos de motor se reducen enormemente con la instalación de catalizadores.

Incendios forestales: En los países con grandes superficies forestales, los incendios pueden contribuir de manera importante a las emisiones de HAPs.

Centrales eléctricas de carbón: Los HAPs que se liberan en la atmósfera a partir de dichas centrales son sobre todo compuestos de dos o tres anillos. En las zonas contaminadas, los niveles de HAPs en el aire pueden ser más elevados que los de los gases de chimenea.

Incineración de basura: Las emisiones de HAPs en los gases procedentes de este tipo de incineración fueron en varios países  $<10\text{mg}/\text{m}^3$  (WHO 1987).

### 2.1.3. Niveles ambientales y exposición humana

Los HAPs, especialmente los de mayor peso molecular, cuando se incorporan al medio ambiente a través de la atmósfera se adsorben en las partículas en suspensión. La hidrosfera y geósfera se ven afectadas de manera secundaria por la disposición húmeda y seca. La madera conservada con creosota es otra fuente de liberación de HAPs en la hidrosfera, y la disposición de desechos contaminados, como fangos de alcantarillado y cenizas en suspensión, contribuye a las emisiones de HAPs en la geósfera. Hay poca información acerca del paso de HAPs en la biosfera. Hay HAPs presentes naturalmente en la turba, el lignito, el carbón y el petróleo crudo. La mayoría de los HAPs de las antracitas están fuertemente unidos a la estructura del carbono y no se pueden lixiviar.

La liberación de HAPs en el medio ambiente se ha determinado mediante la identificación de un perfil característico de su concentración, pero esto sólo ha sido posible en un pequeño número de casos. Con frecuencia se ha utilizado el benzo [a]pireno como indicador de HAPs, especialmente en estudios más antiguos. En general, las emisiones de HAPs son solamente estimaciones basadas en datos más o menos fidedignos y apenas dan una idea general de la exposición. (Hertel et. al., 1998).

## **2.2. Los HAPs están omnipresentes en el medio ambiente.**

### **2.2.1. Aire.**

Los niveles de cada uno de los HAPs tienden a ser más elevados en invierno que en el verano por lo menos en un orden de magnitud. La fuente predominante durante el invierno es la calefacción de las viviendas y de verano el tráfico urbano de vehículos de motor. Se detectaron concentraciones medias de distintos HAPs de 1-3 ng/m<sup>3</sup> en la atmósfera de diversas zonas urbanas. En túneles de carretera se han detectado concentraciones de hasta 1-50 ng/m<sup>3</sup>. En una estación del metro se midieron concentraciones de HAPs de hasta 20 ng/m<sup>3</sup>. En las cercanías de fuentes industriales, las concentraciones medias de los distintos HAPs oscilaban entre 1 y 10 ng/m<sup>3</sup>, había fenantreno presente hasta un máximo aproximado de 310 ng/m<sup>3</sup> en esa misma zona <sup>(Knecht et al., 1986)</sup>.

### **2.2.2. Agua superficial y precipitación**

La mayor parte de los presentes en el agua proceden al parecer del agua escorrentía urbana, de la precipitación atmosférica (partículas más pequeñas) y de la abrasión del asfalto (partículas mayores). La principal fuente de HAPs, sin embargo, varía para distintas masas de agua. En general, La mayoría de las muestras de agua superficial contienen distintos HAPs en concentraciones de hasta 50 ng/litro, pero los ríos muy contaminados tenían concentraciones de hasta 6000 ng/litro. Los niveles de HAPs en el agua freática son del orden de 0.02-1.8 ng/litro, y las muestras de agua potable contienen concentraciones del mismo orden de magnitud. Las principales fuentes de los HAPs presentes en agua potable son los depósitos y las tuberías con revestimiento de asfalto.

Los niveles de HAPs por separado en el agua de lluvia oscilan entre 10 y 200 ng/litro, mientras que en la nieve y la niebla se han detectado concentraciones de hasta 1000 ng/ litro <sup>(Smith et al., 1981)</sup>.

### 2.2.3. Sedimentos

Las concentraciones de los distintos HAPs en los sedimentos son por lo general un orden de magnitud superior a las presentes en la precipitación (Liem et al., 1992).

### 2.2.4. Suelo

Las principales fuentes de los HAPs presentes en el suelo son la deposición atmosférica, la carbonización de material vegetal y la deposición a partir de aguas residuales y desechos en partículas. El grado de contaminación del suelo depende de factores como su cultivo, su porosidad y su contenido de sustancias húmicas. Cerca de fuentes industriales se han encontrado concentraciones de distintos HAPs de hasta 1g/kg de suelo. En zonas no contaminadas, los niveles de HAPs eran de 5-100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de suelo.

### 2.2.5. Alimentos

Los alimentos crudos no suelen contener niveles elevados de HAPs, pero se forman al elaborarlos, asarlos o cocerlos en horno o freírlos. Las hortalizas pueden contaminarse con la deposición de partículas de la atmósfera o por el crecimiento en suelo contaminado. La concentración de los distintos HAPs en la carne, el pescado, los productos lácteos, las frutas y hortalizas, los cereales y sus productos, los dulces, las bebidas y las grasas, los aceites minerales y vegetales son del orden de 0.01-10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en carne ahumada y de hasta 86 $\mu\text{g}/\text{kg}$  en pescado ahumado; los cereales ahumados contienen hasta 160  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . En el aceite de coco se han encontrado concentraciones de hasta 460  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Los niveles en la leche materna humana son de 0.003-0.03  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Dennis et al., 1991).

### **2.2.6. Organismos acuáticos**

Se sabe que los organismos marinos adsorben y acumulan HAPs del agua. El grado de contaminación depende de los movimientos de transporte marítimo. Se han detectado concentraciones de HAPs de hasta 7 mg/kg en organismos acuáticos que vivían cerca de efluentes industriales, y los niveles medios de HAPs en los animales acuáticos muestreados en lugares contaminados fueron de 10–500 µg/kg, aunque también se detectaron niveles de hasta 5 mg /kg.

Los niveles medios de HAPs en animales acuáticos muestreados en diversos lugares fueron de 1-100 µg/kg, pero se encontraron concentraciones de hasta 1 mg/kg, por ejemplo en langosta en Canadá.

### **2.2.7. Organismos terrestres.**

Las concentraciones de HAPs en insectos oscilan entre 730 y 5500 µg/kg. El contenido de las heces de las lombrices de tierra depende considerablemente del lugar, las de una región muy industrializada de Alemania oriental contienen concentraciones de benzo[a]pireno de hasta 2mg/kg (Dickerson et al. 1994; Antón et.al, 2001).

### **2.2.8. La población general**

Las principales fuentes de exposición no profesional son las siguiente: atmósfera contaminada, humo de fuegos abiertos y del cocinado, humo del tabaco en el medio ambiente, alimentos, agua potable y suelos contaminados y utilización de productos contaminados. Pueden encontrarse HAPs en el aire de espacios cerrados como consecuencia de la calefacción de viviendas y del humo del tabaco del medio ambiente en concentraciones medias de 1-100 ng/m<sup>3</sup>, con un máximo de 2300 ng/m<sup>3</sup>.

Se ha estimado que la ingesta de distintos HAPs con los alimentos es de 0.10-10  $\mu\text{g}/\text{día}$  por persona. La ingesta diaria total de benzo[a]pireno con el agua potable es 0.0002  $\mu\text{g}/\text{persona}$ . Los cereales y productos derivados son los que más contribuyen a la ingesta de HAPs con los alimentos, por ser el principal componente de la alimentación total (Antón et.al, 2001).

### **2.2.9. Exposición profesional.**

Cerca de una batería de hornos de coque, los niveles de benzo[a]pireno oscilan entre  $<0.1$  y  $100\text{-}200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Con un máximo aproximado de  $4000\mu\text{g}/\text{m}^3$ . En los sistemas modernos de gasificación del carbón la concentración de HAPs suele ser  $<1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  con un máximo de  $30 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Las muestras personales tomadas de operadores de equipo de refinería de petróleo mostraron una exposición a  $2.6\text{-}470 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . En muestras de aire tomadas cerca de instalaciones de elaboración de asfalto en refinerías, los niveles totales de HAPs fueron de  $0.004\text{-}50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . En las proximidades de obras de pavimentación de carreteras, las concentraciones totales de HAPs en muestras personales de aire eran de hasta  $19 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , con un valor medio en las muestras de aire de la zona de  $0.13 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Los niveles de HAPs en las muestras personales de aire tomadas en una fundición de aluminio eran de  $0.05\text{-}9.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , pero las muestras de orina de los trabajadores de una fábrica de aluminio contenían niveles muy bajos. Las muestras de aire de la zona contenían concentraciones de HAPs de hasta  $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$  y  $4\text{-}530 \mu\text{g}/\text{m}^3$  en minas de cobre. Las concentraciones de HAPs en humos de cocinado de una fábrica de productos alimenticios oscilaban entre  $0.07$  y  $26 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (IARC 1983, 1984).

### **2.2.10. Toxicidad de los HAPs**

La principal característica que presentan estos compuestos sobre la salud, es su capacidad producir cáncer en los organismos expuestos; ciertos HAPs tienen

una fuerte actividad carcinogénica, particularmente benzo antraceno en animales y benzo(a) pireno en humanos. Con otros sin embargo no existe tal evidencia y por ello no están clasificados. Es muy importante señalar la consideración que se tiene de que todos los HAPs en general son sospechosos de ser carcinogénicos en un grado u otro, aunque el nivel sea muy bajo.

El proceso de inducción de cáncer en mamíferos producido por los HAPs, involucra un grupo de enzimas que son capaces de convertir los compuestos xenobióticos lipofílicos (incluidos los HAPs) en productos solubles en agua. Este tipo de enzimas son las "Mixes Function Oxidasas" (MFO) que pertenecen al grupo citocromo P450. Este sistema enzimático es estimulado dentro de un organismo por exposición a compuestos lipofílicos persistentes. Repetidas exposiciones a estos compuestos dan como resultado la inducción de cantidades incrementadas de enzimas. La capacidad de inducción de esas enzimas depende de cada organismo. Los mamíferos, p.e., tienen una gran capacidad inductiva, y como resultado una buena capacidad de degradación de compuestos lipofílicos persistentes. Otros sin embargo, como los peces, tienen una capacidad muy limitada de inducción de MFO, y por tanto una capacidad limitada de degradación.

El proceso de transformación de compuestos lipofílicos a compuestos solubles en agua, suponen la inserción de un átomo de oxígeno en la estructura del compuesto en forma de epóxido, con la consiguiente hidrólisis que lo transforma en didiol epóxido. Esta es la forma en que los HAPs son capaces de unirse a sitios específicos en el DNA y en hemoglobina y tienen la capacidad de causar la formación de un tumor. Hay que tener en cuenta, que esta última reacción de transformación puede llevar más o menos tiempo y que es un mecanismo que no se conoce con profundidad.

Los efectos tóxicos que tienen los HAPs sobre los organismos acuáticos vienen reflejados en la tabla No 1 en función de la  $LC_{50}$ . Está comprobado que la toxicidad aumenta al aumentar el peso molecular y el carácter lipofílico del compuesto, y que los organismos acuáticos son los más afectados. Un hecho

adicional comprobado es que la radiación solar elevada aumenta significativamente la toxicidad en organismos acuáticos. Se cree que es debido a la foto activación de las moléculas de HAPs presentes, y que no existe metabolismo o forma de degradación de los mismos.

**Tabla 1. Efectos tóxicos de los HAPs sobre organismos acuáticos** (Antón et al., 2001)

HAPs	Organismos	LC <sub>50</sub> (96hr) ( mg/L)
Naftaleno	Peces	0.1-0.8
	Crustáceos	1.0-2.4
Acenafteno	Peces	0.6-0.3
Fenantreno	Peces	0.04-0.6
Benzo[a]pireno	Peces	<0.024

Existe una amplia información sobre los efectos crónicos de HAPs en organismos acuáticos tanto en sistemas naturales como en ensayo de laboratorio. Generalmente, exposición a niveles de HAPs subletales, producen desarrollos morfológicos y fisiológicos anormales, así como efectos en la reproducción (menor número de nacimientos y alteraciones de larvas).

Referente a efectos mutagénicos y carcinogénicos, se ha demostrado que el benzo[a]pireno induce aberraciones microsomales en los peces, así como estos compuestos en general provocan hiperplasia y neoplasia epidermal. Algunas especies han desarrollado cáncer de hígado tras exposiciones a HAPs (Antón et al., 2001).

### 2.2.10. Normatividad de los HAPs

El riesgo que presentan los HAPs para la salud humana ha comenzado a ser considerado por la legislación en distintos ámbitos. Así, la Directiva 2000/76/CE (Comunidad Europea) del 4 de diciembre del 2000 sobre la incineración de residuos, obliga a los estados Miembros a establecer los límites máximos de emisión de HAPs sobre las bases de las recomendaciones de la OMS y la AIRC.

Se encuentran legislados los valores límite en aguas potables en un máximo de 0.2  $\mu\text{g/L}$  de HAP totales (RD 1138/1990). Actualmente, los HAPs se encuentran considerados en la propuesta de Dirección de Parlamento y el Consejo Español por la que establecen las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, basándose en los riesgos para el sistema acuático, la bioacumulación y la salud humana a través del medio acuático.

Los criterios establecidos para el control de calidad del suelo desarrollados en Cataluña o en Honduras contemplan, entre otros contaminantes, los máximos de HAPs para que los suelos sean clasificados como aptos o no aptos para su uso (según sea industrial o residencial), así como para determinar la calidad de las aguas subterráneas. Los niveles máximos para que un suelo destinado a uso no industrial no se considere contaminado por HAPs varían según el compuesto, desde valores de 0.8  $\mu\text{g/g}$  de m.s. (masa de suelo) para el benzo(a)pireno, hasta 100 $\mu\text{g/g}$  de m.s. para el antraceno.

Por otro lado, tras haberse encontrado en diversos estudios la absorción dérmica de los HAPs pudiendo producir carcinogénesis dérmica o sistémica, se prohíbe mediante la Directiva 97/45/CE de España, el uso de alquitranes de hulla brutos y refinados en los productos cosméticos. Existe así mismo normatividad acerca de las exposiciones laborales a estos compuestos, estando en España legisladas a través de RD665/1997, en el que se establecen los valores límites admisibles. El Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en del Trabajo (INST) cataloga algunos de estos compuestos como benzo(a)pireno, como mutagénico y teratogénico.

En cuanto a normatividad existente sobre niveles máximos contenidos en alimentos, hasta el momento no existe legislación alguna a nivel nacional y europeo. A pesar de ello, cabe esperar que a partir de estudios llevados a cabo en zonas donde la acumulación de HAPs en el medio acuático es considerable, y teniendo en cuenta la bioacumulación a lo largo de la cadena alimentaria de estos compuestos, en un futuro pueda comenzar a considerarse la reglamentación en este terreno. De hecho en varios países ya existe el nivel máximo recomendado de  $1\mu\text{g}/\text{kg}$  de benzo(a)pireno en alimentos, especialmente en productos humanos <sup>(Antón et. al, 2001)</sup>.

