



Valencia 2021

Soraya Pontes López
Tesis doctoral

Desarrollo de métodos analíticos para evaluar la efectividad de cosméticos antipolución

Soraya Pontes López

Tesis doctoral

Programa de Doctorado en Técnicas

Experimentales en Química

Valencia, Junio 2021

Desarrollo de métodos analíticos para evaluar la efectividad de cosméticos antipolución


Directores

Sergio Armenta Estrela

Francesc Albert Esteve Turrillas



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

 Facultat de Química

Universitat de València
Departamento de Química Analítica
Campus de Burjassot-Paterna
46100 Burjassot, España

El Dr. D. Sergio Armenta Estrela, Profesor Titular de la Universitat y el Dr. D. Francesc A. Esteve Turrillas, Ayudante Doctor del Departamento de Química Analítica de la Universitat de València,

CERTIFICAN

Que Dña. Soraya Pontes López ha realizado la presente Tesis Doctoral titulada “Desarrollo de métodos analíticos para evaluar la efectividad de cosméticos antipolución” bajo su dirección en el Departamento de Química Analítica de la Universitat de València y autorizan su presentación para optar al Grado de Doctor en Técnicas Experimentales en Química.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firman la presente en Burjassot, junio de 2021.

SERGIO|
ARMENTA
|ESTRELA
Firmado digitalmente por
SERGIO|ARMENTA|
ESTRELA
Fecha: 2021.06.17
12:58:41 +02'00'

Dr. D. Sergio Armenta Estrela

FRANCESC
ALBERT|
ESTEVE|
TURRILLAS
Firmado digitalmente por
FRANCESC ALBERT|
ESTEVE|TURRILLAS
Fecha: 2021.06.17
11:54:14 +02'00'

Dr. D. Francesc A. Esteve Turrillas

“La disciplina acabará venciendo a la inteligencia”

A mi familia

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a todas aquellas personas que de una manera u otra han formado parte de esta etapa de mi vida y me han apoyado en todo momento, para finalmente alcanzar mis objetivos.

En primer lugar, dar las gracias a mis Directores de Tesis, Sergio Armenta Estrela y Francesc Albert Esteve Turrillas, por su esfuerzo y dedicación. Por orientarme, solventar mis dudas en todo momento, y sobre todo por haber confiado en mí dándome la oportunidad de formar parte de este proyecto. He aprendido muchísimo trabajando con vosotros, sin vuestro apoyo esto no habría sido posible.

Por supuesto, agradecer también a RNB S.L. por la financiación recibida para este proyecto. En concreto, agradecer a Ana González Illueca por haber sido la intermediaria entre RNB S.L. y la Universitat de València, orientándome y ayudándome a enfocar el trabajo de la mejor manera posible.

Agradecer a todas las personas que han ido formando parte del Departamento de Química Analítica de la Universitat de València (profesores, doctorandos, estudiantes, etc.), desde el inicio hasta el final de mi tesis, que han hecho que esta etapa sea más agradable. Os deseo que os vaya genial y alcancéis todo lo que os propongáis en vuestra vida.

A mis amigos, a los que no importa el tiempo que lleve sin ver, ni la distancia, y sin embargo sé que en cualquier momento puedo contar con ellos.

Finalmente, agradecer a mis padres, mi hermano, mis abuelos y al resto de mi familia, por haber estado ahí en todo momento, no solo en esta etapa sino a lo largo de toda mi vida. Todo es gracias a vosotros. ¡Somos y siempre seremos una piña!

De nuevo, ¡mil gracias a todos!

Soraya

Índice

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES..... 1

1. Contaminación atmosférica..... 3
 - 1.1. Efectos de la contaminación atmosférica sobre la salud humana 5
 - 1.2. Contaminantes perjudiciales del aire..... 9
2. Cámaras de simulación atmosférica..... 13
3. Evaluación de la exposición dérmica a contaminantes atmosféricos..... 23
 - 3.1. La piel..... 23
 - 3.2. Impacto de la contaminación ambiental sobre la piel..... 26
 - 3.3. Exposición dérmica..... 29
 - 3.4. Cinéticas de la absorción dérmica..... 31
 - 3.4.1. Absorción dérmica en condiciones de dosis infinita..... 32
 - 3.4.2. Absorción dérmica en condiciones de dosis finita..... 35
 - 3.5. Tipos de ensayos..... 38
 - 3.5.1. Ensayos *in vivo*..... 38
 - 3.5.2. Ensayos *in vitro*..... 46
4. Estudios de absorción de contaminantes perjudiciales del aire a través de la piel..... 54
5. Cosméticos antipolución..... 59
 - 5.1. Evaluación de la efectividad de cosméticos antipolución..... 63

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS..... 67

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS..... 71

1. Reactivos y materiales..... 73
2. Cámara de simulación..... 73
3. Estudios de absorción dérmica en la cámara de simulación..... 77
4. Evaluación de la efectividad de cosméticos anti-polución frente a compuestos orgánicos perjudiciales..... 78
5. Materias primas y cosméticos evaluados..... 78
6. Determinación de las propiedades físicoquímicas de los cosméticos evaluados..... 79
7. Determinación de compuestos orgánicos perjudiciales en la cámara de simulación mediante muestreo activo..... 80

8. Determinación de HAPs en la disolución receptora mediante GC-MS.....	81
9. Determinación de nicotina en la disolución receptora mediante LC-MS-MS.....	82
10. Determinación de HAPs y nicotina en membranas Strat-M® mediante TD-GC-MS.....	83
11. Determinación de los parámetros de absorción dérmica.....	83

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 85

1. Diseño, desarrollo y puesta a punto de la cámara de simulación.....	87
2. Evaluación de la absorción dérmica de BTEX en atmósferas contaminadas.....	94
2.1. Desarrollo y validación de métodos analíticos basados en HS-GC-MS para la determinación de BTEX.....	94
2.2. Características analíticas del procedimiento de HS-GC-MS.....	100
2.3. Estudio de las condiciones experimentales más apropiadas para realizar estudios de permeabilidad a través de simulantes de piel.....	101
2.3.1. Efecto del espesor y la naturaleza de la membrana en los parámetros de permeabilidad.....	101
2.3.2. Efecto de la concentración de BTEX en aire en los parámetros de permeabilidad.....	106
3. Evaluación de la absorción dérmica de VOCs y semiVOCs en atmósferas contaminadas.....	108
4. Evaluación de la efectividad de materias primas y cosméticos antipolución frente a HAPs.....	113
5. Evaluación de la cámara de simulación en condiciones de dosis finitas.....	128
5.1. Diseño y desarrollo de una máquina de fumar.....	129
5.2. Identificación de compuestos orgánicos presentes en el humo de tabaco en el interior de la cámara de simulación.....	131
5.3. Determinación de las condiciones de la cámara de simulación durante los procesos de combustión en condiciones finitas.....	133
5.4. Evaluación de la efectividad de cosméticos antipolución frente a compuestos presentes en humo de tabaco.....	135
5.4.1. Condiciones de dosis finitas.....	135
5.4.2. Condiciones de dosis semi-infinitas.....	140

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES..... 147

ANEXO..... 151

Abreviaturas

ABREVIATURAS

BTEX	Benceno, Tolueno, Etilbenceno, Xilenos / Benzene, Toluene, Ethylbenzene, Xylenes
CASC	Cámara de simulación atmosférica Cambridge / Cambridge Atmospheric Simulation Chamber
CEAM	Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo / Mediterranean Environmental Studies Center
CESAM	Cámara experimental de simulación atmosférica multifásica / Chambre Expérimentale de Simulation Atmosphérique Multiphasique
ChAMBRé	Cámara de modelado de aerosoles e investigación de bioaerosol / Chamber for Aerosol Modelling and Bio-aerosol Research
ECHA	Agencia Europea de Químicos / European Chemicals Agency
EESI-MS	Espectrometría de masas de ionización por electropulverización extractiva / Extractive Electrospray Ionisation Mass Spectrometry
EUPHORE	Fotorreactor europeo / European PHOto-Reactor
FTIR	Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier / Fourier-Transform Infrared spectroscopy
GC	Cromatografía de gases / Gas Chromatography
GC-FID	Cromatografía de gases-detección de ionización en llama / Gas Chromatography Flame Ionization Detector
GC-MS	Cromatografía de gases-espectrometría de masas / Gas Chromatography-Mass Spectrometry
HAPs	Contaminantes perjudiciales del aire / Hazardous Air Pollutants
H_{cc}	Constante de solubilidad adimensional de Henry / Henry's dimensionless solubility constant
HEM	Membranas epidérmicas humanas / Human Epidermic Membranes
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia / High Performance Liquid Chromatography
HS-SPME	Microextracción en fase sólida-espacio de cabeza / Headspace-Solid Phase MicroExtraction
J	Flujo molecular / Molecular flux
K_{ow}	Coefficiente de partición octanol-agua / Octanol-water partition coefficient

LASC	Cámara de simulación atmosférica Lusanne / Lusanne Atmospheric Simulation Chamber
LC-MS	Cromatografía líquida-espectrometría de masas / Liquid Chromatography- Mass Spectrometry
LOD	Límite de detección / Detection Limit
LOPAP	Fotómetro de absorción de recorrido largo / Long Path Absorption Photometer
LOQ	Límite de cuantificación / Quantification Limit
MDGC	Cromatografía de gases multidimensional / Gas Chromatography Multi-Dimensional
NCAR	Centro Nacional de Investigaciones Atmosféricas / National Center for Atmospheric Research
NNK	4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona / 4-(metilnitrosamine)-1-(3-piridil)-1-butanone
NNN	N'-nitrosोनornicotina / N'-nitroso-nornicotine
OECD	Organización para el Desarrollo Económico y Cooperativo / Organization for Economic and Cooperative Development
OMS	Organización Mundial de la Salud / World Health Organization
PAHs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos / Polycyclic Aromatic Hydrocarbon
PAMPA	Ensayos de permeabilidad de membrana artificial en paralelo / Parallel Artificial Membrane Permeability
PBS	Solución salina de tampón fosfato / Phosphate buffered saline
PDMS	Polidimetilsiloxano / Polydimethylsiloxane
PES	Poli éter sulfona / Polyethersulfone
PFA-PFTE	Perfluoroalcoxi-politetrafluoroetileno / Perfluoroalkoxy- polytetrafluoroethylene
PM	Material particulado / Particulate matter
POPs	Contaminantes orgánicos persistentes / Persistent Organic Pollutants
PTR-MS	Reacción de transferencia de protones-espectrometría de masas / Proton transfer reaction-mass spectrometry
PVC	Policloruro de vinilo / polyvinylchloride
ROS	Especies reactivas del oxígeno / Reactive Oxygen Species
RSD	Desviación estándar relativa / Relative Standard Deviation

SAPHIR	Simulación de fotoquímica atmosférica en una gran cámara de reacción / Simulation of Atmospheric PHotochemistry In a large Reaction Chamber
SEM	Microscopía electrónica de barrido / Scanning Electron Microscopy
SIFTMS	Espectrometría de masas de tubo de flujo iónico selectivo / Selected Ion Flow Tube Mas Spectrometry
SPF	Factor de protección solar / Sun protection factor
TCDD	Tetraclorodibenzo-p-dioxina / Tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TD-GC-MS	Desorción térmica-cromatografía de gases-espectrometría de masas / Thermal Desorption- Gas Chromatography-Mass Spectrometry
TEM	Microscopía electrónica de transmisión / Transmission Electron Microscopy
t_{lag}	Tiempo de latencia / Lag time
TSC	Cámara de esmog de Tsinghuan / Tsinghuan Smog Chamber
UE	Unión Europea / European Union
US EPA	Agencia de protección medioambiental de los Estados Unidos / United States Environmental Protection Agency
UV	Ultravioleta / Ultraviolet
VERAM	Monitor atmosférico versátil, fácil y rápido / Versatile, Easy and Rapid Atmospheric Monitor
VOCs	Compuesto orgánicos volátiles / Volatile Organic Compounds

Capítulo 1: Introducción y antecedentes

1. Contaminación atmosférica

La contaminación atmosférica consiste en la presencia de sustancias nocivas en el aire que pueden provocar efectos adversos sobre la salud humana y el medio ambiente.¹ Es un problema de carácter tanto local, cuando los efectos ligados al foco se sufren en las inmediaciones del mismo; como global, cuando provoca efectos negativos tanto en la zona del foco de emisión como en zonas más alejadas.²

Según su origen, los contaminantes atmosféricos se clasifican en antropogénicos, procedentes de la actividad humana, principalmente del transporte, la producción de energía y las actividades industriales; o naturales, derivados de procesos de la naturaleza, como erupciones volcánicas, incendios forestales, procesos biológicos, etc.³ Las fuentes naturales provocan una mayor contaminación que las antropogénicas, sin embargo, tienen una importancia relativamente baja sobre la salud y el bienestar. Esto se debe a que generalmente estas fuentes de emisión se encuentran alejadas de las grandes poblaciones, y suelen ser transitorias. En cambio, las fuentes de contaminación antropogénicas han sido y continúan siendo un grave problema para la salud. La contaminación producida por estas fuentes, habitualmente suele darse de forma muy localizada, siendo el nivel de exposición mayor cuanto más cerca se encuentre el individuo del foco de la emisión.⁴ Sin embargo, el viento puede expandir estos contaminantes lejos del punto de origen, por lo que su concentración se diluirá a medida que se mezcle con el aire al alejarse del foco. La calidad del aire de las áreas urbanas depende en gran medida de las condiciones atmosféricas, la radiación solar, la temperatura, factores meteorológicos y geográficos, y las emisiones de contaminantes.^{5,6}

¹ Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, Gobierno de España. <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfera-y-calidad-del-aire/calidad-del-aire/salud/> Acceso febrero de 2021.

² Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, Gobierno de España. <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfera-y-calidad-del-aire/emisiones/prob-amb/> Acceso febrero de 2021.

³ Agencia Europea de Medio Ambiente (AEMA), 2020 <https://www.eea.europa.eu/es/themes/air/intro> Acceso enero de 2021.

⁴ Conselleria d'Agricultura, Desenvolupament Rural, Emergència Climàtica i Transició Ecològica, Generalitat Valenciana, 2015 <http://www.agroambient.gva.es/es/web/calidad-ambiental/la-contaminacion-atmosferica> Acceso enero de 2021.

⁵ Bourar, I., Wang, X., Brasseur, G. P. Air Pollution in Eastern Asia: An Integrated Perspective, Springer; 2017.

⁶ Koohgoli, R., Hudson, L. Naidoo, K. et al. Bad air gets under your skin. *Experimental Dermatology*. 2017; 26(5):384-387.

Los principales contaminantes atmosféricos son los óxidos de azufre, nitrógeno y carbono (SO_x, NO_x, CO_x), el ozono (O₃), los compuestos orgánicos volátiles (VOCs de sus siglas en inglés), los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), los metales y sus compuestos (Pb, Ni, etc.), el material particulado (partículas gruesas PM₁₀ y partículas finas PM_{2.5}), los halógenos y sus compuestos, etc.^{7, 8}.

Los SO_x provienen principalmente de procesos de quema de combustibles fósiles como el carbón y derivados del petróleo. También se libera de forma natural en determinados procesos volcánicos y de descomposición.⁷ Los NO_x también poseen un origen principalmente antropogénico. Proviene de la oxidación del nitrógeno atmosférico a alta temperaturas. Los focos emisores generalmente producen NO₂ y NO que con el tiempo se oxida a NO₂. Son gases emitidos principalmente por vehículos de transporte en general, así como en instalaciones industriales de alta temperatura y de generación eléctrica.⁹ El CO proviene del consumo de combustibles con carbono en su composición, como gas, petróleo, carbón, madera, etc., en condiciones donde la cantidad de oxígeno no es suficiente como para formar CO₂. La fuente antropogénica más importante es la que proviene de las emisiones de vehículos.¹⁰ Los VOCs proceden de fuentes naturales y antropogénicas, principalmente por el uso de disolventes y otros productos en el sector industrial, así como por la combustión incompleta de combustibles de vehículos.¹¹ Los PAHs, formados por la unión de dos o más anillos aromáticos dispuestos en varias configuraciones, se generan como resultado de la combustión incompleta de materiales orgánicos, como los combustibles fósiles, tabaco, etc.,. Generalmente se adsorben en partículas finas presentes en el aire o se depositan en el suelo.^{12, 13} El ozono y el material particulado presentes en la atmósfera, son unos de los contaminantes más preocupantes con respecto a la salud, ya que la

⁷ Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, Gobierno de España <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfera-y-calidad-del-aire/calidad-del-aire/salud/> Acceso febrero de 2021.

⁸ de la Guardia, M., Armenta, S. The Quality of Air, Comprehensive Analytical Chemistry, Elsevier; 2016.

⁹ Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. 1998.

¹⁰ Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. Resumen de Salud Pública. Monóxido de Carbono. 2012

¹¹ Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible, Junta de Andalucía. <http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/portalweb/menutem.7e1cf46ddf59bb227a9ebe205510e1ca/?vgnnextoid=88b782cb6b666110VgnVCM1000000624e50aRCRD&vgnnextchannel=36e08c43b07d4310VgnVC M1000001325e50aRCRD> Acceso febrero de 2021.

¹² Olsson, A. C., Fevotte, J., Fletcher, T., et al. Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and lung cancer risk: a multicenter study in Europe. *Occupational & Environmental Medicine*. 2009; 67(2):98-103.

¹³ Kim, K. H., Jahan, S. A., Kabir, E., et al. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environmental International*. 2013; 60:71-80.

exposición a los mismos puede provocar desde problemas respiratorios leves a alergias o incluso mortalidad prematura. El ozono no se emite directamente, sino que se transforma a partir de la reacción de VOCs y NOx en presencia de luz solar.¹⁴ El material particulado consiste en una mezcla compleja de partículas sólidas y líquidas de sustancias orgánicas e inorgánicas suspendidas en el aire. Pueden emitirse directamente a la atmósfera o formarse en ella a partir de gases como el dióxido de azufre (SO₂), los NOx, el amoníaco y los VOCs principalmente.¹⁵ Los contaminantes orgánicos persistentes (POPs de sus siglas en inglés) tienen una elevada permanencia en el medio ambiente por ser resistentes a la degradación, y generalmente suelen ser compuestos organoclorados. Por otro lado, la peligrosidad de los metales pesados reside en que no pueden ser degradados y tienden a bioacumularse, provocando efectos tóxicos de diverso carácter. Las principales fuentes emisoras son el transporte, industrias cementeras, instalaciones de combustión, etc.¹⁶ Los compuestos orgánicos halogenados generalmente provienen de industrias como la del papel, donde se emplean compuestos clorados para el blanqueo de las fibras de celulosa; en la producción de policloruro de vinilo (PVC), donde se emplea 1,2-dicloroetano como precursor principal; también se generan en desinfecciones de agua utilizando cloro, etc.¹⁷

1.1. Efectos de la contaminación atmosférica sobre la salud humana

El desarrollo industrial y la globalización han generado numerosos beneficios y mejoras en la calidad de vida. Sin embargo, como resultado de ello se ha producido un aumento de la contaminación atmosférica lo que ha desembocado en la aparición de nuevos riesgos para la salud y el medio ambiente.¹⁸ El cuerpo humano puede exponerse a los contaminantes a través de tres rutas: la inhalación que es la vía más directa y rápida de exposición a sustancias tóxicas, la ingestión que suele

¹⁴ Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible, Junta de Andalucía. <http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/portalweb/menuitem.7e1cf46ddf59bb227a9ebe205510e1ca/?vgnextoid=88b782cb6b666110VgnVCM100000624e50aRCRD&vgnnextchannel=36e08c43b07d4310VgnVC M1000001325e50aRCRD> Acceso febrero de 2021.

¹⁵ Organización Mundial de la Salud [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health) Acceso febrero de 2021.

¹⁶ Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, Gobierno de España. https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfera-y-calidad-del-aire/emisiones/prob-amb/metales_pesados.aspx Acceso febrero 2021.

¹⁷ Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. <http://www.prtr-es.es/Compuestos-Organicos-Halogenados-AOX,15627,11,2007.html> Acceso febrero 2021.

¹⁸ Vargas Marcos, F. La contaminación ambiental como factor determinante de la salud. *Revista Española de Salud Pública*. 2005; 79(2):117-127.

ocurrir de forma accidental o inadvertida, y la exposición dérmica, siendo ésta última la vía más común de exposición a sustancias tóxicas.¹⁹

Contaminantes como el ozono, los NO_x, SO_x, PM₁₀ y PM_{2.5} están relacionados con la aparición de numerosas enfermedades como cáncer, problemas cardiorrespiratorios, asma, alergias, etc.²⁰ Además, la continua exposición a elevados niveles de polución puede tener efectos adversos sobre la piel, entre ellos el envejecimiento prematuro, aparición de manchas, dermatitis atópica, eccemas, inflamación, incremento de alergias, etc., e incluso problemas más graves como el cáncer de piel.²¹ Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente el 90 % de las personas de todo el mundo respiran aire contaminado, y siete millones de personas mueren cada año de forma prematura por la contaminación ambiental.²²

La especie más común de los óxidos de azufre en la atmósfera es el SO₂. Este compuesto puede provocar efectos negativos sobre la salud, como inflamación e irritación del sistema respiratorio, aumento de la posibilidad de contraer infecciones en el sistema respiratorio, tos, agravamiento del asma y la bronquitis crónica, además de causar irritación ocular.²⁰ Estudios realizados por la OMS, indican que un porcentaje de las personas con asma sufren cambios en la función pulmonar y síntomas respiratorios tras períodos de exposición al SO₂ de tan solo 10 minutos, por lo que recomienda evitar la exposición a concentraciones de este compuesto superiores a los 500 µg m⁻³ durante períodos promedio superiores a 10 minutos.²³

En zonas urbanas, generalmente más de 75 % del NO₂ en el aire proviene del tráfico. Teniendo en cuenta que los habitantes de ciudades viven muy próximos a éste, aunque en cantidad estas emisiones sean inferiores a las de otras fuentes, la

¹⁹ Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2019 https://www.atsdr.cdc.gov/es/training/toxicology_curriculum/modules/2/es_lecturenotes.html Acceso enero 2021.

²⁰ Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, Gobierno de España <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfera-y-calidad-del-aire/calidad-del-aire/salud/> Acceso febrero de 2021.

²¹ Kim, K. E., Cho, D., Park, H. J. Air pollution and skin diseases: Adverse effects of airborne particulate matter on various skin diseases. *Life Sciences*. 2016; 152:126-134.

²² Organización Mundial de la Salud, 2018 <https://www.who.int/es/news/item/02-05-2018-9-out-of-10-people-worldwide-breathe-polluted-air-but-more-countries-are-taking-action#:~:text=La%20OMS%20estima%20que%20cerca,%2C%20cardiopata%20c%3%A1ncer%20e%20pulm%C3%B3n%2C> Acceso enero de 2021.

²³ Organización Mundial de la Salud [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health) Acceso febrero de 2021.

importancia sobre sus efectos en la salud humana en ciudades es muy superior.²⁴ La exposición de corta duración a NO₂ a concentraciones superiores a 200 mg m⁻³ resulta tóxica, provocando una importante inflamación de las vías respiratorias. Algunos estudios han demostrado que los síntomas de bronquitis en niños asmáticos aumentan con la exposición prolongada al NO₂, además, en ciudades europeas y norteamericanas, la exposición a este compuesto se asocia a la disminución del desarrollo de la función pulmonar.²⁵

Respecto a los posibles efectos del CO, dependiendo de los niveles de concentración de éste, puede causar dolor de cabeza, náuseas, vómitos, mareo, daños permanentes en el corazón y el cerebro, etc.²⁶

Los VOCs suponen un riesgo para la salud ya que, debido a su carácter volátil, estos compuestos se evaporan rápidamente a la atmósfera, pudiendo introducirse en el interior del organismo mediante absorción dérmica o por inhalación alcanzando el torrente sanguíneo. Al tratarse de compuestos liposolubles, una vez pasan a la sangre, tienden a acumularse en los tejidos grasos distribuyéndose por los distintos órganos, lo que puede suponer un riesgo considerable para la salud. Además, algunos estudios han demostrado que la exposición crónica a los VOCs, puede provocar lesiones neurológicas, así como efectos psiquiátricos, como irritabilidad, dificultades de concentración, etc.^{27, 28}

La exposición a altos niveles de PAHs puede provocar síntomas a corto plazo como irritación ocular, náuseas, etc., además también se sabe que las mezclas de PAHs causan irritación e inflamación de la piel. Sin embargo, la exposición prolongada a estos compuestos puede provocar problemas de salud como cáncer de piel,

²⁴ Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, Gobierno de España <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfera-y-calidad-del-aire/calidad-del-aire/salud/> Acceso febrero de 2021.

²⁵ Organización Mundial de la Salud [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health) Acceso febrero de 2021.

²⁶ Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. Resumen de Salud Pública. Monóxido de Carbono. 2012

²⁷ Reinhartz, A. Cognitive Impairment and Olfactory Panic From Occupational Exposure to VOCs. *American Journal of Industrial Medicine*. 2006; 49:862-864.

²⁸ Gong, Y., Wei, Y., Cheng, J., et al. Health risk assessment and personal exposure to Volatile Organic Compounds (VOCs) in metro carriages-A case study in Shanghai China. *Science of The Total Environment*. 2017; 574:1432-1438.

pulmón, vejiga y gastrointestinal. Además, diferentes estudios en animales han demostrado que podrían provocar problemas reproductivos e inmunológicos.^{29, 30}

El exceso de O₃ en el aire puede provocar efectos adversos sobre la salud, como problemas respiratorios, asma, reducir la función pulmonar y originar enfermedades pulmonares. Por ello, el límite máximo recomendado en las Directrices de la OMS sobre la Calidad del Aire es de 100 µg m⁻³.³¹

La presencia de material particulado en la atmósfera se encuentra estrechamente relacionada con el aumento de la mortalidad o morbilidad diaria y a largo plazo. Si bien las partículas con un diámetro de 10 µm o menos (\leq PM₁₀) poseen la capacidad de penetrar hasta el interior de los pulmones, existen otras partículas aún más dañinas para la salud, con un diámetro de 2.5 µm o menos (\leq PM_{2.5}). Éstas últimas son capaces de atravesar la barrera pulmonar y alcanzar el torrente sanguíneo, aumentando el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares y respiratorias, así como cáncer de pulmón. Por ello, la OMS recomienda no superar exposiciones de 10 µg m⁻³ de media anual para el caso de PM_{2.5}, y 20 µg m⁻³ para el caso de PM₁₀.³¹

Varios estudios han demostrado que los metales pesados y los contaminantes orgánicos persistentes afectan al funcionamiento de los seres vivos y a su reproducción.³² Los halógenos y sus compuestos pueden provocar efectos nocivos sobre la salud humana como cansancio, daños en el sistema nervioso, el hígado, los riñones y los pulmones.^{33, 34}

²⁹ Olsson, A. C., Fevotte, J., Fletcher, T., et al. Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and lung cancer risk: a multicenter study in Europe. *Occupational & Environmental Medicine*. 2009; 67(2):98-103.