## 2.3. La Piel

La salud, o enfermedad, la raza, el estado de ánimo, el clima, o cualquier otra manifestación, queda reflejada de un modo u otro en la piel, de manera que es un valioso vehículo de información con respecto de unas personas a otras. La ciencia médica ha definido la piel como el tegumento (del latín tegumentum, o "lo que cubre"), que recubre el organismo, y que tiene como límite los orificios naturales, en donde se prolonga con las diferentes mucosas. Esta delimitación aparece prácticamente sin transición, y la brusca diferencia de aspecto exterior entre piel y mucosa, se debe a una diferencia estructural.

La piel es la cubierta exterior que reviste todo el cuerpo, no es como se cree una simple envoltura inerte, sino un órgano completo anatómico y funcional ligado a la fisiología y patología de todo el organismo.

La extensión del órgano cutáneo es variable según la talla y la complejión del individuo, una persona de 70 kg que mide 1.70 m está cubierta por 1.85 m<sup>2</sup> de piel, con un volumen de 4000 cc, 2.2mm de espesor como promedio. Su peso es de 4.200 kg que equivale al 6% de peso corporal, más del doble que el cerebro y el hígado. Contiene 1.800 cc de sangre, un 30% de la sangre total del organismo. Es pues el órgano más extenso y de mayor peso y volumen <sup>(Amado et al., 1979)</sup>.

### 2.3.1. Complejidad de la piel

Un cm<sup>2</sup> de piel posee 5 folículos pilosos, 15 glándulas sebáceas, 100 sudoríparas, 4 metros de nervios, y un metro de vasos, 5000 organelos sensitivos y seis millones de células <sup>(Amado et al., 1979)</sup>.

### 2.3.2. Variaciones de la piel

Así como el color varía según la topografía, también hay variaciones de textura, grosor y espesor de la piel, en los párpados es muy delgada y muy fina en cambio en las palmas y sobre todo en las plantas es muy gruesa y áspera. También hay variaciones con respecto al sexo y a la edad. En la mujer la piel es muy fina y tersa con vello delgado; en el hombre es más gruesa, áspera y cubierta de vello más grueso y abundante (Amado et al., 1979).

### 2.3.3. Composición

La piel presenta diferentes capas fundamentales: Estratos epicutaneos, Epidermis, Dermis e Hipodermis (figura 2) (Rodríguez, 1998).

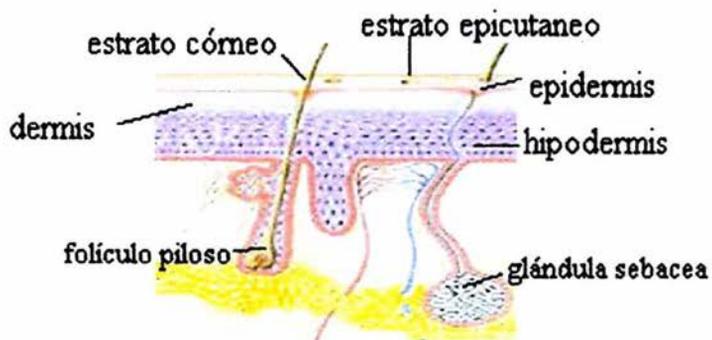


Figura 2. Composición de la piel (Rodríguez, 1998).

### **2.3.3.1. Estratos epicutáneos.**

Está formado por dos capas: manto gaseoso y manto ácido que forman un conjunto de micro atmósfera que rodea la piel del individuo y la pone en contacto con el medio exterior.

El manto gaseoso está formado por una capa de aire más caliente, con más contenido de CO<sub>2</sub> y vapor de agua resultante de la evaporación del sudor.

El manto ácido es una emulsión formada por la secreción sudoral y sebácea, dando origen a dos fases: agua en aceite cuando es más abundante la grasa y aceite en agua cuando es más abundante el agua.

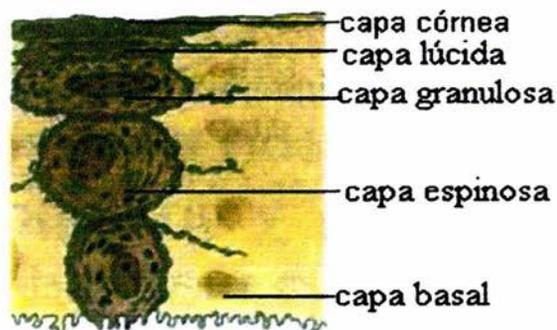
El manto ácido da a la epidermis, su acidez, su pH es de 5.5, mientras que la dermis es alcalina con un pH de 7.0 a 7.2. En la acidez de la epidermis influye el CO<sub>2</sub> y los aminoácidos. Las axilas, regiones genitales, oídos, palmas y plantas de los pies son menos ácidos (ventanas alcalinas). El manto ácido es una importante defensa contra gérmenes y hongos. La inflamación alcaliniza la piel <sup>(Amado et al., 1979)</sup>.

### **2.3.3.2. Epidermis**

Se compone de una parte superficial o córnea, y es la "fachada de revestimiento", y otra subyacente de gran valor biológico, ya que esta capa interviene en la formación de elementos nuevos y en la determinación del color de la piel.

Está constituida por varias capas de células que forman en conjunto un epitelio poli-estratificado. Todas las células proceden de una sola hilera de células llamadas individualmente queratinocitos que van a originar, por sus divisiones a todos los demás, terminando con la muerte de la célula, llena de queratina. Esta última capa se desecha renovándose continuamente, este proceso se llama queratopoyesis y tiene una duración promedio de 21 días <sup>(Ross, 1980)</sup>.

Las capas de la epidermis de acuerdo a la figura 3 son:



**Figura 3. Estructura microscópica de la epidermis** (Rodríguez, 1998)

1. **Estructura basal o estrato germinativo.** Es una sola hilera de células cilíndricas de núcleos muy basófilos dispuestas perpendicularmente a la dermis, con mitosis frecuentes y que están en constante reproducción. De trecho en trecho se notan células más claras de Masson o melanocitos formadores del pigmento de la piel o melanina. Se acepta que estas células que provienen de la cresta neutra, son verdaderas células dendríticas que emigraron a la piel durante la vida embrionaria.
2. **Estrato espinoso de Malpighi.** Está formado por varias hileras de células poliédricas dispuestas en mosaico y que tienen como característica especial la presencia entre ellas de "puentes" que unen a una célula con otra dando cohesión a la epidermis pero dejando suficiente espacio entre las células para la circulación de la linfa que las nutre. Estos puentes parecen estar formados por

prolongaciones citoplasmáticas, y según algunos autores, reforzados por tonofibrillas que en su centro se condensan para formar los nódulos de Bissozero cuyo significado se desconoce.

3. **Estrato granuloso.** A medida que se acercan a la superficie las células se aplanan y empiezan a presentar en su interior unos gránulos de color azul oscuro que están formados del precursor de la queratina, la queratohialina, y se forma el estrato granuloso apenas de una o dos hileras de estas células. En la actualidad se sabe que los gránulos están constituidos por ADN y proceden de la cromatina nuclear. El estrato granuloso es la capa más superficial de la porción no queratinizada de la epidermis. Esta capa varía en su espesor entre una y unas pocas células de espesor. Las células contienen abundantes gránulos de queratohialina, que le dan el nombre a la capa. Los gránulos contienen proteínas ricas en histidina y cistina. Los gránulos de queratohialina tienen tamaño variable y se ven fácilmente en cortes histológicos de rutina debido a la intensa coloración basófila.
4. **Estrato lúcido.** Algunos histólogos consideran al estrato lúcido como una subdivisión del estrato córneo, solo se encuentra en la piel gruesa. Con el microscopio óptico suele presentar un aspecto refrigerante y se colorea poco. Esta capa muy refringente contiene células eosinófilas en las cuales está muy avanzado el proceso de queratinización. El núcleo y los organelos citoplasmáticos se degradan y desaparecen a medida que la célula se llena gradualmente con la proteína intracelular queratina.
5. **Estrato córneo.** Está formado por hileras de células muertas, aplanadas sin núcleos y llenas de una sustancia llamada queratina blanda, se observan así varias hileras de laminillas puestas unas sobre otras. Por lo general hay una abrupta transición entre las células nucleadas del estrato granuloso y las células anucleadas del estrato córneo. La membrana plasmática de estas células

queratinizadas cornificadas está engrosada y cubierta, al menos en las porciones más profundas de la capa, por un glucolípido que representa el principal constituyente de la barrera contra la pérdida de agua de la epidermis. El estrato córneo es la capa más variable en su espesor desde 0.02mm hasta 0.5mm en las plantas de los pies y en la piel gruesa, esta capa cornificada se hace más gruesa en los sitios que son objeto de mayor fricción, como la formación de callos en las palmas de las manos y en los extremos de los dedos (Amado, 1979; Ross, 1980).

### **2.3.3.3. Unión dermoepidérmica**

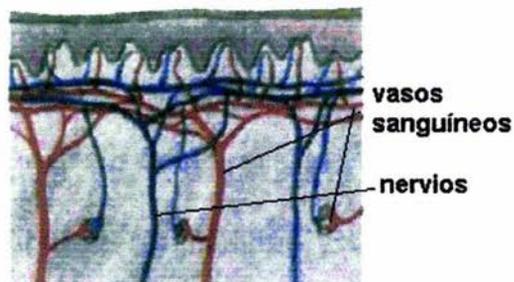
Con tintaciones especiales es factible ver bajo el estrato basal, una membrana de grosor variable, heterogénea que por su cara superficial se deja hundir por prolongaciones de las células basales y por su cara profunda sirve de sostén y fijación a las fibras elásticas de la dermis. Esta membrana da cohesión a la unión entre la dermis y la epidermis (Smith, 1996).

### **2.3.3.4. Dermis**

También llamada el armazón o sustento de la piel. Presenta igualmente dos capas, el cuerpo papilar y el corion o dermis propiamente dicha. El corion, como todo tejido de sostenimiento, tiene una estructura resistente, formada por una especie de argamasa con haces y fibrillas entrecruzadas. En este entramado se encuentran elementos tan importantes como el colágeno y la elastina. En la dermis se reconocen dos capas con estructuras diferentes: La capa papilar y la capa reticular.

Capa papilar, más superficial, consiste en tejido conectivo laxo ubicado inmediatamente por debajo de la epidermis. Las fibras colágenas localizadas en esta parte de la dermis no son tan gruesas como las de la protección más profunda. De modo similar, las fibras elásticas son aquí filiformes y forman un reticulado

irregular, la capa papilar es relativamente fina e incluye la sustancia de las papilas y las crestas dérmicas. Contiene vasos sanguíneos que irrigan pero no penetran en la epidermis, también contienen prolongaciones nerviosas, algunas de las cuales finalizan en la dermis y otras perforan la lámina basal y entran en el compartimiento epitelial. Los vasos sanguíneos y las terminaciones nerviosas sensoriales están muy concentrados, por lo que son bien visibles en las papilas dérmicas (figura 4) (Smith, 1996).



**Figura 4. Vascularización de la piel** (Rodríguez, 1998).

Capa reticular subyacente a la capa papilar; su espesor varía en las distintas partes de la superficie corporal, pero siempre es considerada más gruesa y menos celular que la capa papilar. Se caracteriza por presentar haces gruesos e irregulares de colágeno y por la presencia de fibras elásticas más gruesas. Las fibras colágenas y elásticas no tienen una orientación aleatoria, sino que forman líneas regulares de tensión en la piel, denominadas líneas de Langer. Las incisiones cutáneas paralelas a las líneas de Langer curan con cicatrices mínimas (Ross, 1980).

### **2.3.3.5. Hipodermis**

Capa más interior, bajo la dermis. Separa y aísla los tegumentos de las partes subyacentes. Por debajo de la dermis reticular hay una capa de tejido adiposo, el panículo adiposo de espesor variable. Es un importante sitio de almacenamiento de energía y también sirve como capa aislante, es mas gruesa en personas que viven en climas muy fríos. Esta capa y el tejido conectivo laxo asociado constituyen la hipodermis o tejido subcutáneo. Aquí se originan unas células musculares lisas aisladas o pequeños haces de músculo liso, que forman los músculos erectores del pelo y conectan las partes más profundas de los folículos pilosos con la dermis superficial. Por debajo del panículo adiposo de muchos animales hay una fina capa de músculo estriado, el panículo carnoso, en humanos es apenas un vestigio, pero está bien definido en la piel del cuello, la cara y el cráneo, donde constituye el plastisma y los músculos de la expresión facial.

En estas tres capas, se implantan los elementos que forman parte de la piel, conformándola como un todo <sup>(Holbrook et al., 1987)</sup>.

## **2.3.4. Accesorios de la piel**

### **2.3.4.1. Pelo**

Presenta dos partes, una raíz o folículo piloso, y el tallo o pelo propiamente dicho, que es la parte externa o visible. Las células de la raíz se dividen sin cesar y es lo que contribuye al crecimiento del pelo.

La raíz está provista de un músculo erector del pelo, u horripilador, y que será lo que levante el pelo en el fenómeno conocido como "carne de gallina". No es ocioso observar aquí cómo la anatomía descriptiva es tan gráfica, llamando "músculo horripilador" a lo que efectivamente nos pone carne de gallina <sup>(Bloom, 1987)</sup>.

#### **2.3.4.2. Uñas**

Son láminas corneas semitransparentes, y proceden del endurecimiento de la capa superficial de la epidermis. La uña queda incrustada en la dermis y verifica su crecimiento desde detrás hacia delante. El extremo libre avanza constantemente (Amado, 1998).

#### **2.3.4.3. Glándulas sudoríparas**

Están extendidas por toda la superficie corporal, siendo más abundantes en la palma de las manos, las plantas de los pies y las axilas. La parte más significativa, la que segrega el sudor, queda alojada en la dermis y se denomina glomérulo; su tubo secretor atraviesa la piel, abriéndose paso hasta el orificio externo que son los poros.

Es curioso saber que los antiguos anatomistas sólo conocían este orificio exterior o poro, y que la glándula en sí misma no fue descubierta y descrita hasta mediados del siglo XIX (Rodríguez, 1998).

#### **2.3.4.4. Glándulas sebáceas**

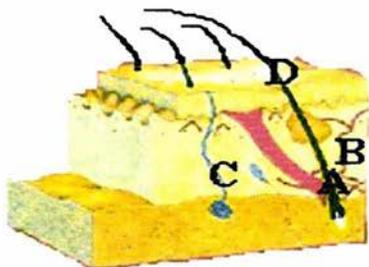
Mientras que las glándulas sudoríparas son subdérmicas, las sebáceas se alojan más superficialmente, en la parte superior de la dermis, y su tamaño es proporcionalmente inverso al pelo con el que se anexiona.

Su misión consiste en segregar grasa o sebo, de modo que lubrica la piel e impide que ésta se reseque.

La secreción sebácea se inicia en la infancia, aumentando durante la pubertad; alcanza su máximo nivel en el adulto y disminuye progresivamente con el

paso de los años, siendo pues responsable del aspecto apergaminado de la ancianidad.

Estas glándulas están muy desarrolladas en los animales mamíferos, y en ellos poseen secreciones muy olorosas, ya que este olor juega un importante papel defensivo (figura 5) (Ross et al, 1980).



**Figura 5. Accesorios de la piel A) Folículo piloso, B) Glándula sebácea, C) Glándula sudorípara y D) Pelo.** (Rodríguez, 1998).

#### **2.3.4.5. Factores de la piel**

Por otra parte, la piel presenta elementos de gran influencia en el aspecto exterior, por cuanto que informa de cualidades determinantes, tales como la raza, el sexo, la edad, la salud, la enfermedad, el clima en donde se vive, e incluso, como ya se ha indicado, los estados de ánimo. El color es una de las cualidades más importantes, aún hablando de una misma raza, ya que hay diferencias notables

según la zona del cuerpo que se examine, según la edad, pues la piel al envejecer presenta un tono grisáceo, según las zonas climáticas, y un factor de disposición individual ante estos elementos. Podemos decir que la piel es un testigo de excepción, y un fiel informador de cuanto acontece en el discurrir de la vida y sus condiciones. Tres son los factores más importantes:

**A) Factor pigmentario:** Característica diferencial que más destaca entre las diversas razas humanas. En la raza negra la piel varía desde el tono amarronado (color carmelita), hasta el negro intenso, siendo más clara en la palma de las manos y las plantas de los pies. La raza amarilla varía desde el tono oliváceo hasta el amarillo pálido, y con respecto a la raza blanca, también las oscilaciones son importantes, desde la palidez hasta las pieles mates o morenas.

**B) Factor sanguíneo:** Por modificaciones en la fórmula sanguínea de glóbulos rojos y blancos, o bien por aumento o disminución de la hemoglobina (sustancia colorante de la sangre), la piel presenta un rojo vivo si el número de glóbulos rojos es muy abundante, pálido si se registra disminución de estos y aumento de los blancos, amoratado si se presenta una importante baja en el número de glóbulos blancos, y también un tono peculiar y muy distinto del original, si la sangre transporta elementos colorantes, como por ejemplo pigmentos biliares, que dan a la piel blanca un color amarillo muy llamativo.

**C) Factor vascular:** La vasoconstricción de los vasos sanguíneos determina en la piel un aspecto pálido, la vaso dilatación por el contrario le confiere un matiz rojizo, y azul violáceo en el caso de asfixia o éxtasis (Bloom, 1987; Amado, 1998).

### **2.3.5. Sentido del tacto**

El sentido del tacto es la más representativa de las funciones de la piel. Toda su superficie es apta para captar las impresiones que proceden del medio exterior, apreciando la forma, consistencia, y temperatura de los objetos que tocamos. Esta transmisión también se da sin contacto, lo mismo que si nuestros tegumentos estuviesen influidos por radiaciones (¿quizás el pelo?). En este sentido, algunos autores han experimentado con un gato, al que se le hayan vendado los ojos, y que se orienta perfectamente, pero al mismo animal, si se le suprimen los pelos del bigote, pierde el sentido de la orientación y choca contra cualquier obstáculo.

En la piel, los nervios tienen una considerable importancia, y se ha definido como una inmensa terminación nerviosa desplegada. Por otra parte, en la superficie cutánea, existen zonas "especializadas" en las distintas sensaciones, y así los dedos están dotados de una sensibilidad extrema, mientras que las mejillas tienen una clara percepción calorífica. Precisamente los dedos, con los surcos de su cara pulpar (crestas papilares), y diferentes en cada individuo, constituyen un medio legal de identificación (huellas digitales) (Bronaugh et al., 1999).

### **2.3.6. Función protectora**

La condición de la piel, externa y visible, la convierte en protectora de los órganos internos, y en un amortiguador de las agresiones y presiones exteriores (un objeto contundente resbala sobre la piel), si bien, cuando se efectúa un frotamiento continuo sobre la misma zona, la epidermis se endurece, formando unas callosidades protectoras más gruesas y resistentes (los vulgarmente llamados "callos").

Opone un verdadero obstáculo, tanto mecánico como bioquímico, contra la penetración de los líquidos; el agua no consigue penetrar por los poros ni los orificios de las glándulas, y así podemos mantenernos durante largo tiempo

sumergidos en un baño, sin que la piel pierda por ello su cualidad de impermeable (a pesar del contacto continuo con el agua, el interior del organismo no se "moja"). Permite sin embargo la absorción de variadas sustancias, y el ejemplo más claro lo constituyen los cuerpos grasos, cuya penetración se ve favorecida, si se le añade el efecto mecánico de fricciones o masajes <sup>(Bloom, 1987; Amado, 1998)</sup>.

Otra de las funciones, se refiere a la pantalla que la piel supone contra la acción del sol, si bien se deja penetrar en diferente medida por las diversas radiaciones.

La temperatura del cuerpo se mantiene constante, en las condiciones que sean, lo mismo si una persona navega por zonas polares, o por un caluroso desierto. Esto es debido a la intervención de la piel en la regulación térmica del organismo, y así, tanto la superficie de la piel, como el vello o los pelos y plumas en los animales, mantienen una temperatura constante, al oponerse a una irradiación excesiva. La capa cornea es la encargada de regular la evaporación del agua.

La misión defensiva, puede ser también agresiva, y la anatomía comparada ofrece numerosos ejemplos de ello, como los cuernos de los bóvidos (mamífero con cuernos óseos cubierto con estuche córneo no caedizos, y que existen tanto en el macho como en la hembra como la cabra y el toro), el pico de las aves o las garras de los felinos. Estos aditamentos defensivos, no son más que una acumulación de queratina o sustancia cornea, presente en la piel en una u otra medida <sup>(Rodríguez, 1998)</sup>.

### **2.3.7. Respiración de la piel**

La respiración de la piel consiste, como en todos los tejidos, en absorción de oxígeno y exhalación de ácido carbónico. Aún cuando la función respiratoria, en los humanos es infinitamente pequeña, es sin embargo necesaria, tal como demuestra el ejemplo de las quemaduras. Un ejemplo muy esclarecedor, y que algunos autores han experimentado, es que si se recubre a una persona, con una capa de barniz,

sería víctima de sofocaciones, disminución en el ritmo cardiaco, baja de la temperatura, y al fin le produciría la muerte.

### **2.3.8. Regulación térmica**

La temperatura del cuerpo se mantiene constante, en las condiciones que sean, lo mismo si una persona navega por zonas polares, o por un caluroso desierto. Esto es debido a la intervención de la piel en la regulación térmica del organismo, y así, tanto la superficie de la piel, como el vello o los pelos y plumas en los animales, mantienen una temperatura constante, al oponerse a una irradiación excesiva. La capa cornea es la encargada de regular la evaporación del agua (Bernard, 1975; Amado, 1998).

### **2.3.9. Funciones secretoras**

#### ***a) Secreción externa***

Un importante papel de la piel lo constituye su misión secretora y depuradora, como es el caso del sudor. Este es un líquido de baja densidad, incoloro, transparente y con un olor muy variable según los individuos. El sudor se elimina por el organismo de forma continua, y la cantidad total en 24 horas oscila entre 600 y 900 gramos, aunque según las condiciones, puede alcanzar cantidades alrededor de 1300 gramos, ante un violento ejercicio por ejemplo. Estas cantidades están pues en relación directa con parámetros tales como la temperatura exterior, el trabajo ejercitado, la cantidad de líquidos ingeridos, y de las reacciones psíquicas, de tal modo que el miedo, la cólera, u otra emoción, motivada por cualquier causa, provoca por lo general sudores fríos, y transpiración abundante en axilas, palmas de las manos y plantas de los pies (Bernard, 1975).

El sudor es un excelente depurador, y gran número de productos de deshecho pueden ser eliminados a través de él, lo mismo que por la orina. La composición del

sudor es fundamentalmente de agua (99%), y mantiene en solución diversas sustancias, como sales minerales, ácidos grasos, fórmicos, acéticos, e incluso urea, como sucede en los casos de insuficiencia renal urémica.

Otra importante secreción de la piel viene dada por las glándulas sebáceas, y así, el sebo elimina los productos de fermentación intestinal de digestión hepática.

Como sustancia oleosa espesa, el sebo contiene en su composición: Agua (31%), epitelio y materias proteicas (62%), grasa, amoniaco y ácidos grasos (4%), y el resto en forma de otros ácidos como el escualeno.

La secreción sebácea está influida por el sistema nervioso, y ello explica que ciertas neuralgias faciales, provoquen una seborrea localizada y abundante. Asimismo es importante la relación de los nervios Simpático y Neumogástrico con la secreción de sebo, ya que por su mediación actúan las hormonas sexuales (acné en la pubertad), hipofisiaria, tiroidea, etc., <sup>(Bernard, 1975)</sup>.

### ***b) Secreción interna***

Se ha considerado la piel como "la más extensa de las glándulas de secreción interna". Los autores antiguos, han insistido sobre el interesante capítulo de la relación entre la piel y los órganos de generación, de tal modo que autorizados autores actuales, la han llamado un órgano sexual accesorio, atendiendo a las influencias recíprocas de la piel y el resto de glándulas, incluidas las sexuales.

La capa cornea ofrece una resistencia, tanto a la corriente eléctrica, como al calor, pero el sudor y la humedad disminuyen llamativamente esta resistencia: Si la piel está seca la resistencia es de aproximadamente 100.000 ohmios, pero apenas alcanza unos miles si está húmeda.

La piel desempeña un papel regulador en el metabolismo del agua, y así, su tejido hipodérmico la retiene cuando los riñones la eliminan mal, dando lugar a la formación de edemas (retención de líquidos con la consiguiente hinchazón de la piel).

Por otra parte, tiene un activo protagonismo en el metabolismo del calcio, potasio, azufre, y otras sustancias de interés, comportándose como lo hace en biología, todo el sistema retículo-endotelial.

### **2.3.10. Defensa inmunológica.**

Es obvio que la piel es el primer obstáculo que el organismo opone contra todos los agentes externos y las contaminaciones del medio ambiente.

Provee incesantemente reservas, que se renuevan para reparar cualquier brecha traumática, y ataques infecciosos o tóxicos, y así detiene, diluye, quema o elimina las sustancias tóxicas.

Un ejemplo claro de este papel defensivo es el escozor (reflejo mecánico para eliminar toxinas o parásitos), y el enrojecimiento cutáneo es una demostración de esta reacción defensiva.

Existe una especie de compensación entre las reacciones defensivas de la piel, y los trastornos internos, como sucede en el eccema y la jaqueca, o la urticaria y el asma.

Si bien el papel de defensa contra cualquier tipo de agresión, lo proporciona la piel, también es cierto que esta no es un tejido inerte, sino un órgano vivo, y por tanto vulnerable, en la misma medida, a cualquier estímulo, por lo que para favorecer que éste papel de defensa, como cualquier función de las estudiadas anteriormente, sea eficaz, es necesario que mantengamos la piel en condiciones óptimas de salud e integridad, que le permita desempeñar su misión (Bernard, 1975; Rodríguez, 1998).

### **2.3.11. Pérdida de agua**

La estructura del estrato corneo es lo más importante para evitar la pérdida excesiva de agua, encontrándose una distribución con dos compartimientos: Uno

caracterizado por células proteínicas llamadas corneocitos, los cuales tienen una alta resistencia a solventes orgánicos, ácidos, álcalis y enzimas, gracias a su alto contenido de filamentos de queratina. Este compartimiento proteico es permeable al agua, por lo cual se hace necesaria la presencia de un segundo compartimiento, la Matriz Lipídica Extracelular, compuesta por esteroides, fosfolípidos, ceramidas, ácidos grasos libres, enzimas como las proteasas, fosfatasa y otras <sup>(Covo, 2000)</sup>.

### **2.3.12. Protección contra agentes tóxicos**

La misma estructura explicada anteriormente, nos protege de la entrada de agentes químicos nocivos. Las sustancias polares se ven forzadas a utilizar la vía Transcelular, la cual es de mayor resistencia, permitiendo solamente la entrada de sustancias de bajo peso molecular y el agua. Las proteínas y polímeros no penetran. Las sustancias no polares definitivamente no pueden utilizar esta vía, por lo cual entran por la vía Intercelular, esta es de menor resistencia, pero luego de atravesarla encuentran la base epidérmica que es de alto contenido de agua y la gran mayoría de estas sustancias no continúan su camino hacia la circulación sistémica, esto facilita que la descamación y el recambio celular eliminen gran parte de estas sustancias <sup>(Soter, 1983)</sup>.

### **2.3.14. Coeficiente de partición**

Siempre que hablamos de toxicología y farmacología cutánea, debemos tener en cuenta el concepto de Coeficiente de partición, pues este es el que al final determina la captación y absorción de medicamentos o sustancias potencialmente dañinas. La absorción de una sustancia está determinada por la diferencia de su solubilidad en el solvente y su solubilidad en el estrato corneo <sup>(Covo, 2000)</sup>.

### 2.3.15. Microorganismos

La protección contra la entrada de microorganismos depende fundamentalmente de la integridad estructural, por lo cual la presencia de pequeñas heridas puede dar lugar a lo que conocemos como una Puerta de Entrada, además de esto se considera que los anexos cutáneos en algunas ocasiones pueden actuar como reservorios de algunos microorganismos. La resequedad relativa del estrato córneo junto con la Descamación y Recambio celulares disminuye muchísimo la adhesión y la proliferación celular en la superficie cutánea. El papel de la Secreción Sebácea todavía es discutido pero se acepta que posee un papel bacteriostático sobre la flora transitoria aunque no sobre la flora residente. La presencia de IgA en esta secreción indiscutiblemente tiene un papel protector.

#### Flora normal

- Coryneiformes: *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Brevibacterium*
- Estafilococos: *Epidermidis*, *Hominis*, *Capitis*.
- El *E. Aureus* no se considera normal
- Bacilos Gram (-) : *Proteus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*
- Hongos: *Malassezia-Pityrosporum*

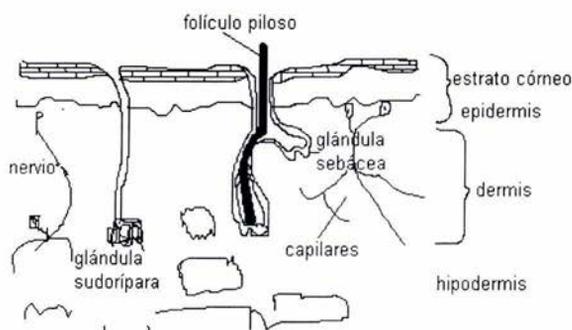
El papel de la oclusión, la humedad y el uso excesivo de detergentes en la alteración de esta flora natural está ampliamente comprobado, por lo cual la tendencia actual es a usar jabones con pH controlado e incluso a utilizar limpiadores suaves en vez de jabones y detergentes <sup>(Soter, 1983; Covo 2000)</sup>.