³⁰ Kim, K. H., Jahan, S. A., Kabir, E., et al. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environmental International*. 2013; 60:71-80.

³¹ Organización Mundial de la Salud [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health) Acceso febrero de 2021.

³² Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, Gobierno de España <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfera-y-calidad-del-aire/emisiones/prob-amb/> Acceso febrero de 2021.

³³ Hughes, K., Meek, M. E., Caldwell, I. 1,2-dichloroethane: Evaluation of risks to health from environmental exposure in Canada. *Critical Reviews in Microbiology*. 2012; 38(2):95-110.

³⁴ Chou, S. Toxicological Profile for Chloroform. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1993.

1.2. Contaminantes perjudiciales del aire

Se consideran contaminantes dañinos o perjudiciales del aire (HAPs de sus siglas en inglés) aquellos que causan un efecto adverso sobre la salud y el medioambiente. Actualmente, los gobiernos y las agencias internacionales están cada vez más preocupados por la contaminación ambiental.³⁵ En la Unión Europea (UE) se adoptó un reglamento (REACH) para afrontar la problemática de la contaminación atmosférica, con el fin de mejorar la protección de la salud humana y el medio ambiente frente a los riesgos derivados de sustancias químicas, y potenciar también la competitividad de la industria química en la UE. Las empresas deben identificar y gestionar los riesgos asociados a las sustancias empleadas, y demostrar a la Agencia Europea de Químicos (ECHA) cómo se pueden utilizar dichas sustancias de forma segura.³⁶ Además, en la UE se han fijado límites para algunos de estos compuestos que se encuentran dispersados en la atmósfera y pueden causar efectos nocivos. Esto queda reflejado en leyes como la Directiva de 2008 relativa a la calidad del aire ambiente y a una atmósfera más limpia en Europa (2008/50/CE), y la Directiva marco de 1996 sobre evaluación y gestión de la calidad del aire ambiente (96/62/EC).^{37, 38}

Los contaminantes atmosféricos se pueden clasificar principalmente en dos tipos: i) contaminantes atmosféricos de criterio, entre los que se incluyen ozono, CO, material particulado, plomo y SOx y NOx; y ii) HAPs, relacionados con las emisiones de fuentes específicas.³⁹

Para los contaminantes de criterio se ha establecido un límite máximo permisible de concentración en el aire, con el fin de proteger la salud humana y asegurar el bienestar de la población.⁴⁰ Para algunos de estos contaminantes, como el ozono,

³⁵ European Environment Agency, 2017 <https://www.eea.europa.eu/themes/air/intro> Acceso noviembre 2020.

³⁶ European Chemical Agency <https://echa.europa.eu/es/regulations/reach/understanding-reach> Acceso febrero 2021.

³⁷ Agencia Europea de Medio Ambiente. La legislación europea en relación con el aire. 2016.

³⁸ Comisión Económica de las Naciones Unidas para Europa <https://unece.org/environment-policy/air> Acceso febrero 2021.

³⁹ Vandenberg, J. J. Chapter 8: Hazardous air pollutants: Approaches and challenges in identifying assessment priorities. En: Straif, K., Cohen, A., et Samet, J. Air Pollution and Cancer. IARC Scientific Publication No. 161; 2013. p. 95-99.

⁴⁰ Gobierno de México. <https://www.gob.mx/cofepris/acciones-y-programas/2-clasificacion-de-los-contaminantes-del-aire-ambiente> Acceso febrero 2021.

el material particulado y el plomo se ha demostrado que poseen la capacidad de aumentar el riesgo de padecer cáncer.^{41, 42, 43}

Los HAPs son compuestos en estado gaseoso o adsorbidos a partículas presentes en el aire a concentraciones bajas, pero caracterizados por ser altamente nocivos para la salud humana y cuyos efectos, agudos o crónicos, pueden presentarse a corto o largo plazo respectivamente.⁴⁴ La Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (US EPA) ha creado una lista con más de 150 contaminantes, que incluye sustancias que causan cáncer y generan efectos adversos neurológicos, respiratorios y reproductivos.⁴⁵ Dentro de estos compuestos podemos encontrar el benceno, tricloroetileno, mercurio, cromo, dioxinas, etc. En algunos casos, se han realizados estudios en trabajadores expuestos a elevados niveles de concentración de HAPs, para evaluar sus efectos sobre la salud. Por ejemplo, se ha determinado que, compuestos como el benceno,⁴⁶ 1,3-butadieno,⁴⁷ cromo,^{48, 49} níquel⁵⁰ y el cloruro de vinilo⁵¹ poseen un elevado potencial carcinógeno. También, la exposición al diisocianato de tolueno y al manganeso se ha asociado a efectos negativos sobre los pulmones y efectos neurológicos adversos respectivamente.^{52, 53} Sin embargo, para la mayoría de HAPs existen muy pocos o ningún estudio con humanos, de manera que la información sobre sus efectos sobre la salud proviene de estudios llevados a cabo con animales. Por ejemplo, algunos HAPs como los

⁴¹ Bell, M. L., McDermott, A., Zeger, S.L., et al. Ozone and short-term mortality in 95 US urban communities. *JAMA*. 2004; 292(1):2372-2378.

⁴² Pope, C. A., Burnett, R. T., Thun, M. J., et al. Lung Cancer, Cardiopulmonary Mortality, and Long-term Exposure to Fine Particulate Air Pollution. *JAMA*. 2002; 287(9):1132-1141.

⁴³ National Toxicology Program. U. S. Department of Health and Human Services; 2004 <https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/content/profiles/lead.pdf> Acceso enero 2021.

⁴⁴ Ballester Díez, F., Tenías, J. M., Pérez-Hoyos, S. Efectos de la contaminación atmosférica sobre la salud: Una introducción. *Revista Española de Salud Pública*. 1999; 73:109-121.

⁴⁵ U. S. Environmental Protection Agency, 2020. <https://www.epa.gov/haps/initial-list-hazardous-air-pollutants-modifications#mods> Acceso febrero 2021.

⁴⁶ Wilbur, S., Keith, S., Faroon, O., et al. Toxicological Profile for Benzene. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2005.

⁴⁷ Ashizawa, A., Roney, N., Tucker, P. G., et al. Toxicological Profile for 1,2-butadiene. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2009.

⁴⁸ Wilbur, S., Abadin, H., Fay, M., et al. Toxicological Profile for Chromium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2008.

⁴⁹ International Agency for Research on Cancer (IARC). Chromium and Chromium Compounds. Summaries & Evaluation. 1990; 49:49.

⁵⁰ Fay, M., Wilbur, S., Abadin, H., et al. Toxicological Profile for Nickel. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2004.

⁵¹ Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. 1998.

⁵² Williams, M., Todd, G. D., Taylor, J., et al. Toxicological Profile for toluene diisocyanate and methylenediphenyl diisocyanate. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2015.

⁵³ Williams, M., Todd, G. D., Roney, N., et al. Toxicological Profile for Manganese. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2008.

PAHs,⁵⁴ el acetaldehído,⁵⁵ el tetracloruro de carbono⁵⁶ y el 1,2-dicloroetano,^{57, 58} se consideran carcinógenos para los humanos, basándose en los resultados obtenidos en estudios a largo plazo realizados con animales de experimentación. Aunque una gran parte de los HAPs poseen un elevado potencial carcinógeno, también hay compuestos para los que no hay evidencia de que posean dicho efecto sobre la salud humana, bien porque no se han realizado estudios relevantes o porque se han realizado estudios que no indican potencial carcinogénico. Por ejemplo, la acroleína provoca efectos nocivos para la salud distintos al cáncer, como problemas respiratorios, irritación de los ojos, nariz y garganta, etc.⁵⁹

Los HAPs provienen principalmente de fuentes específicas como industrias, emisiones de vehículos y usos domésticos. Una de las principales fuentes de emisión “doméstica” es la relativa al humo del tabaco y las transformaciones que ocurren durante su combustión. Parte de este interés está en la composición del humo del tabaco, ya que durante su combustión se originan más de 4000 productos tóxicos diferentes, algunos de ellos capaces de provocar enfermedades como el cáncer de pulmón.⁶⁰ Entre ellos destacan los alquitrans, el CO, compuestos irritantes como fenoles, amoníaco, etc., y la nicotina.⁶¹ Los alquitrans contienen PAHs, aminas aromáticas, BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos), etc. en su composición, y son responsables de distintos tipos de cáncer.⁶² El CO favorece el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.⁶³ Los compuestos irritantes tienen la capacidad de provocar enfermedades respiratorias.⁶⁴ Un compuesto procedente

⁵⁴ Watson, A. Y., Bates, R. R., et Kennedy, D. Air Pollution, the Automobile, and Public Health, National Academy Press, 1988.

⁵⁵ U. S. Environmental Protection Agency; 2017

https://cfpub.epa.gov/ncea/iris2/chemicalLanding.cfm?substance_nmbr=290 Acceso febrero 2021.

⁵⁶ Faroon, O., Taylor, J., Roney, N., et al. Toxicological Profile for Carbon Tetrachloride. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2003.

⁵⁷ Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATRDS), 2016

https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts38.html#bookmark4 Acceso enero 2021.

⁵⁸ Hughes, K., Meek, M. E., Caldwell, I. 1,2-Dichloroethane: Evaluation of risks to health from environmental exposure in Canada. Critical Reviews in Microbiology. 2012;38(2):95-110.

⁵⁹ Roney, N., Taylor, J., Ashizawa, A., et al. Toxicological profile for acrolein. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2005.

⁶⁰ Organización Mundial de la Salud; 2012 <https://www.who.int/features/qa/60/es/> Acceso febrero 2021.

⁶¹ Ministerio de Sanidad, Gobierno de España

<https://pnsd.sanidad.gob.es/ciudadanos/informacion/tabaco/home.htm> Acceso febrero 2021.

⁶² Meyers, T. J., Chang, S. C., Chan, P. Y., et al. Case-control study of cumulative cigarette tar exposure and lung and upper aerodigestive tract cancers. International Journal of Cancer. 2017; 140:2040-2050.

⁶³ Liu, C., Yin, P., Chen, R., et al. Ambient carbón monoxide and cardiovascular mortality: a nationwide time-series analysis in 272 cities in China. The Lancet Planetary Health. 2018; 2(1):e12-e18.

⁶⁴ Raza, W., Lee, J., Raza, N., et al. Removal of phenolic compounds from industrial waste wáter base don membrane-based technologies. Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 2019; 71:1-18.

del humo del tabaco de especial importancia es la nicotina, debido a su elevada capacidad adictiva. Ésta puede entrar en el cuerpo tanto por inhalación de humo, como por ingestión o dérmicamente.⁶⁵

Algunos de los compuestos del humo del tabaco, como los PAHs, fitoesteroles, metales, nicotina y nitrosaminas los podemos encontrar en la fase particulada. Otros como el CO, CO₂, 1,3-butadieno, amoníaco, acetona, formaldehído y acetaldehído, benceno, etc. forman parte de la fase gaseosa. Mientras que ciertos compuestos semivolátiles, como los fenoles y los cresoles están repartidos entre la fase de partículas y la gaseosa.⁶⁶

Esta Tesis se centra en la evaluación de la efectividad de cosméticos antipolución frente a dos casos particulares de HAPs: uno más general como son los VOCs, y otro más específico como serían los compuestos presentes en el humo del tabaco.

⁶⁵ Wittenberg, R. E., Wolfman, S. L., De Biasi, M., et al. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotine addiction: A brief introduction. *Neuropharmacology*. 2020; 177:1-8.

⁶⁶ Thielen, A., Klux, H., Müller, L. Tobacco smoke: Unraveling a controversial subject. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2008; 60:141-156.

2. Cámaras de simulación atmosférica

Las cámaras de simulación atmosférica, son herramientas donde las condiciones atmosféricas se pueden controlar y monitorear en tiempo real durante periodos suficientemente largos como para imitar entornos de forma realista y estudiar distintos procesos atmosféricos.⁶⁷ Proporcionan un ambiente controlado pero próximo a situaciones reales, que simula las condiciones atmosféricas, por lo que permiten realizar ensayos reproducibles y obtener resultados en un margen de tiempo corto. Además, la capacidad de definir más claramente el tipo de alteración y controlar cada variable de forma independiente, facilita la interpretación de estos resultados.⁶⁸ Existen diversos tipos de ensayos realizados en cámaras de simulación atmosférica. Se pueden clasificar según el grado de aceleración de las alteraciones en: ensayos de imitación, donde se intenta reproducir las condiciones atmosféricas, evitando la aleatoriedad de las mismas; y ensayos acelerados, en los que se intensifica alguna variable con objeto de acortar la duración del ensayo. Por otro lado, dependiendo de si la atmósfera simulada se renueva de forma continua o no, los ensayos se pueden clasificar en: ensayos estáticos, en los que se genera una atmósfera al principio de la experiencia y no se renueva durante todo el ensayo; y ensayos dinámicos, en los que se establece un flujo permanente de gas a través de la cámara de exposición.⁶⁹

Existen numerosos estudios en los que se emplean cámaras de simulación atmosférica, que varían según los objetivos de la investigación para la cual está destinada.