### **2.3.16. Mecanismos inmunes**

La piel se considera un microambiente inmunológico importante en el organismo, los mecanismos son complejos, pero en especial nos interesa el papel del queratinocito como estimulador de la inmunidad, secretor de citoquinas y coadyuvante en la presentación de antígenos por la célula de Langerhans <sup>(Covo, 2000)</sup>.

## 2.4. Absorción percutánea

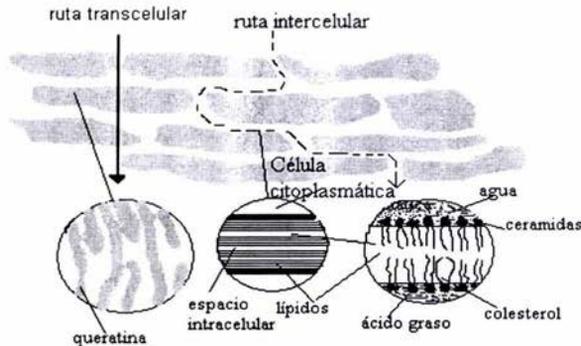
La barrera percutánea de la piel de los mamíferos es principalmente atribuida al estrato córneo. Las propiedades de la barrera están dadas en su contenido y en la composición de los lípidos del estrato córneo y en particular en el arreglo de la estructura de los lípidos de la matriz intercelular y de los lípidos que se encuentran alrededor de las células. Los lípidos forman una bicapa alrededor de los corneocitos produciendo un tipo de “ladrillo y mortero” un modelo en el que los corneocitos son los ladrillos y los lípidos el mortero. Los lípidos intercelulares son principalmente ceramidas, colesterol, colesteryl ésteres, ácidos grasos y una pequeña fracción de sulfato de colesterol (Moser et al., 2001).



**Figura 6. Estructura de la piel** (Moser et al., 2001)

La permeación de sustancias a través de la piel, incluye la difusión a través de la epidermis y a través de los apéndices de la piel: Folículos pilosos y glándulas sudoríparas (ruta folicular y ecrina) que forman un camino a través de la epidermis intacta, sin embargo estos accesorios de la piel ocupan solo el 0.1 % del total de la piel humana y la contribución de estos accesorios es usualmente considerada aunque sean muy pequeños (figura 6). La absorción de sustancias a través de la

piel está limitada por el estrato corneo, se identifican dos caminos que pueden atravesar la barrera: la vía lipídica intercelular entre los corneocitos y la vía transcelular cruzando a través de los corneocitos y de la matriz lipídica (figura 7).



**Figura 7. Rutas de permeación a través del estrato córneo** (Moser et al., 2001).

La absorción percutánea involucra la transferencia de una sustancia, ya sea fármaco, contaminante o cosmético, desde la superficie de la piel hacia el interior del estrato córneo, bajo el amparo de un gradiente de concentración y su difusión por el estrato y la epidermis subyacente, a través de la dermis y hacia la microcirculación. La piel se comporta como una barrera pasiva ante la difusión de las moléculas.

La penetración a través de las diversas regiones de la piel está limitada por las resistencias que se oponen a la difusión. La resistencia difusional total ( $R_{piel}$ ) a la penetración, ha sido descrita como sigue (Remington et al. 1988).

$$R_{piel} = R_{sc} + R_e + R_{pd} \dots \dots \dots Ec. 1$$

R<sub>sc</sub> = resistencia difusional estrato corneo

R<sub>e</sub> = resistencia difusional de epidermis

R<sub>pd</sub> = resistencia difusional de la capa papilar de la dermis.

La mayor resistencia de la penetración es la que opone el estrato corneo, por lo tanto es el factor que limita la absorción percutánea.

El paso de sustancias a través del estrato córneo ocurre por difusión pasiva y obedece a la primera ley de Fick, debido a que cuando se ha establecido un gradiente de concentración lineal existen condiciones en estado estacionario y el flujo por unidad de área (J) de las moléculas a través de la piel es proporcional al gradiente de concentración. El flujo por unidad de área, se expresa de la siguiente manera <sup>(Alberly et al., 1979 Pellett et al., 1997;)</sup>.

$$J = \frac{DK}{h}(C_o - C_i) \dots \dots \dots \text{Ec.2}$$

K = Coeficiente de partición piel-vehículo.

D = Coeficiente de difusión en el estrato córneo.

h = Longitud a través de la cual ocurre la difusión.

C<sub>o</sub>-C<sub>i</sub> = Δc = Gradiente de concentración en el estrato córneo.

C<sub>o</sub> = (μg/cm<sup>3</sup>) es la concentración aplicada en la superficie de la piel y C<sub>i</sub> es la concentración al interior de la piel. Si C<sub>i</sub> es muy pequeña comparada con C<sub>o</sub>, la ecuación 1 se puede simplificar a:

$$J = K_p C_o \dots \dots \dots \text{Ec. 3}$$

Donde Kp (cm/h) es el coeficiente de permeabilidad.

La ecuación de la primera ley de Fick se puede expresar también de la siguiente forma: (Alberty et al., 1979)

$$J = K_p C_o = \frac{dM}{S \cdot dt} \dots\dots\dots \text{Ec. 4}$$

J = flujo ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ )

dM = Cantidad de materia ( $\mu\text{g}$ )

S = área superficial ( $\text{cm}^2$ )

dt = Tiempo

El estrato corneo hidratado tiene la propiedad de ser más afín para todos los compuestos lipofílicos (Moser et al., 2001).

Se ha sugerido que habría que diferenciar entre dos especies de estrato córneo: El de las palmas y las plantas, adaptado para soportar peso y roce y el estrato corneo del cuerpo que proporciona flexibilidad, impermeabilidad y discriminación sensorial.

Estudios recientes sugieren que el orden de la difusión de moléculas simples a través de la piel es el siguiente:

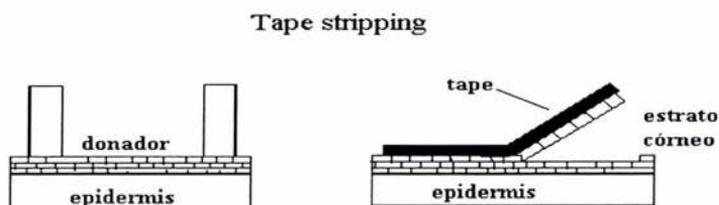
Plantar > palmar > dorso de la mano > escrotal y postauricular > axilar > cuero cabelludo > brazos > piernas > tronco.

La absorción percutánea puede ocurrir por las siguientes rutas:

- A Transcelular
- B. Difusión a través de los canales entre las células
- C. Difusión a través de los conductos sebáceos
- D. Transfolicular
- E. Difusión a través de los conductos sudoríparos.

## 2.5. Técnica del tape stripping

La técnica del tape stripping, es una técnica que ha sido usada en la investigación dermatofarmacológica, esta se aplica removiendo las capas de estrato córneo haciendo uso de una cinta adhesiva (figura 8). La cinta es adherida a la piel al mismo tiempo que se presiona sobre ella y es removida bruscamente. La aplicación de la cinta y la remoción de ella, se puede repetir numerosas veces. Esta técnica se emplea para describir el perfil de penetración de una sustancia. También es utilizada en el estudio de la dermatología ocupacional y en la evaluación de cualidad de la capa córnea (Bronaugh et al., 1999).



**Figura 8. Tape stripping** (Moser et al., 2001).

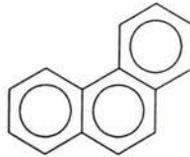
La técnica de tape stripping *in vitro* puede ser, por consiguiente una opción alternativa y es particularmente apropiada para la investigación preliminar de efectos de formulaciones de cualquier tipo en el estrato córneo (Pellett et al., 1997).

Los resultados obtenidos usando piel de animales no pueden ser directamente puestos en correlación con la piel humana pues la piel de animal difiere de la humana en diferentes maneras. La mayoría de la piel animal tiene pelo y el espesor del estrato córneo es más delgado que en el de la piel humana. La piel

animal es más fácil de conseguir y es posible estandarizarla con respecto al sitio, edad y sexo del animal. Una piel de animal poco o nada parecida es una mala opción. La piel de puerco ha sido recomendada porque fisiológicamente es similar a la de humano. La piel de animal puede ser utilizada para evaluar la permeabilidad relativa y comparar resultados *in vivo* e *in vitro* (Sartorelli et al., 2000).

### 3. Propiedades del fenantreno

El fenantreno es un hidrocarburo policíclico aromático de tres ciclos (figura 9), con una fórmula molecular de  $C_{14}H_{10}$  y un peso molecular de 178.2, es incoloro con un punto de fusión de  $100.5^{\circ}C$ , punto de ebullición de  $340^{\circ}C$ , presión de vapor de  $1.6 \times 10^{-2}$  Pa a  $25^{\circ}C$ , densidad de 0.980 coeficiente de partición octanol/agua  $\log K_{ow} = 4.6$ , solubilidad en agua a  $25^{\circ}C$  ( $\mu\text{g/litro}$ ) = 4.6. (Hertel et al., 1998)



**Figura 9. Estructura del fenantreno** (Antón et al., 2001).

## 4. Hipótesis

### Hipótesis

El fenantreno es un hidrocarburo policíclico aromático que tiene la característica de ser lipofílico y de bajo peso molecular, por lo tanto, es una sustancia que potencialmente puede penetrar la barrera de permeación (estrato córneo) de la piel.

## 5. Objetivos

### Objetivos para el trabajo en particular

- Estudiar el grado de penetración del fenantreno contenido en muestras de suelo, a través de piel "ex vivo" mediante la técnica de tape- stripping con el fin de determinar la posibilidad de que este contaminante sea absorbido por vía cutánea.
- Realizar pruebas de penetración a diferentes tiempos de contacto para evaluar si existen diferencias en cuanto a la distancia y cantidad permeada.

### Objetivo general del programa

- Estudiar el pasaje de sustancias (principios activos, excipientes, cosméticos, contaminantes) a través de diferentes membranas biológicas "ex vivo".

### **Objetivos académicos**

- Aprender las técnicas para estudiar la penetración de sustancias exógenas a través de la piel.
- Obtener la capacitación en el manejo del equipo necesario para el estudio.

### **Objetivo social**

- Determinar el grado de absorción del fenantreno en la piel, ya que este y algunos otros hidrocarburos son contaminantes que se encuentran fácilmente en la combustión incompleta de materia orgánica, en colorantes, en productos de petróleo y en algunos plaguicidas, a los que se pueden estar fácilmente expuestos.

## 6. Metodología

### 6.1. Materiales y Reactivos

#### Material

Piel de cerdo fresca (se obtiene directamente del rastro).

Estuche de disección.

Material de vidrio en general.

Celdas de perfusión.

Cinta adhesiva 845 (3M, USA)

#### Reactivos

Alcohol etílico 99.9% (Fermont®, Monterrey N. L. México).

Cloruro de Sodio 100.3 % de pureza (J. T. Baker, Edo. de México).

Agua destilada (MilliQ®, USA).

Grasa de silicón.

Fenantreno (Sigma, USA).

Tierra común obtenida del suelo urbano de la zona de Naucalpan.

#### Equipos

Espectrofotómetro (Cary Varian UV /visible 50 conc., USA).

Balanza analítica (BOECO, Alemania).

Agitador multiplaza (Multi 15 Stirrer Velp® Científica USA).

## **6.2. Obtención de la piel**

Para realizar este trabajo se utilizó piel fresca de cerdo, la cual se obtuvo directamente del rastro. Para evitar su tratamiento con vapor o agua caliente al momento de ser sacrificados, se le pidió a la gente encargada de esta operación que se le hiciera el corte de piel antes de ser arrojados al agua caliente. Se empleó la región dorsal del cerdo, la cual se cortó en porciones de 25 cm<sup>2</sup> y se limpió de pelo y exceso de grasas.

Para su almacenamiento la piel ya limpia se envolvió en papel aluminio para protegerla y se almacenó en refrigeración (-20° C) por no más de 30 días.

## **6.3. Preparación del solvente para la curva**

Se puso en contacto, una parte de la piel, con tierra normal durante un periodo de 6 horas y se procedió a hacer el stripping (como se explica posteriormente). Todas las cintas se colocaron en etanol absoluto y se mantuvieron en agitación durante 24 hrs. La solución etanólica resultante se pasó por papel filtro y se utilizó como disolvente para la preparación de la curva de calibración y como blanco.

## **6.4. Curva de calibración**

Se preparó una curva de calibración, pesando cantidades conocidas de fenantreno, cada punto de la curva se realizó por triplicado, utilizando como solvente la solución del punto anterior. La curva se leyó en espectrofotometría de UV a una longitud de onda de 250 nm. Cada punto de la curva se realizó por triplicado.

## **6.5. Preparación de las muestras de tierra con Fenantreno**

Se pesaron 1.5 g de tierra y 0.005 g de fenantreno, se mezclaron perfectamente en un vaso de pp de 50 ml. La tierra se seleccionó de un total de 3 muestras tomadas de diferentes zonas (2 muestras de Naucalpan y una de Cuautitlán Izcalli). La tierra elegida fue aquella que al realizar un barrido en el rango de UV no mostró interferencia con el fenantreno.

## **6.6. Permeaciones**

Se descongeló la piel a utilizar a temperatura ambiente. Se enjuagó con solución salina al 0.9%, asegurándose que siempre se encontrara hidratada. Para hacer las permeaciones se utilizó una celda de perfusión de vidrio con un área de  $13.20\text{cm}^2$ , la cual delimitaba el área de contacto del fenantreno con la piel (figura 8). La celda se colocó en la piel adhiriéndola con un poco de grasa de silicón y se colocó la tierra contaminada con fenantreno (aproximadamente 1.5 g de tierra y 0.005 g de fenantreno), esta tierra se humectó con 0.5 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  deionizada. Se evaluaron los siguientes tiempos de contacto: 1h, 2h, 3h, 4h, 6h y 24h, después de cada tiempo se limpió la piel lavando a chorro de agua deionizada, aproximadamente 100 ml, para eliminar el exceso de tierra contaminada y después se procedió a secarla para determinar el grado de permeación mediante la técnica de Tape-stripping que se detalla a continuación.

## 6.7. Técnica de “tape-stripping”

El grado de penetración del fenantreno para los diferentes tiempos de contacto, se determinó retirando capas sucesivas de estrato corneo. El procedimiento fue el siguiente:

Se cortaron 20 cintas adhesivas (con un área de aproximadamente 13.20 cm<sup>2</sup> de la celda de perfusión empleada, figura 10), cada una de las cintas se pesaron e identificaron. De manera sucesiva las cintas se pegaron en la superficie de la piel tratada, procurando hacer una presión uniforme y se retiraron en un sentido y otro. Cada cinta se pesó nuevamente y por diferencia de peso se determinó la cantidad de estrato corneo retirado, después, por un sencillo cálculo matemático, se obtuvo la distancia de penetración. Cada cinta se colocó en 3 ml de etanol absoluto por 24 hrs. Las soluciones se leyeron en el espectrofotómetro a 250 nm.

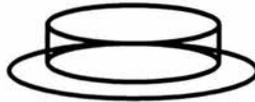


Figura 10. Celda de perfusión

## 6.8. Tratamiento de los datos

Se construyeron perfiles de cantidad permeada contra distancia de penetración. Se calculó la cantidad total permeada y la distancia máxima de penetración para cada uno de los tiempos evaluados. Se hizo el tratamiento estadístico adecuado (Análisis de Varianza, pruebas de Kolmogorov y pruebas de Duncan) para determinar la influencia del tiempo de contacto sobre la distancia y cantidad permeada.

## 7. Resultados y análisis de resultados

Antes de realizar la curva de calibración se hicieron diferentes espectros de absorción del fenantreno: uno con etanol puro (figura 11) y otro con la solución etanólica que se preparó previamente con estrato córneo y tierra (figura12), esto con el propósito de ver que no interfieran, el estrato córneo ni la tierra, con la señal del fenantreno.

Los HAPs son solubles en diferentes solventes orgánicos, de acuerdo a estas características utilizamos el etanol como solvente para diluir el fenantreno, ya que éste solvente es muy accesible y no presenta absorbancia en la región de lectura del fenantreno.

En la figura 11 se muestra el espectro de absorción del fenantreno en solución etanólica con el fin de determinar cual es la longitud de onda a la que se deben leer las muestras.

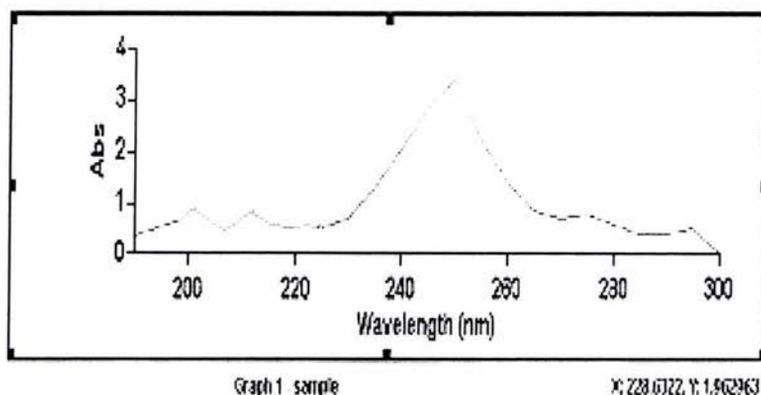
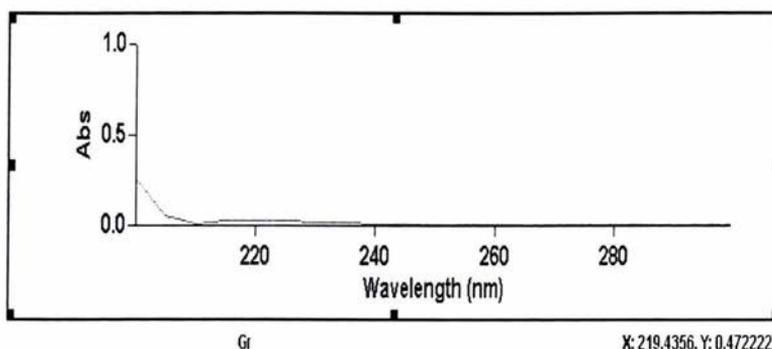


Figura 11. Espectro de absorción del fenantreno utilizando como solvente etanol absoluto en una concentración de 10.6  $\mu\text{g/ml}$ .

En esta figura se observa que el fenantreno tiene una absorbancia máxima a una longitud de onda de 250 nm.

También se hicieron espectros de tierra para ver que esta no tuviera algún hidrocarburo u otro elemento que interfiriera con el fenantreno, y de acuerdo a esto de tres muestras tomadas, se eligió la tierra adecuada para trabajar.

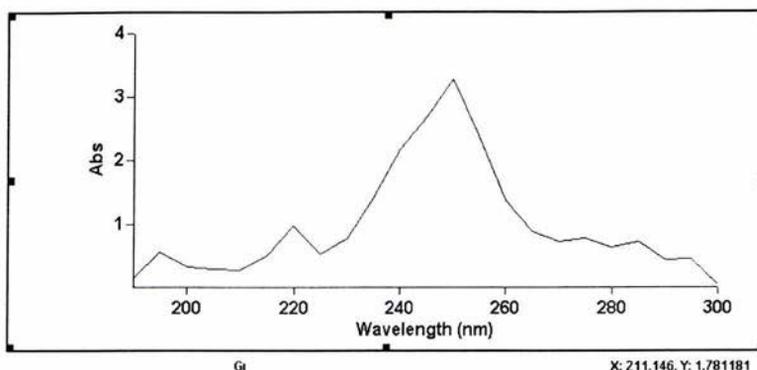
Este barrido se realizó con la solución etanólica-estrato córneo previamente preparada (figura 12).



**Figura 12. Espectro de la tierra elegida para este trabajo, en solución etanol-estrato córneo.**

En este barrido se observa que no interfieren tanto la tierra como el estrato córneo en la región máxima de absorción del fenantreno.

En la figura 13 se muestra el espectro del fenantreno en solución de etanol estrato córneo-tierra, con el cual se eligió la longitud de onda máxima (250nm), esta longitud de onda fue utilizada para realizar las lecturas de absorbancia de las muestras ya que no mostró cambio alguno en cuanto a longitud de onda y absorbancia con respecto al espectro del fenantreno en etanol puro (figura 11).



**Figura 13. Espectro de absorción del fenantreno utilizando como solvente solución etanólica previamente preparada con estrato córneo, el fenantreno se encuentra a una concentración de 10.6  $\mu\text{g/ml}$ .**

La figura 14 muestra la curva de calibración para el fenantreno. El coeficiente de variación global fue de 3.77% (tabla 3) y los coeficientes de variación individual para cada punto de la curva se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2. Coeficientes de variación individuales para cada punto de la curva de calibración** (García et al., 2002)

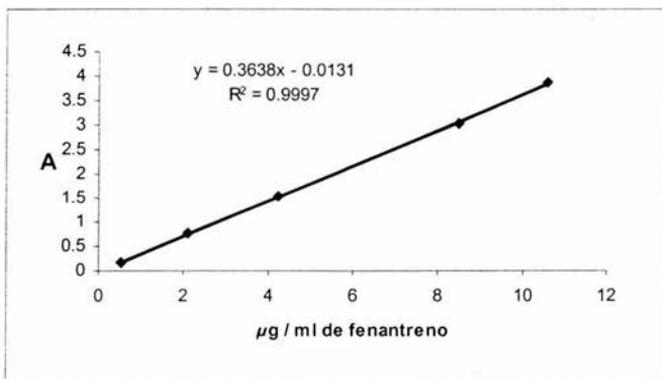
conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	abs prom	C. V. indiv. %
0.53	0.177	3.61
2.12	0.777	0.08
4.24	1.522	1.01
8.48	3.034	1.20
10.6	3.873	0.16

El coeficiente de correlación fue de 0.999857 y el de determinación fue de 0.999714, la ordenada en el origen tuvo un valor de  $b = 0.0131$  y la pendiente  $m = 0.3638$ . Las pruebas estadísticas muestran que la curva de calibración pasó la prueba de linealidad, la prueba de la pendiente y la de la ordenada al origen (Anexo 1 y 2).

Esta curva fue utilizada para calcular la cantidad de microgramos absorbidos en la piel de cerdo a diferentes tiempos de contacto (tabla 4), y el tabla 3 se muestran las concentraciones de cada punto de la curva con el promedio de las absorbancias ya que se leyeron por triplicado.

**Tabla 3. Datos de la curva de calibración**

conc. $\mu\text{g/ml}$	abs prom	abs/conc	promedio	desvest	C.V.global
0.53	0.177	0.333	0.356	0.013	3.772
2.12	0.777	0.366			
4.24	1.522	0.359			
8.48	3.034	0.358			
10.6	3.873	0.365			



**Figura 14. Curva de calibración de fenantreno en solución etanólica previamente preparada con estrato corneo** (García et al., 2002)

El objetivo de este trabajo fue evaluar el grado de penetración de fenantreno contenido en muestras de tierra considerando que es un contaminante que puede encontrarse en el suelo con el que el ser humano puede entrar en contacto, ya sea de manera accidental o por exposición laboral. Como se discute más adelante son pocos los estudios en donde se determina la potencialidad del fenantreno para penetrar a través de la piel, de ahí la importancia de este trabajo.

Las permeaciones se llevaron a cabo simulando el contacto de la piel con tierra contaminada con hidrocarburos, el caso particular de este trabajo, con fenantreno.

De las pruebas realizadas se obtuvo la cantidad de fenantreno absorbido y la distancia de penetración. La cantidad se determinó a partir de cada cinta extrayendo el fenantreno con tres ml de etanol absoluto y leyendo en el espectro UV/visible. Para determinar la distancia de penetración, se pesó cada cinta antes y después de hacer el stripping, calculando la diferencia entre el peso final y el peso inicial, siendo el resultado el peso del estrato córneo removido. Los cálculos que se hicieron para obtener la distancia de penetración fueron los siguientes:

Peso final de la cinta en g - peso inicial de la cinta en g = peso del estrato córneo en g y considerando que la densidad del estrato córneo es de aproximadamente 1 g / cm<sup>3</sup> (Anderson et al. 1973) :

1 g de estrato córneo = 1 cm<sup>3</sup> de estrato córneo

Área de la celda = 13.20 cm<sup>2</sup>

$$\text{Distancia de penetración} = \frac{\text{Volumen de estrato corneo en cm}^3}{\text{Área de la celda cm}^2} \dots\dots\dots\text{Ec. 5}$$

Una vez obtenidas las distancias de estrato córneo para cada cinta, se calcularon las distancias acumuladas para cada muestra de piel. Por otro lado, la cuantificación de fenantreno en cada cinta, permitió construir los perfiles de cantidad permeada en función de la distancia.

Así pues, de los resultados obtenidos del cálculo, se hicieron las siguientes gráficas de distancia de penetración acumulada en mm contra los  $\mu\text{g}$  de fenantreno (figuras 15-20) que se obtuvieron en cada cinta a los diferentes tiempos de contacto (1 h, 2h, 3h, 4h, 6h y 24h).

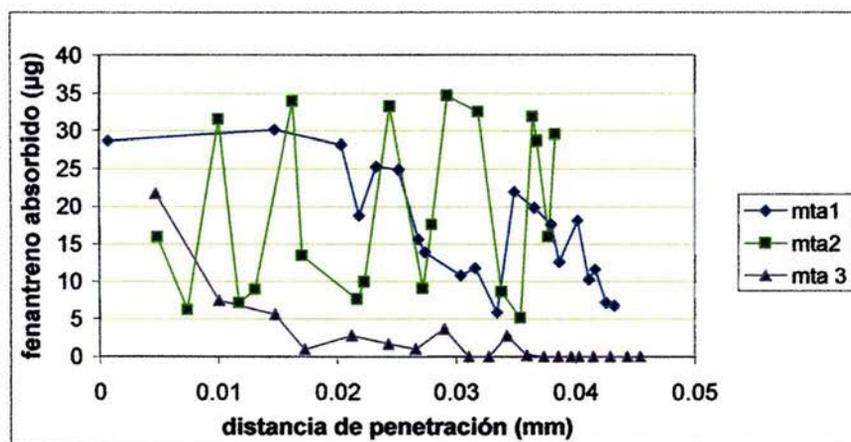


Figura 15. Gráfica del perfil que siguió el fenantreno en contacto con piel durante 1h.

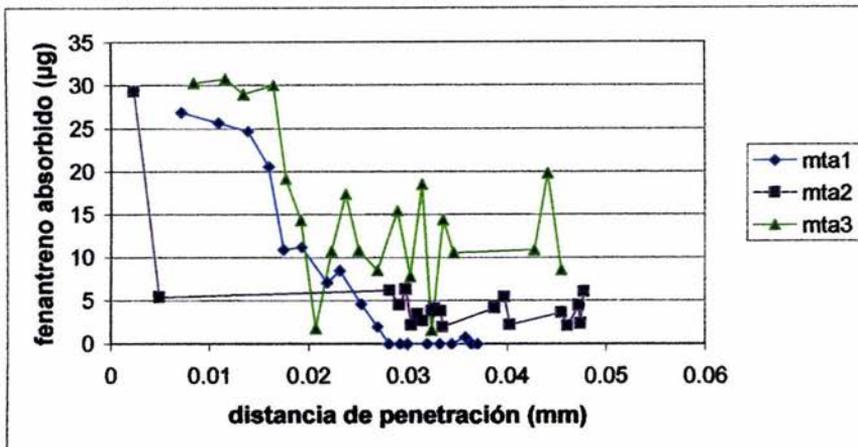


Figura 16. Gráfica del perfil que siguió el fenantreno en contacto con piel durante 2h.

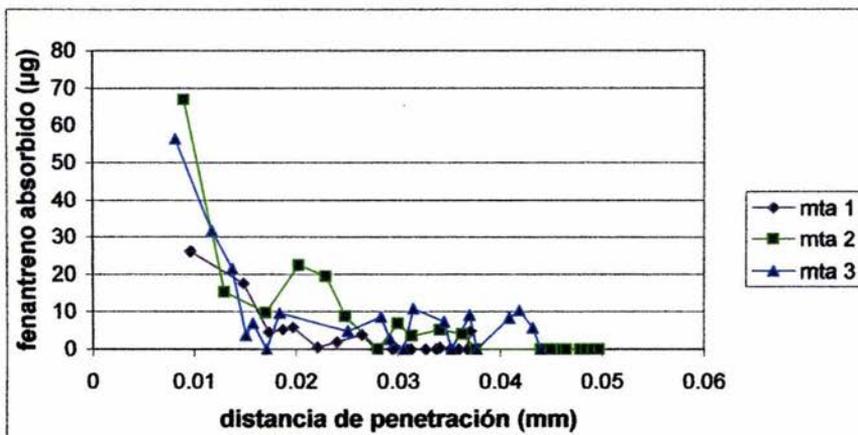
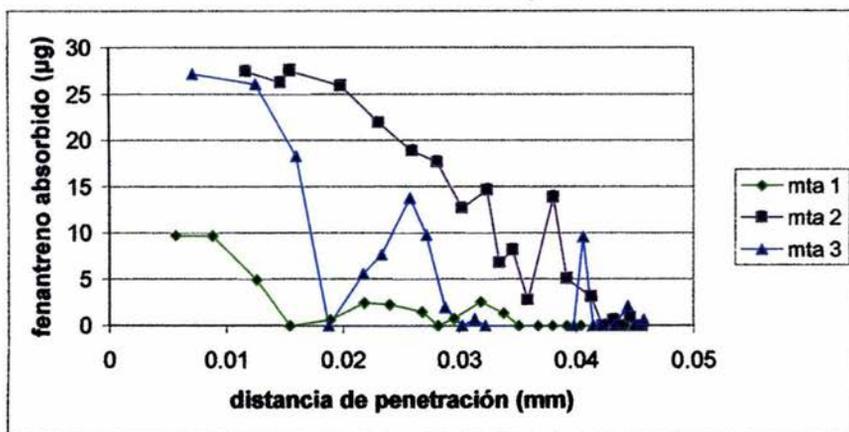
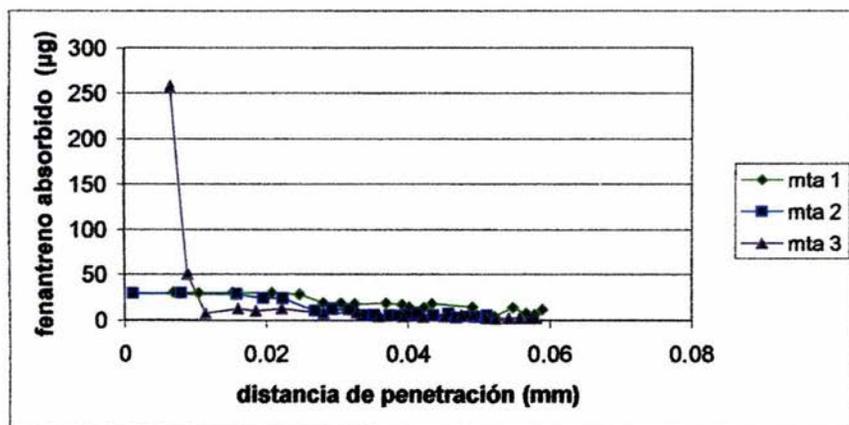