Uno de los modelos más simples para obtener cámaras de simulación fue la empleada en el desarrollo de un monitor atmosférico, versátil, fácil y rápido (VERAM de sus siglas en inglés), de la Universitat de València (España).^{70, 71} La aplicación principal de esta cámara se centra en el desarrollo de una metodología

⁶⁷ Massabò, D., Danelli, S. G., Brotto, P., et al. ChAMBRé: a new atmospheric simulation Chamber for Aerosol Modelling and Bio-aerosol Research. *Atmospheric Measurement Techniques*. 2018; 11:5885-5900.

⁶⁸ Barnes, I., Rudzinski, K. J. *Environmental Simulation Chambers: Application to Atmospheric Chemical Processes*, Springer; 2004.

⁶⁹ Vale, J., Martin, A. Ensayos de materiales en atmósferas simuladas. I. Criterios para el diseño de sistemas de simulación. *Materiales de Construcción*. 1983; 33(189):57-75.

⁷⁰ Ly-Verdú, S., Esteve-Turrillas, F. A., Pastor, A. et al. A passive sampling-based analytical strategy for the determination of volatile organic compounds in the air of working areas. *Analytical Chimic Acta*. 2010; 98:141-154.

⁷¹ Esteve-Turrillas, F. A., Ly-Verdú, S., Pastor, A. Development of a versatile, easy and rapid atmospheric monitor for benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes determination in air. *Journal of Chromatography A*. 2009; 1216:8549-8556.

para el muestreo de contaminantes atmosféricos. Para ello, emplean cámaras de simulación que consisten en envases de vidrio de 2.85 ± 0.01 L. Para generar una atmósfera contaminada de VOCs, se añade un volumen determinado de disolución patrón de estos contaminantes en hexadecano sobre una pieza de papel de filtro de 2 cm^2 y se coloca en el interior del envase de vidrio con un muestreador VERAM. Considerando que la evaporación es completa, la concentración de VOCs obtenida en la atmósfera generada en el interior del recipiente se calcula teniendo en cuenta la concentración y el volumen añadido de la disolución estándar, así como el volumen de la cámara de simulación.^{72, 73}

THALAMOS es una cámara de simulación atmosférica, desarrollada en la Universidad de Lille (Francia), que permite estudiar reacciones desarrolladas en su interior.⁷⁴ Cuenta con un volumen de 0.6 m^3 , regulada térmicamente siendo capaz de operar en el intervalo de temperatura entre -40 y 100 °C. Consta principalmente de 3 compartimentos: una jaula termostática, una cámara de teflón unida a un marco de aluminio y múltiples técnicas de detección complementarias en línea, como la espectrometría de masas de tubo de flujo iónico selectivo (SIFTMS), espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) y cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), las cuales permiten la monitorización en línea de reactivos y productos. La cámara de teflón está equipada con 4 ventiladores que permiten la homogenización del aire de su interior. Además, contiene una serie de puertos que permiten la introducción controlada de compuestos mediante distintos métodos de inyección dependiendo del estado (líquido o gaseoso) y la volatilidad de las especies introducidas. La jaula termostática está equipada con un sistema de irradiación de luz capaz de albergar hasta 20 lámparas. Esto permite utilizar esta cámara para estudiar cualquier proceso inducido en la fase gaseosa, como la fotólisis de compuestos interés.⁷⁴

Con el fin de simular las reacciones fotoquímicas para la evaluación y mejora de la calidad del aire en Pekín, se ha desarrollado en la Universidad de Taiwán (China) una cámara de simulación atmosférica de esmog, (TSC, Tsinghuan Smog Chamber).

⁷² Ly-Verdú, S., Esteve-Turrillas, F. A., Pastor, A. et al. A passive sampling-based analytical strategy for the determination of volatile organic compounds in the air of working áreas. *Analytical Chimic Acta*. 2010; 98:141-154.

⁷³ Esteve-Turrillas, F. A., Ly-Verdú, S., Pastor, A. Development of a versatile, easy and rapid atmospheric monitor for benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes determination in air. *Journal of Chromatography A*. 2009; 1216:8549-8556.

⁷⁴ Osseiran, N., Romanias, M. N., Gaudion, V., et al. Development and validation of a thermally regulated atmospheric simulation chamber (THALAMOS): A versatile tool to simulate atmospheric processes. *Journal of Environmental Sciences*. 2020; 95:141-154.

La instalación cuenta con un sistema de reacción unido mediante conexiones de teflón a un sistema de introducción de reactivos, y a una serie de instrumentos, entre ellos un cromatógrafo de gases con detector de ionización en llama (GC-FID), sensores de temperatura y humedad, analizadores de NO_x, CO y O₃, un medidor de partículas y un radiómetro UV, que permiten el muestreo, la detección y el control automático de las condiciones experimentales. Se encuentra situada en una sala con temperatura controlada en el rango de 10-60 °C. El reactor fotoquímico posee un volumen de 2 m³, y está formado por láminas de teflón de 50 µm de espesor, rodeadas por un marco de aluminio (2 m x 1 m x 1 m). Las láminas de teflón poseen un alto grado de transparencia y son químicamente inertes con respecto a la exposición cercana a los rayos UV. La cámara está rodeada por cuarenta lámparas de luz negras, que permiten simular la luz solar, y se sitúan a unos 35 cm de las láminas de teflón para evitar el calentamiento de las mismas. Están divididas en 4 grupos controlados por separado, lo que permite ajustar la intensidad de la luz desde el nivel 0 (sin luz) al nivel 4 (los 4 grupos activados). Para maximizar la intensidad de la luz en la cámara, el reactor se encuentra rodeado de láminas de acero inoxidable. El sistema de gas incluye aire purificado, gases reactivos (NO, NO₂, CO y propileno) y gas estándar (NO, CO, propileno y tolueno) para calibración, y se encuentra conectado al reactor a través de conexiones de teflón, válvulas y flujómetros que permiten controlar el flujo de cada uno de los gases suministrados. El sistema de aerosoles incluye un atomizador y un generador de aerosol de grafito que permiten producir aerosoles con un tamaño medio de partícula entre 0.02 y 0.30 µm, y suministrar partículas de carbono de tamaño nanométrico, para los experimentos de esmog.⁷⁵

ChAMBRe (Chamber for Aerosol Modelling and Bio-aerosol Research) es una instalación diseñada específicamente para la investigación sobre bioaerosol atmosférico, es decir, un aerosol formado por componentes vivos (bacterias, virus, hongos, etc.) e inertes, capaz de provocar efectos adversos sobre la salud. Esta cámara de simulación ha sido desarrollada en la Universidad de Génova (Italia).⁷⁶ Se emplea generalmente para la evaluación de bacterias ya que tienen un impacto considerable en la salud y el medio ambiente. La cámara está hecha de acero inoxidable y tiene un volumen total de 2.2 m³, una altura de 2.9 m y 1 m de

⁷⁵ Shan, W. U., Zifeng, L. Ú. Jiming, H. A. O., et al. Construction and Characterization of an Atmospheric Simulation Smog Chamber. *Advances in Atmospheric Sciences*. 2017; 24(2):250-258.

⁷⁶ Massabò, D., Danelli, S. G., Brotto, P., et al. ChAMBRe: a new atmospheric simulation Chamber for Aerosol Modelling and Bio-aerosol Research. *Atmospheric Measurement Techniques*. 2018; 11:5885-5900.

diámetro. Se divide en tres partes: dos cilindros abovedados conectados por un anillo central de 50 cm de altura. Esta estructura se mantiene en posición vertical mediante una estructura metálica. En su interior cuenta con un ventilador que permite la mezcla de especies de gas y aerosol, y dos lámparas UV, una de ellas para esterilizar el volumen de la cámara y la otra permite la generación de ozono. Posee una serie de conexiones que permiten conectar la cámara a instrumentos para la introducción de aerosoles, la monitorización de las condiciones de la cámara (concentración de partículas, presión interna y externa, temperatura, humedad relativa, etc.) y la ventilación de su interior. Entre estos instrumentos se encuentran un medidor de partículas, analizadores de NO_x y O₃, sensores de temperatura y humedad, etc. Esta cámara se utiliza generalmente para operar a presión atmosférica, aunque también se puede conectar a un sistema de bombeo que puede evacuar el volumen interno a un nivel de vacío de aproximadamente 10⁻² mbar en unos 15 minutos.⁷⁷

CESAM (Chambre Expérimentale de Simulation Atmosphérique Multiphasique) ha sido elaborada en la Universidad de París (Francia).⁷⁸ Esta cámara se ha diseñado para la realización de estudios fotoquímicos en sistemas multifásicos, que involucra procesos tanto en fase gaseosa como condensada, como son la química de aerosoles y nubes. Permite llevar a cabo experimentos a temperatura y presión variables con radiación solar artificial. Consiste en un recipiente de acero inoxidable de 4.2 m³ que consta de cuatro partes principales unidas entre sí. El cuerpo de la cámara está montado sobre una estructura de cemento, con seis soportes antivibratorios ajustables. Posee tres lámparas de arco de xenón de alta presión, y puede funcionar en un rango de presión de 10⁻⁷ a 2 atm. Contiene 8 puertos de 0.35 m de diámetro y 4 puertos de 0.45 m de diámetro en los que se instalan las líneas de teflón de inyección y muestreo de gases y aerosoles, así como algunos instrumentos analíticos, además en la parte superior se encuentran los puertos de irradiación. Esta cámara cuenta con analizadores de NO_x, O₃, SO_x e hidrocarburos, GC-MS, cromatografía líquida (LC), FTIR, microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), sensores de humedad y temperatura, etc. El cuerpo del reactor posee una pared doble con 10 mm de

⁷⁷ Massabò, D., Danelli, S. G., Brotto, P., et al. ChAMBRe: a new atmospheric simulation Chamber for Aerosol Modelling and Bio-aerosol Research. *Atmospheric Measurement Techniques*. 2018; 11:5885-5900.

⁷⁸ Wang, J., Doussin, J. F., Perrier, S., et al. Design of a new multi-phase experimental simulation chamber for atmospheric photosmog, aerosol and cloud chemistry research. *Atmospheric Measurement Techniques*. 2011; 4:2465-2494.

distancia entre ambas paredes formando un volumen de 90 L por el que circula un fluido frío o caliente para controlar la temperatura del reactor. La pared interna posee un grosor (12 mm) mayor que la cara externa (2 mm) ya que soporta mayores cambios físicos. La cara interna está pulida para minimizar el área de superficie específica y proporcionar un buen reflejo de la luz dentro de la cámara mejorando así la homogeneidad de la radiación.⁷⁹

La Cámara de Simulación Atmosférica Cambridge (CASC de sus siglas en inglés), desarrollada en la Universidad de Cambridge (Inglaterra), se ha empleado para estudiar la formación de aerosoles y la reacción en partículas para la oxidación del limoneno.⁸⁰ Está formada por un compartimento de teflón con un volumen de 5.4 m³ y rodeada por una estructura de aluminio. A cada lado contiene una serie de puertos de acero inoxidable para la introducción de aire y el muestreo. Esta cámara está equipada con una serie de instrumentos situados en el exterior de la misma, como analizadores de NO_x y O₃, la ionización por electropulverización extractiva acoplada a espectrometría de masas (EESI-MS), reacción de transferencia de protones acoplada a espectrometría de masas (PTR-MS), etc. Para la introducción controlada de aire, posee una serie de filtros que permiten eliminar posibles contaminaciones, así como una serie de controladores de flujo. La temperatura del laboratorio donde se encuentra ubicada la cámara está controlada mediante aire acondicionado. Además, en su interior posee lámparas UV situadas debajo del compartimento de teflón para experimentos donde también se evalúe el efecto de la radiación. Antes de realizar un experimento, la cámara se acondiciona mediante la introducción de aire limpio durante al menos 24 h, y puede ir acompañado del uso de lámparas UV, ozono y vapor de agua para eliminar especies residuales de las paredes de la cámara. Generalmente, para la realización de experimentos se introducen los reactivos (O₃, NO_x, VOCs) en el interior de la cámara al inicio del ensayo y se deja evolucionar durante un periodo de varias horas. Sin embargo, la cámara también puede operar en condiciones de dosis infinitas, donde a través de los puertos de los que dispone la cámara, se introduce un flujo constante de reactivos controlado con flujómetros.⁸⁰

⁷⁹ Wang, J., Doussin, J. F., Perrier, S., et al. Design of a new multi-phase experimental simulation chamber for atmospheric photosmog, aerosol and cloud chemistry research. *Atmospheric Measurement Techniques*. 2011; 4:2465-2494.

⁸⁰ Gallimore, P. J., Mahon, B. M., Wragg, F. P. H. et al. Multiphase composition changes and reactive oxygen species formation during limonene oxidation in the new Cambridge Atmospheric Simulation Chamber (CASC). *Atmospheric Chemistry and Physics*. 2017; 17(16):9853-9868.

Con el fin de realizar ensayos *in vivo* con humanos para evaluar la exposición dérmica a contaminantes atmosféricos como el xileno, el Laboratorio de Salud y Seguridad de Reino Unido, ha desarrollado una cámara de simulación, que consiste en una sala de 8 m³ a la que se le introduce vapor del compuesto evaluado.⁸¹ El interior de la cámara se mantiene a una temperatura de 25 °C y una humedad del 30 % a lo largo del experimento. Además, la concentración atmosférica se encuentra continuamente monitorizada por un equipo de FTIR y otro de GC-FID.⁸¹

En el Centro Nacional de Investigaciones Atmosféricas (NCAR), en Estados Unidos, han desarrollado una cámara de flujo continuo de estado estacionario para el estudio de la química diurna y nocturna bajo niveles atmosféricos de NO relevantes.⁸² Esta cámara consta de una bolsa de teflón de 10 m³ situada en un recinto cúbico con superficies reflectantes UV y 128 tubos de luz negra situados en la pared. La cámara está equipada con una sonda para el control de la temperatura y la humedad, y un transmisor indicador de presión. La temperatura se controla mediante un sistema de aire acondicionado. La humedad relativa del aire de la cámara es inferior al 10 % en condiciones secas, y puede variar en el intervalo de 10-50 % haciendo pasar un flujo de aire limpio a través de un depósito de agua con temperatura controlada. La presión interna de la cámara se mantiene ligeramente por encima de la presión ambiental para evitar así la entrada de aire del exterior, minimizando así el riesgo de contaminación. Antes de comenzar el ensayo, la cámara se limpia con una corriente de aire limpio y seco durante 12 h de manera que no queden contaminantes en su interior; y durante el resto del experimento, ésta recibe un flujo constante de aire, el cual al generar turbulencias en el interior de la cámara permite mantener la homogeneidad de la misma. Para imitar la fotoquímica diurna en modo de flujo continuo, se introdujo peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a un flujo constante hacia el interior de la cámara. Además, también se introduce un flujo constante de NO mediante dilución del flujo de NO concentrado a la proporción deseada empleando flujómetros de masas. Para imitar la química nocturna en modo de flujo continuo, se establece un estado estático de NO₃, mediante la introducción de un flujo constante de O₃ y NO en el interior de la cámara.⁸²

⁸¹ Loizou, G. D., Jones, K., Akrill, P. et al. Estimation of the Dermal Absorption of m-xylene Vapor in Humans Using Breath Sampling and Physiologically Based Pharmacokinetic Analysis. *Toxicological Sciences*. 1998; 48:170-179.

⁸² Zhan, X., Ortega, J., Huang, Y., et al. A steady-state continuous flow chamber for the study of daytime and nighttime chemistry under atmosphericall relevant NO levels. *Atmospheric Measurement Techniques*. 2018; 11:2537-2551.

La cámara de simulación LASC (Lusanne Atmospheric Simulation Chamber) fue desarrollada en la Universidad de París (Francia), con el objetivo de estudiar el efecto que el SO₂ ejerce sobre distintos materiales.⁸³ Consta de tres partes principalmente: un sistema de inyección de gas, una parte principal que contiene las muestras, y una unidad de control. El sistema de inyección de gas permite la introducción de aire seco filtrado sobre carbón activo y humedecido sobre un baño de agua a temperatura controlada, posteriormente el aire se vuelve a filtrar y se adiciona SO₂ y NO₂ de forma controlada empleando flujómetros de masas. La parte principal cuenta con un volumen de 10.8 m³ que contiene 10 celdas de borosilicato de 22 L cada una, que contienen las muestras de los materiales evaluados. Estas celdas están equipadas con ventiladores de velocidad ajustable que permiten la homogeneización atmosférica, así como con un sistema de ajuste de temperatura y humedad relativa. Los materiales de las celdas han sido elegidos por su inercia química, y las partes metálicas han sido revestidas con teflón. Finalmente, la unidad de control permite el monitoreo de las condiciones experimentales, como la concentración de agua y SO₂ en aire, mediante un instrumento de punto de rocío y un analizador con detección de fluorescencia UV respectivamente. Sin embargo, la concentración de NO₂ se mide únicamente a la entrada de cada celda.⁸³

En el Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo (CEAM) de Paterna (España), se encuentran las cámaras EUPHORE (EUropean PHOto-Reactor) (Figura 1).⁸⁴ Se trata de un centro de investigación dedicado al estudio de procesos atmosféricos, que cuenta con una importante infraestructura analítica. Su finalidad es proporcionar una plataforma sobre la que poder abordar los problemas medioambientales relacionados con la química de formación de contaminantes en la troposfera. La instalación cuenta con dos simuladores atmosféricos, formado cada uno de los cuales por una estructura semiesférica con un volumen de 200 m³. Dicha estructura está formada por 32 segmentos individuales de teflón con un espesor de 0.125 mm soldados entre sí, dando lugar a una estructura de forma semiesférica. Esta lámina de teflón transmite más del 80 % de la luz en el rango ultravioleta visible del espectro solar, esto es, entre 260 y 640 nm que es el rango en el que se producen las reacciones fotoquímicas en la atmósfera. Ambas cámaras

⁸³ Ausset, P., Crovisier, J. L., del Monte, M., et al. Experimental study of limestone and sandstone sulphation in polluted realistic conditions: the Lausanne atmospheric simulation chamber (LASC). *Atmospheric Environment*. 1996; 30(18):3197-3207.

⁸⁴ Becker, K.H. The European Photoreactor EUPHORE. Design and Technical Development of the European Photoreactor and First Experimental Results. *Inst. Physical Chemistry*. 1996.

se encuentran protegidas frente a situaciones meteorológicas adversas, mediante una cúpula de protección. El suelo de las cámaras cuenta con un sistema de refrigeración para garantizar una temperatura adecuada, tanto del aire contenido en ellas como de los equipos de medida. Dos salas de máquinas complementan los simuladores, equipadas cada una de ellas con un compresor y sistemas de filtrado para la purificación del aire que llena los simuladores. Para la detección de los distintos compuestos de interés, las cámaras están equipadas con una serie de técnicas analíticas que incluyen tanto LC como GC, FTIR, espectroscopia UV, analizadores de HNO_2 y formaldeído, etc. Toda esta tecnología permite el análisis de un gran número de especies, por ejemplo, VOCs, semi-VOCs, compuestos orgánicos en partículas, etc.⁸⁵



Figura 1. Fotografías de los simuladores atmosféricos EUPHORE instalados en el CEAM.⁸⁵

⁸⁵ Becker, K.H. The European Photoreactor EUPHORE. Design and Technical Development of the European Photoreactor and First Experimental Results. Inst. Physical Chemistry. 1996.

La cámara de simulación SAPHIR (Simulation of Atmospheric PHotrochemistry In a large Reaction Chamber) fue desarrollada en el campus de Forschungszentrum Jülich (Alemania), con el objetivo de evaluar procesos fotoquímicos atmosféricos.⁸⁶ Esta cámara está formada por una bolsa de teflón doble con forma cilíndrica sujeta a un marco de acero, con un volumen de 270 m³, una longitud de 20 m y diámetro de 5 m. Una pequeña sobrepresión (80 Pa) evita que el aire entre en el interior de la cámara. Para mantener esta sobrepresión es necesario introducir un flujo de aire de alta pureza que mantiene limpias las láminas de teflón. Esto provoca una dilución de todos los gases traza en aproximadamente 3 a 5 % por hora. El aire sintético se prepara mediante evaporación de N₂ y O₂, y se introduce empleando una serie de sistemas que permiten el control del flujo. La humedad se introduce en la cámara calentando agua ultrapura y mezclando el vapor con un gran flujo de aire sintético (300 m³ h⁻¹) hasta alcanzar el nivel de humedad deseado en el interior. El teflón que conforma dicha cámara permite el paso del 80 % de la radiación solar. Una serie de persianas permiten que pase o no la radiación solar durante el día en 60 s, por lo que en experimentos de fotooxidación se suelen emplear estas persianas al inicio del ensayo para dar sombra a la cámara, y posteriormente son retiradas de manera que la luz solar natural se emplea para irradiar la atmósfera simulada en el interior de la cámara. También se puede utilizar un sistema de filtros que permite cambiar el espectro de luz solar durante la exposición. Esta cámara se encuentra equipada con un conjunto de instrumentos, entre ellos un fotómetro de absorción de recorrido largo (LOPAP de sus siglas en inglés) para el análisis de HNO₂, un analizador de quimioluminiscencia para el análisis de NO y NO₂, un espectrómetro de absorción UV para el análisis de O₃, un higrómetro de punto de escarcha y un anemómetro ultrasónico para el control de la humedad y la temperatura respectivamente.^{87, 88}

En la Tabla 1 aparece un resumen de las cámaras de simulación atmosférica descritas, así como la instrumentación analítica de la que disponen, y su principal aplicación. Éstas se encuentran ordenadas de mayor a menor volumen interno.

⁸⁶ Rohrer, F., Bohn, B., Brauers, T., et al. Characterisation of the photolytic HONO-source in the atmosphere simulation chamber SAPHIR. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions*. 2004; 4:7881-7915.

⁸⁷ Brauers, T. Bohn, B., Johnen, F. J., et al. The atmosphere simulation chamber SAPHIR: a tool for the investigation of photochemistry. EGS-AGU-EUG Joint Assembly, Nice, France, 2003.

⁸⁸ Fuchs, H., Novelli, A., Rolletter, M., et al. Comparison of OH reactivity measurements in the atmospheric simulation chamber SAPHIR. 2017; 10(10):4023-4053.

Tabla 1. Volumen interno, instrumentación analítica y aplicaciones de las distintas cámaras de simulación.

Cámara	Volumen interno (m ³)	Instrumentación analítica	Aplicaciones
VERAM	0.00285	GC-MS	Desarrollo de muestreadores atmosféricos
THALAMOS	0.6	FTIR, SIFT-MS, GC-MS, analizadores	Estudio de reacciones
TSC	2	GC-FID, termómetro, higrómetro, analizador de NO _x , analizador de CO, analizador de O ₃ , medidor de partículas, radiómetro UV	Estudio de reacciones fotoquímicas
ChAMBRE	2.2	Termómetro, higrómetro, analizador de NO _x , analizador de O ₃ , medidor de partículas	Estudio sobre bioaerosoles atmosféricos
CESAM	4.2	GC-MS, HPLC, FTIR, SEM, TEM, termómetro, higrómetro, analizador de NO _x , analizador de O ₃ , analizador de SO ₃ , analizador de hidrocarburos	Estudios fotoquímicos y multifásicos
CASC	5.4	Analizador de NO _x , analizador de O ₃ , EESI-MS, PTR-MS	Estudio de aerosoles y reacciones en partículas
Dr. Loizou	8	IR, GC-FID	Estudios de absorción dérmica <i>in vivo</i>
Cámara de NCAR	10	Termómetro, higrómetro, transmisor de presión	Estudio de la química atmosférica diurna y nocturna
LASC	10.8	Instrumento de punto de rocío, espectroscopía UV	Estudio del efecto del SO ₂ sobre distintos materiales
EUPHORE	200	LC, GC, FTIR, espectroscopía UV, analizador de HNO ₂ analizador de formaldehído	Investigación sobre procesos atmosféricos
SAPHIR	270	LOPAP, analizador de quimioluminiscencia, espectroscopía UV, higrómetro de punto de escarcha, anemómetro ultrasónico	Estudios de procesos fotoquímicos

3. Evaluación de la exposición dérmica a contaminantes atmosféricos

Los efectos debidos a la exposición dérmica a contaminantes químicos pueden ser locales, provocando alteraciones en la piel, como dermatitis, irritación, etc., o sistémicos, originando trastornos o daños en órganos o sistemas específicos una vez absorbidos y distribuidos por el organismo.⁸⁹ Debido a estos efectos adversos es necesario evaluar la exposición dérmica a contaminantes atmosféricos.

Los contaminantes atmosféricos que se introducen en el organismo mediante absorción dérmica deben de atravesar las distintas capas que conforman la piel hasta alcanzar los capilares sanguíneos.⁹⁰ Por ello, para comprender la ruta que sigue el compuesto hasta alcanzar el torrente sanguíneo, es necesario conocer la naturaleza y estructura de dichas capas.

3.1. La piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo, con una superficie aproximada de 1.7 m², y pesa alrededor del 15 % del peso corporal total. Cubre toda la superficie externa del cuerpo y sirve como barrera inicial contra los patógenos, la luz ultravioleta, los productos químicos y las lesiones físicas. Además, regula la temperatura y la cantidad de agua que se libera al medio ambiente. Sus características varían según las partes del cuerpo, dependiendo de la función y las necesidades de la zona.⁹¹

Se encuentra dividida en tres capas, epidermis, dermis e hipodermis (Figura 2), las cuales se diferencian entre sí por su estructura y función.

⁸⁹ Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Exposición dérmica laboral. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, Gobierno de España. 2004.

⁹⁰ Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. NTP 697: Exposición a contaminantes químicos por vía dérmica. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, Gobierno de España. 2007

⁹¹ Zaidi, Z., Lanigan, S. W. Dermatology in Clinical Practice, Springer; 2010.