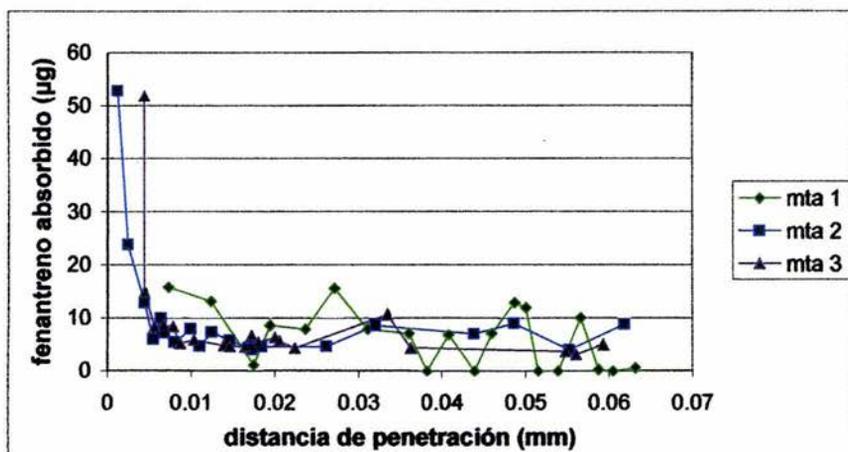
Figura 17. Gráfica del perfil que siguió el fenantreno en contacto con piel durante 3h.



**Figura 18.**Gráfica del perfil que siguió el fenantreno en contacto con piel durante 4h.



**Figura 19.**Gráfica del perfil que siguió el fenantreno en contacto con piel durante 6h.



**Figura 20. Gráfica del perfil que siguió el fenantreno en contacto con piel durante 24h.**

En la tabla 4 se presenta la cantidad total de fenantreno que permeó, así como la distancia máxima de penetración y la cantidad de fenantreno que fue colocada en cada muestra de piel, recuerde que esta cantidad de fenantreno estaba mezclada con aproximadamente 1.5 g de tierra.

**Tabla 4. Resultados de las permeaciones**

Hora	mg de fenantreno que se colocaron en mta.	µg de fenantreno totales permeados	Distancia de penetración (mm)
1	5.3	48.0005	0.0454
	5.2	339.8655	0.0432
	4.6	381.3366	0.0382
2	5.3	142.9131	0.0370
	5.4	310.5699	0.0455
	5.1	104.3693	0.0478
3	5.19	71.1857	0.0371
	5.4	162.8395	0.0498
	5.8	197.9741	0.0440
4	4.07	36.3219	0.0441
	5.2	234.4137	0.0456
	5.3	123.3398	0.0457
6	5.14	360.1784	0.0589
	4.97	241.1761	0.0511
	5.1	418.6649	0.0579
24	4.8	126.8511	0.0632
	4.3	198.6412	0.0619
	4.1	172.7389	0.0594

En las gráficas de las figuras 15-20 se muestra que el fenantreno es capaz de penetrar el estrato córneo y que el tiempo influye en la distancia recorrida. Tomando la distancia máxima de penetración y la cantidad total permeada para cada tiempo se hizo una tabla de ANOVA para determinar si había diferencias entre grupos de datos en cuanto a la distancia recorrida en función del tiempo (tabla 5) anexo 3.

**Tabla 5. ANOVA para determinar las diferencias entre distancias máximas a los diferentes tiempos de contacto**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promed. de los cuadrados</i>	<i>F</i>
Entre grupos	0.00097	5	0.00019	10.73228
Dentro de los grupos	0.00022	12	1.806E-05	
Total	0.00119	17		

<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
0.00042	3.10587

**Ho:** La distancia de penetración se ve afectada con respecto al tiempo, entre mayor es el tiempo mayor es la distancia

**Hi:** La distancia de penetración no se ve afectada con respecto al tiempo, entre mayor es el tiempo, la distancia de penetración no cambia.

Si  $F_{cal} \leq F_{crítica}$  se rechaza  $H_0$

Si  $F_{cal} \geq F_{crítica}$  no se rechaza  $H_0$

El análisis de variancia dio como resultado que si hay una diferencia significativa entre las distancias de penetración, por lo tanto la  $H_0$  es aceptada, y podemos decir que la distancia de penetración se ve afectada con respecto al tiempo. Para corroborar en dónde están marcadas esas diferencias se realizó la prueba de Duncan, tabla 6 y 7 (Anexo 4).

**Tabla 6. Promedios de distancias máximas de permeación acumuladas y promedios calculados de la tabla de Duncan** <sup>(Anderson 1973)</sup>

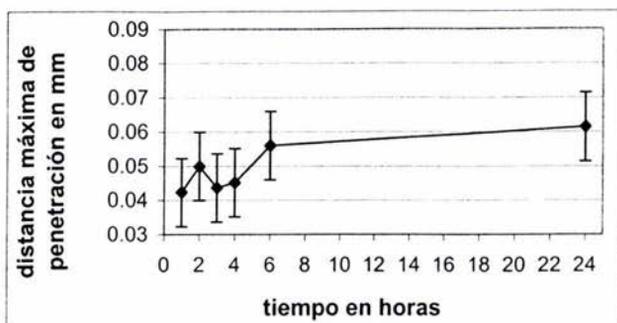
Muestra	1	2	3	4	5	6
Prom obt de tablas		3.22	2.98	3.13	3.28	3.33
Prom significativos		0.01665	0.01541	0.01618	0.01696	0.01722
Prom de dist. acum.	1 hr	2 h	3 h	4 h	6 h	24 h
	0.04231	0.04345	0.04363	0.04517	0.05599	0.06148

Se calcularon las diferencias entre los promedios de las distancias de permeación y se compararon con los promedios significativos, para ver si existían diferencias entre ellos.

**Tabla 7. Diferencias entre promedios de distancias acumuladas**

diferencias	24 h	6 h	4 h	3 h	2 h
1 hr	0.01916	0.01368	0.00285	0.00131	0.00114
2 h	0.018027	0.01255	0.00172	0.00018	
3 h	0.01785	0.01237	0.00154		
4 h	0.01631	0.01083			
6 h	0.00548				

De las comparaciones que se hicieron entre los promedios de las distancias acumuladas y los promedios calculados de tablas se encontró que entre las horas 1,2,3,4 y 6 no hay una diferencia significativa, pero entre las horas 6 y 24 ya existe una diferencia significativa, esto es por que, en esta última prueba el tiempo se cuadruplica y se permite que el fenantreno esté en contacto mucho más tiempo con la piel que en las horas anteriores. Este fenómeno se muestra en la figura 21.



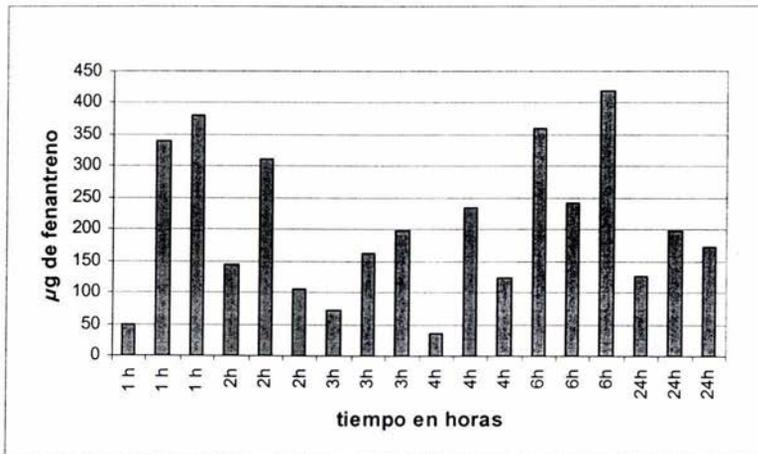
**Figura 21. Gráfica de tiempo contra distancia máxima de penetración**

Hasta aquí, nos podemos dar cuenta que el fenantreno tiene una alta permeabilidad y que esta depende del tiempo de contacto y que se da de acuerdo a las propiedades del estrato córneo y a las características fisicoquímicas del fenantreno, ya que este elemento tiene un bajo peso molecular y es altamente lipofílico (se reporta para el fenantreno un coeficiente de partición muy alto:  $\log P=4.6$ ), lo que facilita el paso a través de la barrera de permeación la cual está compuesta principalmente de lípidos y proteínas y considerando que la ruta más probable de penetración es la conformada por los lípidos intercelulares, esto explica la factibilidad de que el fenantreno y la mayoría de los HAPs puedan penetrar <sup>(Herliet et al. 1998; Sartorelli et al. 1998)</sup>

Debido a la alta lipofilia del fenantreno su transporte a través del estrato córneo se ve favorecida, no obstante, habría que comprobar si es capaz de permear a capas más profundas como la epidermis y la dermis las cuales presentan propiedades hidrofílicas. De no ser así, se puede esperar que se forme un depósito de fenantreno en el estrato córneo a partir del cual pudiera irse liberando lentamente.

En la figura 22 se observa que el tiempo no influye con la cantidad total de fenantreno que es absorbido ya que la cantidad absorbida varía en todos los

tiempos y se encuentran muestras en las que la cantidad de fenantreno es muy alta sin importar el tiempo de exposición. Esto puede deberse a que los folículos pilosos juegan un papel importante en la permeación cutánea y que, tal vez en ellos, esté acumulándose una cantidad mayor de tierra contaminada y al momento de ser lavada la piel este no alcance a retirarse por completo, además hay que tomar en cuenta que la mayoría de los hidrocarburos son muy poco solubles en agua por lo que el lavado que se hizo pudo no ser tan efectivo e incluso aleatorio, resultando la alta variabilidad que se presenta en la figura 22 (Herlet et al. 1998; Sartorelli et al. 1998).



**Figura 22. Gráfica de µg totales de fenantreno absorbidos en estrato córneo**

De acuerdo a las cantidades totales absorbidas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si había diferencias entre resultados de cantidades totales absorbidas con respecto al tiempo, tabla 8 (Anexo 5).

**Tabla 8. ANOVA para determinar las diferencias entre microgramos totales absorbidos a los diferentes tiempos de contacto.**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F
Entre grupos	95653.0351	5	19130.6070	1.67158
Dentro de los grupos	137335.3235	12	11444.6103	
Total	232988.3587	17		

Probabilidad para F	Valor crítico
0.21574	3.10587

**Ho:** La cantidad total de fenantreno permeada se ve afectada con respecto al tiempo, entre mayor tiempo de contacto mayor cantidad de fenantreno permeado.

**Hi:** La cantidad total de fenantreno no se ve afectada con respecto al tiempo, entre mayor tiempo de contacto no hay diferencia en la cantidad de fenantreno permeado.

Si  $F_{cal} \leq F_{crítica}$  Ho es rechazada

Si  $F_{cal} \geq F_{crítica}$  Ho es aceptada

El análisis de variancia dio como resultado que no hay una diferencia significativa entre los microgramos totales de fenantreno absorbidos, por lo tanto la Ho es rechazada en este caso. Algunos autores como Sartorelli (Sartorelli et al., 1998) obtienen resultados en los que se observa que entre mayor es el tiempo de exposición mayor es la cantidad de fenantreno absorbido, sin embargo las técnicas

de permeación empleadas en ese trabajo y en el presente estudio difieren, puesto que lo que hizo Sartorelli fue determinar la cantidad permeada a través de piel de mono (*Cercopithecus aetiops*). Este autor utilizó una celda de Franz en la cual colocó el fenantreno en solución de acetona sin oclusión, como líquido receptor utilizó una solución salina con sulfato de gentamicina y 4 % de albúmina de suero de bovino, la piel que él utilizó fue la del abdomen y con estudios *in vivo* e *in vitro* demostró que la absorción percutánea a través de piel de mono es similar a la de humano. Sartorelli realizó estudios de permeación evaluando la cantidad de fenantreno que atraviesa piel entera. En nuestro caso se construyeron perfiles de distribución en estrato córneo, además la solución de acetona que utilizó Sartorelli pudo haber extraído lípidos del estrato córneo lo que explica una mayor absorción del fenantreno (Sartorelli et al., 1998; 1995).

Para determinar si todos los resultados de los  $\mu\text{g}$  absorbidos están dentro de una distribución normal se hizo una prueba de Kolmogorov y de acuerdo a esta prueba el 99% de los datos siguen una distribución normal (anexo 6) (Daniel W.1993).

El fenantreno es un hidrocarburo de bajo peso molecular, y es un compuesto de alto riesgo ya que se considera como cancerígeno (Hertel et al., 1998; Braga et al., 1999; Borone et al.,2000) y debido precisamente a su bajo peso molecular su absorción en la piel se facilita. Sartorelli (Sartorelli et. al. 1998) reporta una constante de permeabilidad ( $K_p$ ) para el fenantreno de  $1.96 \times 10^{-3}$  cm/h en un tiempo de 12.39 h lo que quiere decir que la permeabilidad del fenantreno en la piel es alta. Nosotros pudimos observar de acuerdo a nuestras gráficas que el fenantreno sí tiene una alta permeabilidad ya que en algunos casos, penetraron hasta  $300\text{-}400\mu\text{g}$ , nosotros utilizamos una celda de perfusión, en la que se colocó la muestra de tierra contaminada con fenantreno, recordemos que el fenantreno se encontraba mezclado con tierra, por lo tanto, la superficie de contacto con la piel no era exclusivamente con el fenantreno, por lo que puede ser que la distribución no haya

sido del todo homogénea en toda la superficie a esto atribuimos que se haya obtenido un total de fenantreno absorbido mayor en unas muestras que en otras. Como ya mencionamos anteriormente los folículos pilosos tuvieron que ver mucho en estos resultados ya que aquí se pudo haber acumulado parte del fenantreno, que al momento de hacer el stripping se arrastro en la cinta y tampoco descartamos que en las glándulas sebáceas se acumuló otra gran parte de este compuesto (Sartorelli et al., 2000; 1998).