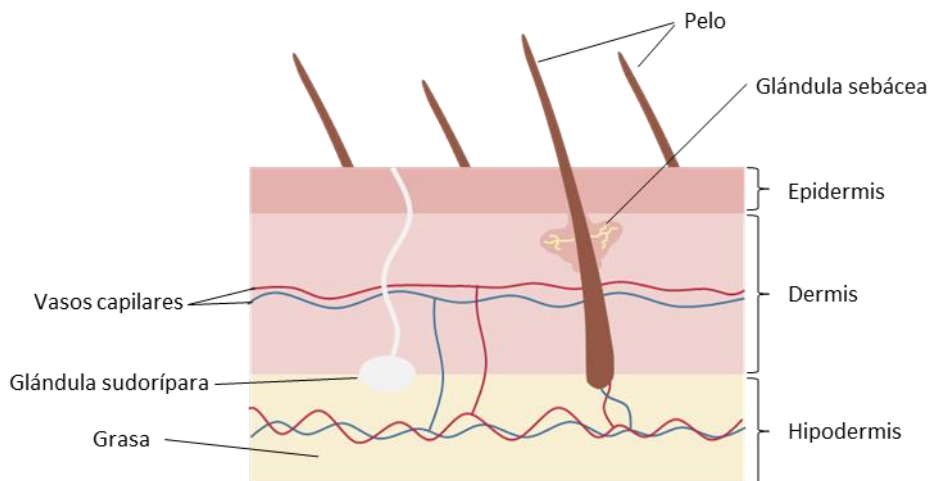


Figura 2. Anatomía de la piel humana.

La epidermis es la capa más externa de la piel, también es la capa más fina con un espesor que varía en el intervalo entre 0.1 y 5 mm. Las capas de la epidermis incluyen estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso, estrato compacto y estrato córneo (Figura 3).⁹²

-El estrato basal es la capa más profunda, separada de la dermis por la membrana basal. Esta capa contiene células que producen constantemente queratinocitos, los cuales producen queratina. Además, también contiene melanocitos, que son células que producen melanina, que es la responsable del pigmento de la piel y la protege contra la radiación UV.

-El estrato espinoso contiene células espinosas con procesos citoplasmáticos, que se extienden hacia afuera y entran en contacto con las células vecinas mediante desmosomas.

-El estrato granuloso contiene células con gránulos de queratohialina y cuerpos lamelares. Los gránulos de queratohialina contienen precursores de la queratina, la cual aporta firmeza y elasticidad a la piel. Los cuerpos lamelares contienen glicolípidos que se secretan a la superficie de las células y funcionan como pegamento, manteniéndolas unidas.

⁹² Yousef, H., Alhajj, M. et Sharma, S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. In: StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2019.

-El estrato compacto está presente en la piel más gruesa, como la de las palmas de las manos y las plantas de los pies. Es una capa delgada y transparente que consiste en eleidina, que es un producto de transformación de la queratohialina.

-El estrato córneo es la capa superior de la piel, formada por queratina y queratinocitos muertos. Esta capa es la que más varía de grosor. Dentro de esta capa, los queratinocitos muertos secretan defensinas que son parte de nuestra primera defensa inmunológica.

-El estrato disyunto es la capa más externa de la piel y está formado por los queratinocitos en un proceso continuo de descamación, siendo sustituidos por otros nuevos procedentes del tejido epidérmico subyacente.⁹³

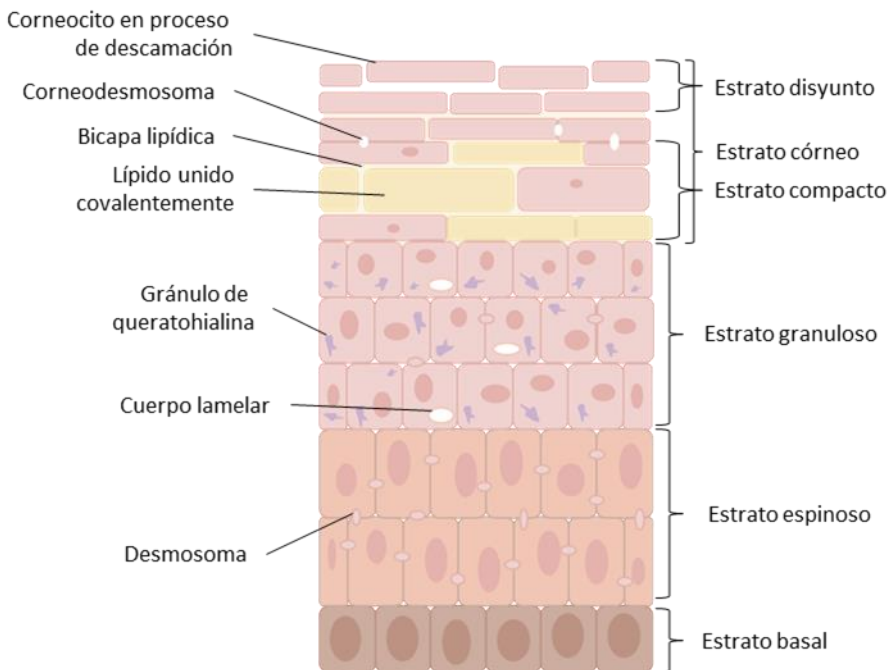


Figura 3. Características de las diferentes capas que componen la epidermis.

La dermis es la capa intermedia de la piel. Está formada principalmente por fibras de colágeno y otras proteínas. Se trata de la capa más activa, ya que en ella se alojan

⁹³ NCBI. AnatOmy, Skin (Integument), Epidermis. 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/> Acceso marzo 2021.

los capilares sanguíneos y linfáticos, las terminaciones nerviosas y también los llamados anexos cutáneos, los cuales juegan un importante papel en las funciones de la piel. Los anexos son, principalmente:⁹⁴

-Las glándulas sebáceas que segregan la grasa que confiere flexibilidad y resistencia al tejido.

-Las glándulas sudoríparas se encuentran en un estrato más profundo que los anteriores. Mediante un conducto, que desemboca en el estrato córneo, se elimina el sudor que contiene sustancias residuales presentes en la sangre.

-Los pelos en su forma terminal y en forma de vello cubre con más o menos abundancia, la mayor parte de la piel. Contienen una parte activa (bulbo piloso) y una parte inerte (folículo piloso).

La hipodermis es la capa más profunda de la piel. Está compuesta por adipocitos junto con algunos apéndices de la piel como folículos pilosos, las neuronas sensoriales y los vasos sanguíneos.

3.2. Impacto de la contaminación ambiental sobre la piel

La función principal de la piel es la de actuar como escudo protector frente a partículas nocivas externas. Sin embargo, no siempre puede cumplir este objetivo, de manera que una exposición repetitiva y prolongada a altos niveles de contaminación puede provocar efectos negativos en la piel, entre ellos envejecimiento prematuro, sequedad de la misma, aparición de manchas, etc.^{95, 96}

El envejecimiento cutáneo es un proceso biológico complejo que consta de dos elementos: envejecimiento intrínseco que está determinado principalmente por la genética, y envejecimiento extrínseco que es causado en gran parte por factores

⁹⁴ Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. NTP 697: Exposición a contaminantes químicos por vía dérmica. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, Gobierno de España. 2018

⁹⁵ Vierkötter, A., Schilkowski, T. Ranft, U., et al. Airborne Particle Exposure and Extrinsic Skin Aging. *Journal of Investigative Dermatology*. 2010; 130(12):2719-2726.

⁹⁶ Li, M., Vierkötter, A., Schikowski, T., et al. Epidemiological evidence that indoor air pollution from cooking with solid fuels accelerates skin aging in Chinese women. *Journal of Dermatological Science*. 2015; 79(2):148-154.

atmosféricos, como la exposición a la luz solar y la contaminación del aire, así como estilo de vida, la dieta o tabaquismo.⁹⁷

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que algunos HAPs producen hiperpigmentación al aumentar las enzimas que sintetizan melanina.⁹⁸ Además, el ADN se puede dañar por estos contaminantes atmosféricos, y pueden provocar inflamación de la piel, estrés oxidativo, aumento de especies reactivas del oxígeno (ROS), etc.^{99, 100} El daño cutáneo causado por la exposición ambiental se puede atribuir en gran medida a una compleja cascada de reacciones dentro de la piel iniciada por la generación de ROS, que causan daño oxidativo a componentes celulares como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Estas células cutáneas dañadas inician respuestas inflamatorias que conducen al daño final que se manifiesta crónicamente en la piel expuesta.¹⁰¹

Los VOCs presentes en la atmósfera, generalmente provienen de disolventes orgánicos empleados en pinturas, barnices, emisiones de vehículos, etc., lo que supone una importante fuente de contaminantes atmosféricos. Según estudios realizados con ratones, los VOCs pueden inducir lesiones cutáneas precancerosas.¹⁰² También se ha demostrado que el aumento de la concentración de estos compuestos provoca un incremento de los síntomas de la dermatitis atópica.¹⁰³ Las principales consecuencias de la exposición a terpenos son una peroxidación lipídica excesiva, producción de ROS y la posterior apoptosis celular.¹⁰⁴ Algunos PAHs están asociados al envejecimiento extrínseco de la piel, pigmentación de la misma, cáncer y aparición de acné.¹⁰⁵ Por otro lado, la piel expuesta a PAHs adsorbidos en la superficie de partículas en suspensión puede

⁹⁷ Farage, M. A., Miller, K. W., Elsner, P. et al. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *International Journal of Cosmetic Science*. 2008; 30:87-95.

⁹⁸ Luecke, S., Backlund, M. Jux, B., et al. The aryl hydrocarbon receptor (AHR), a novel regulator of human melanogenesis. *Pigment Cell Melanoma Research*. 2010; 23 (6):828-833.

⁹⁹ Tsuji, G., Takahara, M., Uchi, H. An environmental contaminant, benzo(a)pyrene, induces oxidative stress-mediated interleukin-8 production in human keratinocytes via the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway. *Journal of Dermatological Science*. 2011; 62:42-49.

¹⁰⁰ Fuyuno, Y., Uchi, H., Yasamatsu, M., et al. Perillaldehyde Inhibits AHR Signaling and Activates NRF2 Antioxidant Pathway in Human Keratinocytes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018; 1-9.

¹⁰¹ McDaniel, D., Farris, P. Valacchi, G. Atmospheric skin aging-Contributors and inhibitors. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2018; 17:124-137.

¹⁰² Michielsen, C., van Loveren, H. et Vos, J. G. The Role of the Immune System in Hexachlorobenzene-Induced Toxicity. *Environmental Health Perspectives*. 1999; 107:783-792.

¹⁰³ Kim, E. H., Kim, S., Lee, J. H., et al. Indoor Air Pollution Aggravates Symptoms of Atopic Dermatitis in Children. *Plos One*. 2015; 10(3):1-9.

¹⁰⁴ Agus, H. H. *Toxicology Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*. Academic Press; 2020.

¹⁰⁵ Leung, M. H. Y., Tong, X., Bastien, P., et al. Changes of the human skin microbiota upon chronic exposure to polycyclic aromatic hydrocarbon pollutants. *Microbiome*. 2020; 8:100.

provocar estrés oxidativo y por consiguiente, envejecimiento de la piel, ya que las partículas ambientales pueden alcanzar los melanocitos, liberar los PAHs unidos a su superficie y afectar directamente a la función de las células cutáneas.¹⁰⁶ Estos compuestos pueden transformarse en quininas, que son sustancias químicas de ciclo redox que producen ROS.¹⁰⁷ También se ha demostrado una clara evidencia de efectos genotóxicos, como aductos de ADN, pudiendo provocar cáncer ya que son uno de los mayores carcinógenos ambientales.^{108, 109}

El humo de tabaco contribuye al envejecimiento prematuro de la piel, al aumento de la incidencia de psoriasis, acné y cáncer de piel. Estudios para evaluar los efectos que el humo de tabaco ejerce sobre la piel han demostrado que el riesgo de aparición de arrugas moderadas/severas para fumadores en comparación con no fumadores es de 2.3 veces mayor en hombres y 3.1 en mujeres.¹¹⁰ Las uñas de un fumador suelen ser de color claro y manchadas por los subproductos del tabaco, además, el calentamiento prolongado de las yemas de los dedos al sostener el cigarrillo puede provocar una decoloración de las yemas a causa de una hiperpigmentación post-inflamatoria.¹¹¹ Además, las sustancias químicas del humo de tabaco provocan la pérdida de agua transepidérmica e impiden la síntesis de colágeno,^{111, 112} el cual tiene una importancia decisiva en propiedades de la piel como la firmeza y flexibilidad.¹¹³

¹⁰⁶ Vierkötter, A., Schilkowski, T., Ranft, U., et al. Airborne Particle Exposure and Extrinsic Skin Aging. *Journal of Investigative Dermatology*. 2010; 130(12):2719-2726.

¹⁰⁷ Penning, T. M., Burczynski, M. E., Hung, C. F., et al. Dihydrodiol Dehydrogenases and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Activation: Generation of Reactive and Redox Active o-Quinones. *Chemical Research in Toxicology*. 1999; 12(1):1-18.

¹⁰⁸ Farmer, P. B., Singh, R., Kaur, B., et al. Molecular epidemiology studies of carcinogenic environmental pollutants. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental pollution on exogenous and oxidative DNA damage. *Mutation Research*. 2003; 544:397-402.

¹⁰⁹ English, J. S. C., Dawe, R. S., et Ferguson, J. Environmental effects and skin disease. *British Medical Bulletin*. 2003; 68(1):129-142.