Siempre que se habla de toxicología y farmacología cutánea se debe tener en cuenta el coeficiente de partición, pues este es uno de los factores junto con el peso molecular que puede influir de manera importante en la absorción de medicamentos o sustancias potencialmente tóxicas. La absorción de una sustancia está determinada por la afinidad relativa por el solvente y el estrato córneo (Covo, 2000).

Para el fenantreno algunos autores reportan un coeficiente de partición  $K_{o/w}$  de 39810.7 (Sartorelli et al., 1998) y de acuerdo a que es altamente lipofílico podemos decir que sigue fácilmente la ruta de penetración intercelular a través de la matriz lipídica pero luego de ser atravesada se encuentra la base epidérmica que está formada por un alto contenido de agua y en la cual el fenantreno se detiene debido a su baja solubilidad en agua por lo que se considera muy difícil que por esta ruta siga su camino a la circulación general, aunque como ya se mencionó anteriormente, pudiera formarse un reservorio en el estrato corneo, en donde el fenantreno se acumula y se fuera liberando lentamente.

## 8. Conclusiones

1. En este trabajo se evaluó la penetración de fenantreno a través de piel de cerdo determinando la influencia del tiempo de contacto sobre la cantidad permeada y la distancia de permeación.
2. El tiempo de contacto influye en la distancia de permeación del fenantreno. A tiempos de contacto prolongados la distancia de permeación es mayor.
3. No se encontró una diferencia significativa en cuanto a la cantidad total permeada para los diferentes tiempos de contacto.
4. La gran variación observada en los resultados obtenidos se atribuye por un lado, a que no fue posible controlar las características y edad de los cerdos empleados, y por otro lado, se cree que la gran cantidad de folículos pilosos en el cerdo contribuye a que el fenantreno se acumule de manera irregular en estos apéndices.
5. El fenantreno es capaz de atravesar la barrera de permeación de la piel (estrato córneo) y esto se debe a sus características fisicoquímicas, como son su lipofilia y su bajo peso molecular.
6. A pesar de que algunos autores indican que las rutas de entrada más probables para los HAPs son el tracto respiratorio y el tracto gastrointestinal, no debe descartarse la ruta transdérmica pues al ser la piel la interfase entre nuestro organismo y el medio externo, es muy alta la posibilidad de estar expuesto a este tipo de compuestos y que penetren en cierto grado por vía cutánea (Ross 1980; Sartorelli et al., 1998).

7. La técnica de tape stripping es de gran utilidad para estudiar la penetración de sustancias tóxicas mediante pruebas *ex vivo* en modelos animales y es fácilmente aplicable como una prueba *in vivo* en humanos, sobre todo en lugares en los que la gente está en riesgo de estar expuesta a estas sustancias.
  
8. La relevancia de este trabajo radica en que es el primer estudio de penetración de fenantreno a través de piel mediante la técnica de tape stripping.

## 9. Perspectivas

Debido a los resultados obtenidos en este trabajo es conveniente que se sigan investigando este tipo de sustancias, con los que directa o indirectamente estamos en contacto. Muchos de los hidrocarburos los encontramos en: pesticidas, pinturas, lacas, alimentos ahumados, humos de combustiones y de cigarro, en plantas petroleras y también se pueden encontrar como sustancias de riesgo laboral. Debido a esto, las posibles vías de entrada al organismo y los riesgos que se corren al estar expuestos a ellos, deben de ser estudiados con mayor detenimiento sobre todo porque la mayoría de estas sustancias se consideran como carcinogénicas.

La técnica de tape stripping empleada en este trabajo se acerca mucho a la realidad ya que permite determinar (incluso in vivo en humanos) el grado de penetración de una sustancia a través del estrato córneo. Debido a que a nuestro conocimiento no hay estudios de penetración de HAPs mediante esta técnica, se sugiere:

- Estudiar la penetración de fenantreno empleando técnicas analíticas más sensibles como HPLC, HPTLC o electroforesis capilar.
- Hacer estudios en piel estandarizada para obtener datos más precisos.
- Estudiar la penetración de otro tipo de hidrocarburos a través de la piel, además del fenantreno.
- Cuantificar hidrocarburos en sujetos expuestos cotidianamente a ellos mediante tape stripping.

## **9. Agradecimiento**

CONACYT (Proyecto J 32593-M) y PAPIIT (Proyecto IN 214000) por el apoyo económico brindado y al Ing. Draucin Jiménez del Taller de Vidrio de la FES-Cuautitlán por haber elaborado las celdas de perfusión empleadas en el trabajo.

## 11. Bibliografía:

1. Alberty W. J., (1979a). Percutaneous absorption: in vivo experiments. *Journal Pharmaceutics. Pharmacol.* Vol.31, pp.129-139.
2. Almueda A., Lizaso J., (2000). Hidrocarburos. [www.fundisa.org/esp-articulos.htm](http://www.fundisa.org/esp-articulos.htm) Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria. Madrid.
3. Amado S., (1998). Lecciones de dermatología 13ª Edición. Editorial Francisco Méndez Cervantes. México pp. 5-19.
4. Anderson R. L., Cassidy J. M., (1973). Variation in physical, dimension and chemical composition of human stratum corneum. *J Invest Dermatol.* Vol.61, pp. 30-32.
5. Anderson R. L., (2001). *Practical statistics for analytical chemists* 1ra edición EUA. pp. 75, 85-87.
6. Baert A., (2002). Comentarios acerca de los riesgos que entraña la recogida del petróleo del prestigio y la limpieza de las aves, por si pudieran alterar al litoral francés, según los datos disponibles a 29 de noviembre del 2002. Universidad Alfonso X el sabio, Madrid.
7. Barone P. M. V. B., Braga R. S., Camilo A., (2000). Electrónica Indices from semi-empirical calculations to identify carcinogenic activity of polycyclic hydrocarbons. *J. of Molecular Structure (Theochem).* Vol. 505, pp. 55-66.

8. Bloom F., (1987). Tratado de Histología; Interamericana –Mc Graw-Hill; España, pp549-582.
9. Braga R. S., Barone P. M. V. B., Galvao D. S., (1999). Identifying carcinogenic activity of methylated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). J. of Molecular Structure (Theochem). Vol. 460, pp 257-266.
10. Bronaugh R.L. and Maibach H. I.,(1999). Topical Absorption of Dermatological Products, Marcel Dekker Inc., U. S. A.
11. Bronaugh R., Tryphonas L., (1996). Skin Reservoir, Formation and Bioavailability of Dermal Administered Chemicals in Hairless Guinea Pigs. Food and Chemical Toxicology. Vol. 34(3), pp. 267-273.
12. Covo L. M. S., (2000). La piel como órgano de protección. Universidad de Cartagena. [www.contusalud.com](http://www.contusalud.com) .
13. Daniel W. (1993) Bioestadística. Ed. Limusa. México, pp 306-309 637-639.
14. Dennis M. J., Massey R. C., Cripps G., Venn I., Howarth N. & Lee G., (1991). Factors affecting the polycyclic aromatic hydrocarbons content of cereals, fats and other food products. Food Addit Contam. Vol.8, pp. 517-530.
15. Díaz M. N. E., Alfaro B. J. M., Garza U. H., (2001). Método analítico para detectar hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua potable. Ciencia UANL. Vol. 4(4).
16. Dikerson R. L., Hooper M. J., Gard N. W., Cobb G. P. & Kendall R. J., (1994). Toxicological foundations of ecological risk assessment: Biomarker development and interpretation based on laboratory and wildlife species. Environ Health Perspectives. Vol. 102, pp. 65-69.

17. Hertel R. F., Rosne G. R., (1998). Selected Non-Heterocyclic Aromatic Hydrocarbons, World Health Organization, Geneva.
18. Idson B., (1975). Percutaneous Absorption. J. of Pharmaceutical Sciences. Vol. 64 No. 6.
19. Fritz P. S, Meingassner J. G., Billich A., (2001). Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. International Journal of Pharmaceutics. Vol. 215 pp. 51-56.
20. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, (2001). Guía de validación de métodos analíticos, México S. A. Registro ante la DGP F-032.
21. Holbrook K. A. ; Wolff K., (1987). The structure and development of skin in dermatology, In General Medicine Mc Graw-Hil, New York , pp 93.
22. IARC Polynuclear aromatic compounds, (1983). Chemical, environmental and experimental data. Lyon, International Agency for Research on Cancer, (IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Volume 32). Part 1, pp 477.
23. IARC Polynuclear aromatic hydrocarbons, (1984). Carbon blacks, mineral oils (lubricant base oils and derived products) and some nitroarenes. Lyon, International Agency for Research on Cancer, (IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Volume 33) Part. 2, pp 365.

24. Kadry A. M., Skowronski G. A., Turkall R. M., (1995). Comparison between oral and dermal bioavailability of soil adsorbed phenanthrene in female rats. *Toxicology Letters*. Vol. 78 (2), pp. 153-163.
25. Knecht U., Ellieausen H-J., (1986). Gaseous and adsorbed PHA in an iron foundry. *J Ind Med*. Vol. 43, pp. 834-838.
26. Larousse, (2001). *Diccionario Básico de la Lengua Española*; Editorial Ultra , México.
27. Leena A., Nylander-French, (2000). A Tape-Stripping Method for Measuring Dermal Exposure to Multifunctional Acrylates. *Ann. Occup. Hyg.* Vol. 44(8), pp.645-651.
28. Lee M. L., Novotny M, & Bartle, (1976). Gas chromatography /massspectrometric and nuclear magnetic resonance spectrometric studies of carcinogenic polynuclear aromatic hydrocarbons in tabaco and marijuana smokescondensates. *Anal. Chem.* Vol. 48, pp 405-416.
29. Liem A.K.D., Baumann A., De Jong A.P.J.M., Van der Velde E.G., & Van Zoonen P., (1992). Analysis of organic micropollutants in the lipid fraction of foodstuffs. *J. Chromatogr.* Vol. 624, pp. 317-339.
30. Moser K., Kriwet K., Naik A., (2001). Passive skin penetration enhancement and quantification in vivo. *European J. of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Vol. 52, pp. 103-112.
31. Pellett M. A., Roberts M.S., Hadgraft J., (1997). Supersaturate solutions evaluated with an in vitro stratum corneum tape technique. *International Journal Pharmaceutics*. Vol. 151, pp. 91-98.

32. Remigton, (1998). Farmacia, 7ª edición, Tomo I. Editorial Médica Panamericana S. A. Buenos Aires Argentina, pp. 2417-2423.
33. Rodríguez I., O., (1998). Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. Rev Cubana Farm. Vol. 32(1), pp. 68-75.
34. Ross M., Romrell L., Kaye G. I. (1980). Histología. Texto y Atlas Color, 3 ra Edición, Edt. Panamericana, Bogota Buenos Aires.
35. Ortiz R. S., (2000). Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. Marcel Dikker Inc., pagina internet <http://es.geocities.com/ecored2000/haps.html>.
36. Sartorelli, P., Aprea C., Cenni A., (1995.). In vitro percutaneous absorption of phenanthrene thorough monkey skin. Med. Lav. Vol. 86, pp. 34-39.
37. Sartorelli P., Aprea C., Cenni A., Novelli M.T., (1998). Prediction of Absorption from Physicochemical Data: A Model Bases on Data of *In vitro* Experiments. Ann.Occp. Hyg. Vol. 42(4), pp.267-276.
38. Sartorelli P. H. R., Andersen J., Angerer, (2000). Percutaneous penetration studies for risk assessment. Environmental Toxicology and Pharmacology. Vol. 8, pp. 133-152.
39. Smith S. R., Tanaka J., Futoma D. J., & Smith T. E., (1981). Sampling and preconcentration methods for the analysis of polycyclicaromatic hydrocarbons in water systems. CRC Crit. Rev. Anal. Chem. Vol. 10, pp. 375-425.

32. Remington, (1998). Farmacia, 7ª edición, Tomo I. Editorial Médica Panamericana S. A. Buenos Aires Argentina, pp. 2417-2423.
33. Rodríguez I., O., (1998). Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. Rev Cubana Farm. Vol. 32(1), pp. 68-75.
34. Ross M., Romrell L., Kaye G. I. (1980). Histología. Texto y Atlas Color, 3 ra Edición, Edt. Panamericana, Bogota Buenos Aires.
35. Ortiz R. S., (2000). Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. Marcel Dikker Inc., pagina internet <http://es.geocities.com/ecored2000/haps.html>.
36. Sartorelli, P., Aprea C., Cenni A., (1995.). In vitro percutaneous absorption of phenanthrene thorough monkey skin. Med. Lav. Vol. 86, pp. 34-39.
37. Sartorelli P., Aprea C., Cenni A., Novelli M.T., (1998). Prediction of Absorption from Physicochemical Data: A Model Bases on Data of *In vitro* Experiments. Ann.Occp. Hyg. Vol. 42(4), pp.267-276.
38. Sartorelli P. H. R., Andersen J., Angerer, (2000). Percutaneous penetration studies for risk assessment. Environmental Toxicology and Pharmacology. Vol. 8, pp. 133-152.
39. Smith S. R., Tanaka J., Futoma D. J., & Smith T. E., (1981). Sampling and preconcentration methods for the analysis of polycyclicaromatic hydrocarbons in water systems. CRC Crit. Rev. Anal. Chem. Vol. 10, pp. 375-425.

40. Smith T., (1996). Fitopatología (Principios Biológicos de la enfermedad); Panamericana Buenos Aires, pp 1178-1198.
41. Soter N. A., (1983). Mast cells in cutaneous, inflammatory disorders, J. Invest. Dermatol, pp 80.
42. Steiling W., Kreutz J., Hofer H., (2001). Percutaneous penetration / dermal absorption of hair dyes in vitro. Toxicology in Vitro. Vol. 15, pp. 565-570.
43. Malgorzata S., Janicki S., Baczek A., (2001). Studies on the effect of pH on the lipoidal route of penetration across stratum corneum. J. of Controlled Release. Vol. 76, pp. 327-335.
44. Wester R. and Maibach, H.I., (1989). In vitro animal models for percutaneous absorption. In *Percutaneous absorption* (Edited by Bronaugh, R. L. and Maibach H. I.), Marcel Dekker, New York. Pp 221-238.
45. WHO Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH), (1987). In: Air quality guidelines for Europe. Copenhagen. Regional Office for Europe, (regional publication, European Series), No. 23, pp 105-117.
46. Wissing S. A., Müller R. H., (2002). Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. Journal of Controlled Release. Vol. 81, pp. 225-233.

## 12. Glosario

**Amalgama:** Recibe este nombre la operación de ligar el mercurio con algún metal por medios físicos como la frotación o el calentamiento y el batido, etc. El mercurio fácilmente amalgama con el oro, la plata, el zinc, etc., siendo, condición previa que le metal este completamente limpio y desengrasado por medio de una lejía (hipoclorito de sodio) de potasa de sodio, o de algún ácido enérgico.

**Agua freática:** Es el agua subterránea más cercana a la superficie, de gran importancia para el desarrollo de las plantas.