¹¹⁰ Emster, V. L., Grady, D., Miike, R., et al. Facial Wrinkling in Men and Women by Smoking Status. *American Journal of Public Health*. 1995; 85(1):78-82

¹¹¹ Ortiz, A., Grando, S. A. Smoking and the skin. *International Journal of Dermatology*. 2012; 51:250-262.

¹¹² Gottipati, K. R., Poulsen, H., Starcher, B. Passive cigarette smoke exposure inhibits ultraviolet light B-induced skin tumors in SKH-1 hairless mice by blocking the nuclear factor kappa B signalling pathway. *Experimental Dermatology*. 2008; 17(9):780-787.

¹¹³ Jorgensen, L. N., Kallehave, F., Christensen, E., et al. Less collagen production in smokers. *Surgery*. 1998; 123(4):450-455.

3.3. Exposición dérmica

Los contaminantes atmosféricos son capaces de atravesar la piel a través de mecanismos de absorción transepidermica y transapendicular.¹¹⁴ Se trata de un proceso de difusión simple que se explica mediante la denominada Ley de Fick. Este proceso ocurre en varias etapas. En primer lugar, las moléculas de contaminantes se adsorben en la superficie del estrato córneo. Posteriormente, se produce la difusión de estas moléculas a través del mismo alcanzando el resto de capas que conforman la epidermis, penetrando hasta la dermis e introduciéndose en los vasos sanguíneos, a través de los cuales ingresarán en el sistema vascular.¹¹⁵ Los principales factores que determinan la absorción dérmica de contaminantes a través de la piel son las propiedades físico-químicas de estos compuestos, los parámetros fisiológicos y anatómicos de la piel y el modo de exposición (vehículo, dosis, duración, superficie expuesta, frecuencia, etc.).^{116, 117}

La absorción transepidermica es el mecanismo mediante el cual la mayor parte de los compuestos tóxicos penetran la piel. Por un lado, las sustancias de carácter más polar penetran por difusión la superficie hidratada y proteica de la membrana (absorción transcelular), y las sustancias apolares lo hacen a través de los espacios intersticiales que quedan entre los filamentos proteicos de la membrana (absorción intercelular), por ser ésta una zona rica en lípidos (Figura 4).¹¹⁸ Ésta es la vía cuantitativamente más importante de penetración de los contaminantes a través de la piel, pero también es más lenta que la absorción transapendicular, donde la absorción se produce a través de los anexos cutáneos, los cuales ofrecen una superficie muy limitada para que se produzca la absorción.¹¹⁴

¹¹⁴ Sánchez-Saldaña, L. A. Absorción percutánea. Sociedad Peruana de Dermatología. 2018; 28(2):92-103.

¹¹⁵ Clarí Pons, M. A. Estudios "in vitro" e "in vivo" de la absorción percutánea de la bempiparina: Métodos de valoración. Universitat de València; 2004.

¹¹⁶ Vera Fiserova-Bergerova, T., Pierce, J. T. Horizons: Biological Monitoring V: Dermal Absorption. Applied Industrial Hygiene. 1989; 4(8):14-21.

¹¹⁷ Jiang, A., Maibach, H. I., Wiener, A., et al. Percutaneous Penetration. Springer Nature Switzerland AG. 2020

¹¹⁸ Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. NTP 697: Exposición a contaminantes químicos por vía dérmica. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, Gobierno de España. 2018

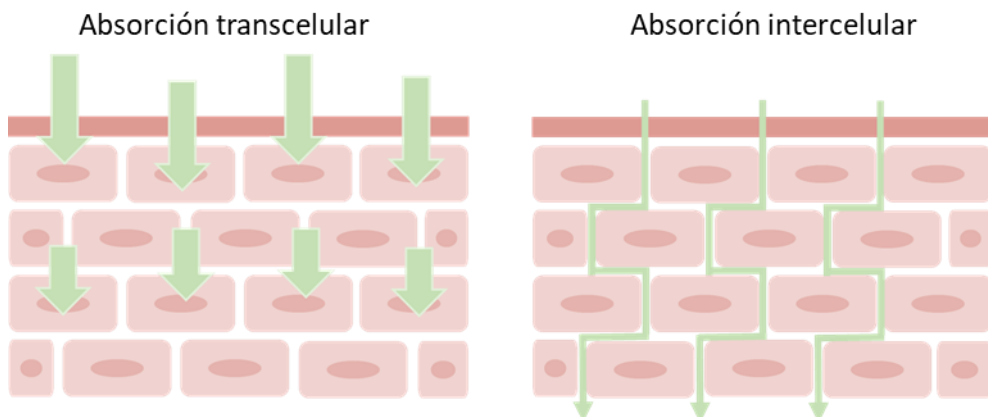


Figura 4. Esquema de los distintos mecanismos de absorción transepidérmica.

La absorción transapendicular se produce a través de los anexos cutáneos como glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas, pelo y uñas (Figura 5). Adquiere menor importancia que la absorción transepidérmica ya que la superficie de intercambio es mucho menor, aunque la capacidad de difusión sea más alta. Lo característico de esta vía es el mecanismo denominado «entrada de choque», haciendo referencia a la cantidad y rapidez con que penetra el contaminante en una primera fase, antes de que se sature el mecanismo debido a la pequeña superficie de intercambio que representan los anexos.^{119, 120}

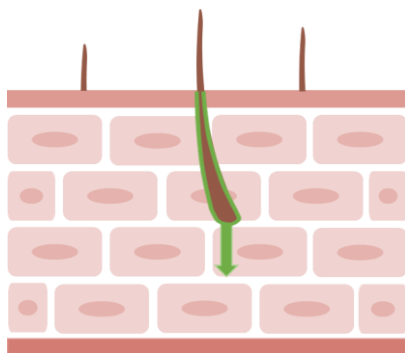


Figura 5. Absorción de contaminantes a través de los anexos cutáneos.

¹¹⁹ Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. NTP 697: Exposición a contaminantes químicos por vía dérmica. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, Gobierno de España. 2018

¹²⁰ Kielhom, J., Mangelsdorf, I. Environmental Health Criteria 235. Dermal Absorption. WHO. 2006.

3.4. Cinéticas de la absorción dérmica

La piel es una barrera selectiva al paso de sustancias, siendo la epidermis y principalmente el estrato córneo los principales responsables de este proceso. El transporte de sustancias a través de la piel es un proceso complejo, ya que abarca interacciones físicas y químicas.¹²¹

Para estudiar las cinéticas de absorción de compuestos orgánicos a través de la piel, se pueden realizar dos tipos de estudios: en condiciones de dosis infinita o por contra, en condiciones de dosis finita.¹²² En los estudios para la evaluación de la absorción dérmica basados en la metodología de dosis infinita la concentración de la fase donadora es constante a lo largo de todo el experimento.¹²³

En los experimentos realizados bajo condiciones de dosis finitas, la concentración de los permeantes evaluados cambian a lo largo del ensayo. Esto se debe a la absorción de estas especies a través de la piel, o a la evaporación de los mismos.¹²³

La absorción dérmica se considera principalmente un proceso de difusión. Éste consiste en un flujo de moléculas de un compuesto a favor del gradiente de concentración, con el fin de alcanzar el equilibrio. Es esencialmente un proceso de tres etapas: en primer lugar, el compuesto pasa de la fase donadora al estrato córneo; en la segunda etapa se produce la difusión del mismo a través del estrato córneo; y finalmente, dicho compuesto difunde desde el estrato córneo hasta los tejidos más internos.¹²⁴

Se considera que la piel es una membrana pseudohomogénea, por lo que, tanto en condiciones de dosis infinita como finita, puede describirse matemáticamente mediante las leyes de Fick.^{125, 126}

¹²¹ Buist, H., Craig, P. Dewhurst, I. et al. Guidance on dermal absorption. European Food Safety Authority (EFSA). 2017; 15(6):1-60.

¹²² Health & Consumer Protection Directorate-General. Guidance Document on dermal Absorption. European Commission. 2004.

¹²³ Barry, B. W. Methods for studying percutaneous absorption. Dermatological Formulation. Marcel Dekker; 1983.

¹²⁴ Chilcott, R. P., Price, S. Principles and Practice of Skin Toxicology, John Wiley & Sons, Ltd; 2008.

¹²⁵ Brodin, B., Steffansen, B., Nielsen, C. U. Molecular Biopharmaceutics: Aspects of Drug Characterisation, Drug Delivery and Dosage Form Evaluation, Pharmaceutical Press; 2010.

¹²⁶ Clarí Pons, M. A. Estudios "in vitro" e "in vivo" de la absorción percutánea de la bemiparina: Métodos de valoración. Universitat de València; 2004.

La primera ley de Fick, establece que el flujo de una sustancia se desplaza desde la región más concentrada a regiones de menor concentración atravesando un gradiente de concentración. Relaciona el flujo molecular del compuesto (J) por unidad de área ($\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$) con el gradiente de concentración de la sustancia (δC) (g cm^{-3}), la distancia lineal difusa (δx) (cm), y el coeficiente de difusión (D) ($\text{cm}^2 \text{h}^{-1}$) en condiciones de dosis infinitas, es decir, en estado estacionario (Ecuación 1).¹²⁷

$$J = -D \frac{\delta C}{\delta x} \quad (1)$$

Esta ecuación indica que el flujo es directamente proporcional al gradiente de concentración por el coeficiente de difusión. Este último parámetro se encuentra relacionado con la temperatura, por lo que una variación de la misma también afectaría proporcionalmente al flujo. Es decir, al aumentar la temperatura aumenta el coeficiente de difusión y por tanto el flujo molecular.

La segunda ley de Fick, que es la forma derivada de la primera ley de Fick y del balance de masas diferencial, permite predecir cómo varía la concentración de un compuesto a lo largo del tiempo (Ecuación 2).¹²⁸

$$\frac{\delta C}{\delta t} = D \frac{\delta^2 C}{\delta x^2} \quad (2)$$

Esta ecuación asume que el coeficiente de difusión del permeante no varía, y que las propiedades de la piel permanecen constantes con el tiempo.

3.4.1. Absorción dérmica en condiciones de dosis infinita

Los parámetros que describen la absorción de una sustancia a través de la piel, en condiciones de dosis infinita, generalmente se obtienen mediante estudios *in vitro*, evaluando la permeabilidad del compuesto estudiado a lo largo del tiempo de exposición. Cuando el permeante entra en contacto con la piel, comienza a difundir a través de la misma. Dependiendo de sus propiedades físico-químicas, éste interaccionará en mayor o menor medida con la piel, lo que determinará su velocidad de difusión.¹²⁸

¹²⁷ Chilcott, R. P., Price, S. Principles and Practice of Skin Toxicology, John Wiley & Sons, Ltd; 2008.

¹²⁸ Dragicevic, N., Maibach, H. I. Percutaneous Penetration Enhancers. Drug Penetration Into/Through the Skin. Springer; 2017.

El perfil de absorción de una sustancia consiste en una gráfica donde aparece representada la cantidad de compuesto absorbido en la piel a lo largo del tiempo. La Figura 6 representa el perfil de absorción que generalmente se obtiene en este tipo de ensayos. Al principio, se observa un periodo de latencia en el que el compuesto evaluado comienza a absorberse en la piel hasta ocupar todos los sitios de unión disponibles. Una vez completados todos estos sitios de unión comienza un gradiente de concentración en estado estacionario con un flujo constante de compuesto a través de la piel. Posteriormente, se produce una disminución progresiva del flujo molecular hasta el punto en que se alcanza un balance de materia igual a 0, momento en el que se alcanza el equilibrio entre el compartimento aceptor y el donador.¹²⁹

Generalmente, se realizan estudios *in vitro* en condiciones de dosis infinita para evaluar parámetros de permeabilidad como son el flujo molecular y el tiempo de latencia (t_{lag}). El flujo molecular se define como el flujo de analito que pasa por unidad de tiempo a través de una superficie de área unidad perpendicular a la dirección del gradiente de concentración. El tiempo de latencia se corresponde con el tiempo que el analito tarda en difundir a través de la membrana hasta llegar a la disolución receptora.¹³⁰ A partir de los perfiles de absorción de las sustancias evaluadas, se pueden determinar estos dos parámetros de permeabilidad, de manera que, el flujo molecular coincide con la pendiente de la recta obtenida de forma experimental en condiciones de estado estacionario, y el tiempo de latencia se corresponde con el punto en el que dicha recta cruza el eje x.¹³¹

¹²⁹ OECD, Guidance notes on dermal absorption. 2011.

¹³⁰ Dragicevic, N., Maibach, H. I. Percutaneous Penetration Enhancers. Drug Penetration Into/Through the Skin. Springer; 2017.

¹³¹ Schuplein, R. J., Blank, I. H. Permeability of the Skin. Physiological Reviews. 1971; 51(4):702-747.

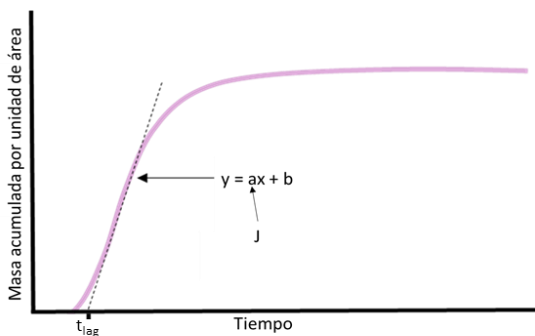


Figura 6. Perfil de absorción de estudios de permeabilidad de compuestos en condiciones de dosis infinitas hasta alcanzar el equilibrio entre fase donadora y receptora.