Agua subterránea que se presenta en la zona de saturación y que tiene una superficie libre.

**Betún:** Nombre de varias sustancias naturales compuestas de carbono e hidrógeno, que arden con llama, humo espeso y olor peculiar.

**Coque:** Residuo duro y poroso que resulta después de la destilación del carbono. El coque se utiliza como reductor en siderurgia, para la fundición del hierro y obtener acero a partir del arrabio. Tiene un color gris negruzco y un brillo metálico. Contiene, en su mayor parte carbono (92%) y el resto ceniza (8%) su valor calorífico es muy elevado.

**Coquificación :** Transformar la hulla en coque.

**Creosota:** Es una mezcla de muchas sustancias químicas que se originan al quemar madera de haya y otras maderas, carbón, o de la resina del arbusto de creosota. La creosota de madera es un líquido grasiento entre incoloro o amarillento con olor a humo y sabor a quemado. La creosota de alquitrán de hulla es un líquido aceitoso espeso, típicamente de color entre ámbar y negro. El alquitrán de hulla y el

residuo de alquitrán de hulla son generalmente líquidos espesos de color negro o pardo oscuro, o son semisólidos con olor a humo. La creosota de madera se ha usado como desinfectante, laxante y para tratar la tos, aunque hoy en día ha sido remplazada por medicamentos más eficaces. Los productos de alquitrán de hulla se usan en medicina para tratar enfermedades de la piel, también en repelentes de aves y otros animales, insecticidas, líquidos para bañar a animales y fungicidas.

**Eccema:** Afección de la piel caracterizada por vejiguillas muy espesas que forman manchas irregulares y rojizas.

**Escorrentía:** Llamamos escorrentía a la lámina de agua que circula en una cuenca de drenaje, es decir la altura en milímetros de agua de lluvia escurrida y extendida uniformemente. Normalmente se considera como la precipitación menos la evaporación real.

**Hollín:** Parte crasa y negra del humo que se pega a las chimeneas.

**Horripilar:** Hacer que se erice el cabello o pelo.

**Hulla:** Combustible fósil con una riqueza entre 75 y 90% y un contenido en volátiles que oscila entre 20 y 35%. Es negra, mate y arde con dificultad con una llama amarillenta. Se diferencia del lignito, por su mayor poder calorífico (entre 30 y 36 MJ/Kg. En la revolución industrial se le llamo carbón de piedra. Se emplea como combustible y en la siderurgia. Se usaba para obtener gas y una gran cantidad de productos químicos, dando lugar a la carboquímica. Ha sido sustituido por el petróleo y el gas natural.

**Lixiviación:** Se entiende por lixiviación la operación de tratar un material por un disolvente hasta que no quede, materia soluble, vale decir, que el elemento soluble se puede considerar prácticamente agotado.

**Partículas suspendidas:** Son partículas sólidas o líquidas dispersas en la atmósfera (su diámetro va de  $10\mu\text{ m}$ ) y pueden ser polvo cenizas, hollin, partículas metálicas, cemento, o polen. La fracción respiratoria de PST (partículas suspendidas totales conocidas como PM-10 esta constituida por aquellas partículas de diámetro inferior a  $10\mu\text{ m}$ , que tiene la particularidad de penetrar en el aparato respiratorio hasta los alvéolos pulmonares, sus fuentes principales son: combustión industrial y doméstica del carbono y diesel, procesos industriales, incendios, erupciones volcánicas, etc.

**Precipitación:** Lluvia nieve o granizo que se deposita en la tierra.

**Permeación:** Es el paso de un soluto de un lado de una membrana a otro.

**Pirólisis:** Reacción química que se utiliza para romper Hidrocarburos.

**Sedimentos:** Materia que habiendo estado en suspensión en un líquido se posa en el fondo. Material que se encuentra en suspensión en el ambiente y que se deposita en la tierra.

**Sustancias húmicas:** Constituyen grupos heterogéneos que no están definidos por una composición determinada (como sería lo ideal) sino que se establecen en base a su comportamiento frente a determinados reactivos (según sean solubles o precipiten). El humus al tratarlo con una serie de reactivos extractantes se separa en una serie de fracciones. A cada fracción extraída se le da un nombre. Mediante los reactivos alcalinos, como la NaOH, se separan las huminas (que son insolubles) de

los ácidos fúlvicos y húmicos, que son solubles. Estos últimos se separan mediante tratamiento ácido, generalmente HCl; los ácidos fúlvicos son solubles en HCl mientras que los húmicos son insolubles. El comportamiento frente al calcio diferencia dos fracciones de ácidos húmicos: ácidos húmicos pardos, solubles en calcio y ácidos húmicos grises, insolubles en calcio.

**Teratogénico:** (teratogén). Agente físico o químico capaz de producir defectos congénitos y/o malformaciones permanentes durante el periodo pre-natal al organismo en desarrollo, en dosis que no afectan a la madre. Estos defectos pueden causar el aborto espontáneo.

**WHO:** World Health Organization (Organización Mundial de la Salud) fue establecida el 7 de abril de 1948, esta encargada de establecer reglas y normas para la salud mundial.

## **Anexos**

**Anexo 1** Curva de calibración

**Anexo 2** Cálculo de la linealidad del sistema

**Anexo 3** Análisis de varianza: distancia máxima de penetración en función del tiempo.

**Anexo 4** Prueba de Duncan

**Anexo 5** Análisis de varianza: microgramos perméados de fenantreno en función del tiempo

**Anexo 6** Prueba de Kolmogorov

## Anexo 1

### Curva de calibración del fenantreno (García et al., 2000)

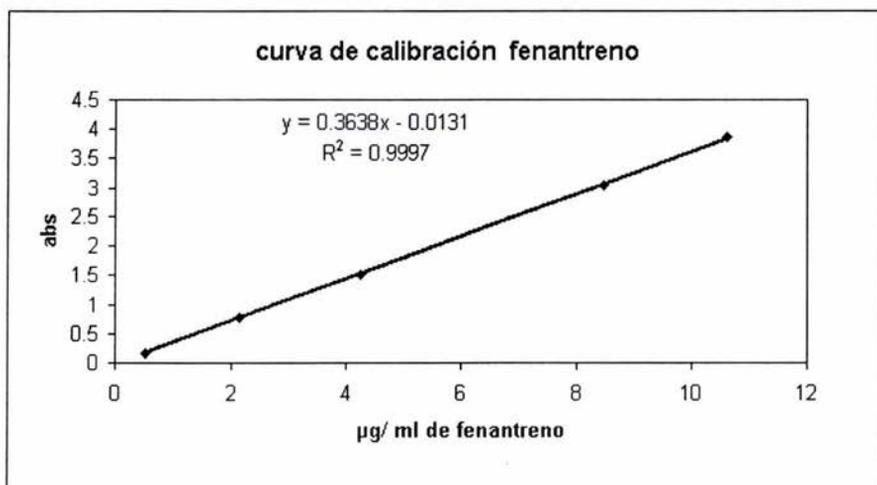
Conc. µg/ml	abs	abs/ con.	promedio	desvest	C.V. Individual
0.53	0.1767	0.33339623	0.333333333	0.01202327	3.606981582
0.53	0.1765	0.33301887			
0.53	0.1768	0.33358491			
2.12	0.7765	0.36627358	0.366493711	0.00030326	0.082746156
2.12	0.7767	0.36636792			
2.12	0.7777	0.36683962			
4.24	1.5239	0.35941038	0.358946541	0.00396503	1.104628399
4.24	1.5209	0.35870283			
4.24	1.521	0.35872642			
8.48	3.0257	0.35680425	0.357810535	0.00482417	1.348247508
8.48	3.0343	0.3578184			
8.48	3.0427	0.35880896			
10.6	3.8758	0.36564151	0.36536478	0.00057154	0.156430059
10.6	3.8769	0.36574528			
10.6	3.8659	0.36470755			

conc. µg/ml	abs prom	abs/conc	promedio	desvest	C.V. global
0.53	0.17666667	0.33333333	0.35638978	0.01344243	3.771832821
2.12	0.77696667	0.36649371			
4.24	1.52193333	0.35894654			
8.48	3.03423333	0.35781053			
10.6	3.87286667	0.36536478			

a=0.36380219

b=-0.0130552

r=0.99985753



## Anexo 2

### Calculo de la linealidad del sistema

(García et al. 2000)

#### Intervalo de la pendiente

Se obtuvo una  $t_{0.675, n-2} = 3.182$

A partir del valor de t teórica se calculó el intervalo de la pendiente

$IC(B_1) = 0.36735, 0.36025$  este intervalo no incluye cero  
y se hizo el cálculo de la t experimental siendo = 102.5056

Hipótesis de aceptación

Ho: La pendiente no es igual a cero

Hi: La pendiente es igual a cero

Al comparar la t teórica con la t experimental encontramos que hay una diferencia muy significativa y que se acepta la hipótesis Ho, que indica que la pendiente no es igual a cero

#### Intervalo de la ordenada en el origen

Se obtuvo una t 0.975, n-2 = 3.182

A partir del valor de t teórica se calculó el intervalo de la ordenada, el cual debe incluir cero

$IC(B_0) = 0.08572, -0.05961$  este intervalo incluye cero

Se calculó  $CV_{xy}$  el cual no debe exceder del 2%

$CV = 1.06063 \%$

se hizo el cálculo de la t experimental siendo = 0.571627

Hipótesis de aceptación

Ho: La ordenada en el origen no es igual a cero

Hi : La ordenada en el origen es igual a cero

Al comparar la t teórica con la t experimental encontramos que no hay diferencia significativa y que se acepta la hipótesis Hi, que indica que la ordenada al origen es igual a cero

### Anexo 3

#### Análisis de varianza para la distancia de permeación en función del tiempo

tiempo	1 h	2 h	3 h	4 h	6 h	24 h
distancia en	0.045445684	0.037038232	0.037113975	0.04415806	0.058927903	0.0631695
Mm	0.043249142	0.045521426	0.049763023	0.04559717	0.051126394	0.061881872
	0.038250117	0.047793711	0.04400657	0.04574865	0.057943247	0.05938236

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN		Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Grupos					
Columna 1		3	0.126944943	0.04231498	1.35985E-05
Columna 2		3	0.130353369	0.04345112	3.21347E-05
Columna 3		3	0.130883569	0.04362786	4.01072E-05
Columna 4		3	0.13550388	0.04516796	7.70667E-07
Columna 5		3	0.167997544	0.05599918	1.80504E-05
Columna 6		3	0.184433732	0.06147791	3.708E-06

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones		Grados de libertad		F	Probabilidad
Entre grupos	0.00096921	5	Promedio de los cuadrados	10.7322769	0.000423236
Dentro de los grupos	0.000216739	12			Valor crítico para F
Total	0.001185949	17			3.105874669

## Anexo 4

### Prueba de Duncan (Anderson, 2001)

des estándar global = **0.005170114**

muestra	1	2	3	4	5	6
promedios significativos		3.22	2.98	3.13	3.28	3.33
promedios	1 h	2 h	3 h	4 h	6 h	24 h
	0.042314981	0.043451123	0.043627856	0.04516796	0.05599918	0.06147791

diferencias	24 h	6 h	4 h	3 h	2 h
1 h	0.01916293	0.0136842	0.002852979	0.00131288	0.00113614
2 h	0.018026788	0.012548058	0.001716837	0.00017673	
3 h	0.017850055	0.012371325	0.001540104		
4 h	0.016309951	0.010831221			
6 h	0.00547873				

Comparaciones de los promedios para al prueba de Duncan de 24 h

24 h		2 h	3 h	4 h	6h	24
24h-1 h=	0.01916293	0.016647766	0.015406939	0.01618246	0.01695797	0.01721648
24h-2 h=	0.018026788	0.016647766	0.015406939	0.01618246	0.01695797	0.01721648
24h-3 h=	0.017850055	0.016647766	0.015406939	0.01618246	0.01695797	0.01721648
24h-4 h=	0.016309951	0.016647766	0.015406939	0.01618246	0.01695797	0.01721648
24h-6 h=	0.00547873	0.016647766	0.015406939	0.01618246	0.01695797	0.01721648

Comparación de los promedios de 6 h con los promedios obtenidos de tablas

6 hrs		2 h	3 h	4 h	6 h
6 h-1 h=	0.0136842	0.016647766	0.015406939	0.01618246	0.01695797
7 h-2 h=	0.012548058	0.016647766	0.015406939	0.01618246	0.01695797
8 h-3 h=	0.012371325	0.016647766	0.015406939	0.01618246	0.01695797
9 h-4 h=	0.010831221	0.016647766	0.015406939	0.01618246	0.01695797

comparación de los promedios de 4 h con los promedios calculados de tablas

4 h		2 h	3 h	4 h
4 h-1 h=	0.002852979	0.016647766	0.016647766	0.01618246
5 h-2 h=	0.001716837	0.016647766	0.016647766	0.01618246
6 h-3 h=	0.001540104	0.016647766	0.015406939	0.01618246

Comparación de los promedios de 3 h con los promedios obtenidos de tablas

3 h		2 h	3 h
3 h-1h=	0.001312875	0.016647766	0.016647766
4 h-2 h=	0.000176733	0.016647766	0.016647766

Comparación de los promedios de 2 h con los promedios obtenidos de tablas

2 h		2 h
2 h-1 h=	0.001136142	0.016647766

## Anexo 5

### Análisis de varianza para las cantidades totales de fenantreno permeadas en función del tiempo

tiempo	1 h	2 h	3 h	4 h	6 h	24 h
cantidad total	48.00053568	142.9131034	71.18566274	36.32193638	360.178426	126.8510781
en $\mu\text{g}$	339.8654637	310.5698732	162.8395915	234.4137071	241.176118	198.6411901
	381.3366269	104.3693552	197.9740694	123.3398293	418.664879	172.7389272

Análisis de varianza de un factor

#### RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	3	769.2026263	256.4008754	33002.99055
Columna 2	3	557.8523318	185.9507773	12018.84443
Columna 3	3	431.9993236	143.9997745	4285.029041
Columna 4	3	394.0754727	131.3584909	9858.311605
Columna 5	3	1020.019423	340.0064744	8180.745791
Columna 6	3	498.2311954	166.0770651	1321.740353

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	95653.03514	5	19130.60703	1.671582215	0.21574055	3.105874669
Dentro de los grupos	137335.3235	12	11444.61029			
Total	232988.3587	17				





x= datos

f =frecuencia

fa= frecuencia acumulada

fs= frecuencia acumulada / total de datos

ft= se obt a partir de z y de la tabla f del Daniel

z= (x-prom)/desvest

D= FS-FT valores  
absolutos

Dmax= es el maximo de D

Ho se acepta ho si Dmax es menor a N

si se considera el 99% de los datos estan dentro de una distribucion  
normal

Tablas de N (Daniel W. 1983)

Prueba unilateral					
p=	0.9	0.95	0.975	0.99	0.995
prueba bilateral					
p=	0.8	0.9	0.95	0.98	0.99
n=3	0.565	0.636	0.708	0.785	0.829