El flujo molecular también puede estimarse a partir de la Ecuación 3.

$$J = \frac{DC_0}{h} \quad (3)$$

donde C_0 es la concentración de la capa más externa de la piel y h el espesor de la membrana. Aunque C_0 resulta complicado medirlo en la práctica, la concentración del compuesto en la fase donadora (C_v) generalmente se conoce o resulta sencillo de obtener. Por lo que sabiendo que C_0 y C_v están relacionados con el coeficiente de partición entre el donador y la membrana (K_m), tal y como se indica en la Ecuación 4,

$$C_0 = K_m C_v \quad (4)$$

se puede sustituir la ecuación 4 en la 3, obteniendo

$$J = \frac{D K_m C_v}{h} \quad (5)$$

Por otro lado, el tiempo de latencia también se puede obtener matemáticamente a partir de la Ecuación 6,^{132, 133}

$$t_{lag} = \frac{h^2}{6D} \quad (6)$$

¹³² Burgess, S. E., O'Neill, M. A. A., Beezer, A. E., et al. Thermodynamics of membrane transport and implications for dermal delivery. *Journal of Drug del Science and Technology*. 2005; 15(4): 325-327.

¹³³ Bunge, A. L., Cleek, R. L. A New Method for Estimating Dermal Absorption from Chemical Exposure:2. Effect of Molecular Weight and Octanol-Water Partitioning. 1994; 12(1):88-95.

En ocasiones, la absorción dérmica de los permeantes también se evalúa a partir del coeficiente de permeabilidad (K_p), el cual indica la velocidad a la que se produce el transporte de permeante a través de la piel en unidades de cm h^{-1} .

$$K_p = \frac{K_m D}{h} = \frac{J}{C_v} \quad (7)$$

Como se ha explicado anteriormente, J suele calcularse a partir de la pendiente de la recta obtenida de forma experimental en condiciones de estado estacionario. Por lo que si se conoce la concentración de la fase donadora (C_v), K_p puede estimarse a partir de la ecuación 7.¹³⁴

3.4.2. Absorción dérmica en condiciones de dosis finita

La mayor parte de los estudios *in vivo* se realizan en condiciones de dosis finitas.¹³⁵ Sin embargo, en algunos casos se realizan aplicaciones repetidas de la sustancia en condiciones de dosis finitas, lo que da lugar a condiciones de dosis semi-infinitas esencialmente.¹³⁶

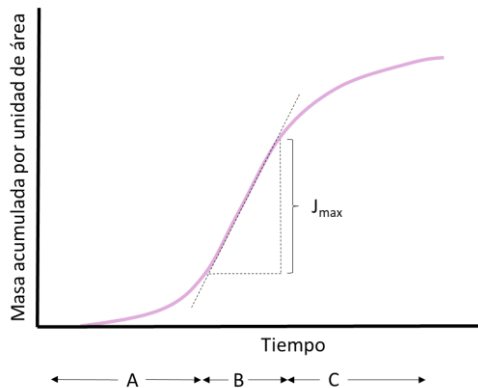


Figura 7. Perfil de absorción en condiciones de dosis finita, donde A se corresponde con el periodo de latencia, B con el estado pseudo-estacionario y C con el periodo de estabilización.

¹³⁴ Dragicevic, N., Maibach, H. I. Percutaneous Penetration Enhancers. Drug Penetration Into/Through the Skin. Springer; 2017.

¹³⁵ Chilcott, R. P., Price, S. Principles and Practice of Skin Toxicology, John Wiley & Sons, Ltd; 2008.

¹³⁶ Kielhom, J., Mangelsdorf, I. Environmental Health Criteria 235. Dermal Absorption. WHO. 2006.

En el caso de estudios en condiciones de dosis finitas, no se alcanza un flujo en estado estacionario como ocurre en estudios de dosis infinitas. En la Figura 7 se puede observar el perfil de absorción típico para condiciones de dosis finita. Al inicio se produce un periodo de latencia (A); posteriormente la cantidad de permeante absorbida en la piel alcanza un estado pseudo-estacionario (B), cuyo gradiente podría emplearse para estimar el flujo máximo (J_{max}); y finalmente la cantidad de permeante disponible en la superficie de la piel se agota y el perfil se estabiliza (C) ya que el balance de materia es igual a 0.^{137, 138}

Una forma alternativa de presentar datos de ensayos a dosis finitas consiste en representar el flujo a distintos tiempos frente al tiempo. Así se obtiene una gráfica como la de la Figura 8, donde se observa un aumento del flujo hasta alcanzar un valor máximo (J_{max}) a un tiempo determinado (t_{max}) y la posterior disminución del mismo debido a la bajada de la concentración del compuesto evaluado en la fase donadora.¹³⁹

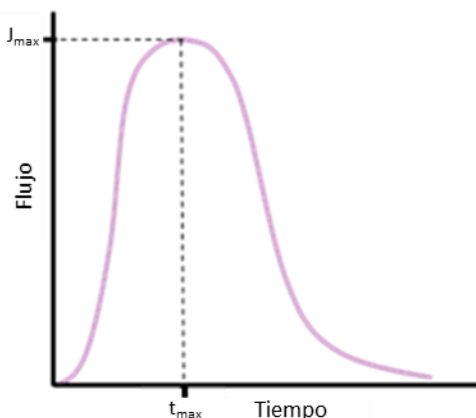


Figura 8. Evolución del flujo molecular a lo largo del tiempo en estudios de permeabilidad en condiciones de dosis finita.

J_{max} y t_{max} son dos parámetros de interés en este tipo de estudios, y están definidos por las Ecuaciones 8 y 9 respectivamente

¹³⁷ Chilcott, R. P., Price, S. Principles and Practice of Skin Toxicology, John Wiley & Sons, Ltd; 2008.

¹³⁸ Kielhom, J., Mangelsdorf, I. Environmental Health Criteria 235. Dermal Absorption. WHO. 2006.

¹³⁹ Dragicevic, N., Maibach, H. I. Percutaneous Penetration Enhancers. Drug Penetration Into/Through the Skin. Springer; 2017.

$$J_{max} = \frac{1.85 DC_0\delta}{h^2} \quad (8)$$

$$t_{max} = \frac{h^2 - \delta^2}{6D} \quad (9)$$

donde δ es el grosor de la capa de compuesto aplicado sobre la superficie de la piel, cuando el compuesto se aplique directamente sobre la piel (cremas, líquidos, sólidos, ...). Por otro lado, D puede estimarse una vez conocidos los valores de J_{max} y t_{max} , los cuales se suelen obtener de forma experimental.

Sin embargo, en algunos casos, la aplicación repetida de una dosis finita puede resultar esencialmente condiciones de dosis semi-infinitas.¹⁴⁰ Se trata de un caso intermedio entre las condiciones de dosis finita e infinita (Figura 9).¹⁴¹

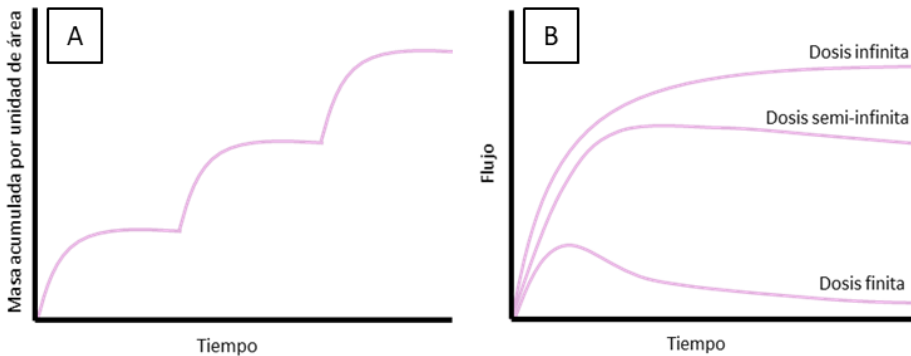


Figura 9. Perfil de absorción en condiciones de dosis semi-infinitas (A) y gráfica comparativa de la evolución del flujo molecular a lo largo del tiempo en estudios de permeabilidad en condiciones de dosis infinita, semi-infinita y finita (B).

En conclusión, los estudios de absorción en condiciones de dosis finitas e infinitas tienen diferentes aplicaciones en la evaluación de la exposición dérmica, de manera que cada metodología presenta sus ventajas e inconvenientes. Por un lado, los estudios realizados en condiciones de dosis finitas permiten simular una situación

¹⁴⁰ Chilcott, R. P., Price, S. Principles and Practice of Skin Toxicology, John Wiley & Sons, Ltd; 2008.

¹⁴¹ Frasch, H. F. Barbero, A. M. *In vitro* human skin permeation of benzene in gasolina: effects of concentration, multiple dosing and skin preparation. Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology. 2018; 28:193-201.

de exposición dérmica más realista que en condiciones de dosis infinitas. Sin embargo, estos últimos nos permiten obtener información sobre el comportamiento de los distintos permeantes evaluados, obteniendo parámetros de permeabilidad como el J y el t_{lag} , ya que se consigue un flujo constante en condiciones de estado estacionario. Así, los modelos matemáticos nos permiten predecir la cinética de la absorción dérmica tanto en estado estacionario como no estacionario, en función de las necesidades del estudio a realizar, aunque es necesario tener en cuenta las limitaciones de los mismos.

3.5. Tipos de ensayos

Dado que la piel es el órgano más grande del cuerpo y actúa como primera línea de defensa frente a factores externos, la absorción dérmica de contaminantes atmosféricos resulta realmente importante, dependiendo de la concentración de contaminantes en el medio ambiente y de la capacidad de los mismos para penetrar en la piel.¹⁴² Por tanto, la evaluación de la absorción de estos compuestos a través de la piel, es un parámetro que debe ser estudiado para evaluar los posibles riesgos relacionados con su presencia en el medio ambiente. Esta evaluación se puede realizar mediante dos tipos de ensayos, *in vivo* o *in vitro*.

3.5.1. Ensayos *in vivo*

Los ensayos *in vivo* se realizan bien con humanos voluntarios o con animales respetando protocolos previamente aprobados por un comité de ética ¹⁴³. Sin embargo, los estudios *in vivo* para evaluar la absorción dérmica de compuestos son muy limitados en humanos debido a consideraciones éticas, por lo que están más extendidos en animales como las ratas, cerdos, etc.¹⁴⁴

Asimismo, por cuestiones éticas, los estudios de absorción dérmica *in vivo* deben evitarse siempre que sea posible, y sustituirlos por alternativas *in vitro* adecuadas. Sin embargo, los estudios *in vitro* no consideran una serie de parámetros

¹⁴² Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. NTP 697: Exposición a contaminantes químicos por vía dérmica. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, Gobierno de España. 2018

¹⁴³ European Commission. Guidance Document on Dermal Absorption. 2004.

¹⁴⁴ OECD. Guidance notes on dermal absorption. No 156. 2019.

bioquímicos, inmunológicos y fisiológicos, que resultan fundamentales para la determinación de la toxicidad de los compuestos evaluados.^{145, 146}

La realización de estudios *in vivo* con humanos se rige por tratados internacionales para asegurar que los estudios se lleven a cabo de forma ética. Antes de 1948, no existían pautas formales para la realización de estudios en humanos, siendo el científico que lo realizaba el responsable de establecer la ética del mismo. Estas investigaciones se realizaban generalmente teniendo en cuenta la ideología del juramento hipocrático, cuya base se centra en “no llevar otro propósito que el bien y la salud de los enfermos”.¹⁴⁷

Sin embargo, durante la Segunda Guerra Mundial se cometieron numerosas atrocidades en nombre de la ciencia, por lo que en 1948 se introdujo El Código de Nuremberg. Este código está formado por diez puntos centrados en el consentimiento del voluntario tras ser correctamente informado, la ausencia de coacción, el diseño de una metodología científica válida, y que dicho estudio resulte beneficioso para el voluntario.¹⁴⁸

Posteriormente, en 1964, la Asociación Médica Mundial propuso la declaración de Helsinki, la cual rige la ética de la investigación internacional. Desde entonces ha ido sufriendo modificaciones en los años 1975, 1983, 1989, 1996 y 2000. La declaración constituye la base de una “buena práctica clínica”, siendo el código de Nuremberg su base y ampliándose con el paso de los años. Propone la realización de estudios previos de laboratorio y en animales, revisados por personal cualificado, y establece que dicho estudio debe suponer un beneficio superior al riesgo al que se somete el voluntario.¹⁴⁹

Los estudios *in vivo* con animales se encuentran regulados generalmente por la legislación nacional, por lo que existen numerosas variaciones entre los distintos países. El 24 de noviembre de 1986, el Consejo de la Unión Europea adoptó la Directiva 86/609/CEE, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, donde se

¹⁴⁵ OECD. Guidance notes on dermal absorption. No 156. 2019.

¹⁴⁶ Kielhom, J., Mangelsdorf, I. Environmental Health Criteria 235. Dermal Absorption. WHO. 2006.

¹⁴⁷ Chilcott, R. P., Price, S. Principles and Practice of Skin Toxicology, John Wiley & Sons, Ltd; 2008.

¹⁴⁸ Tribunal Internacional de Núremberg. Código de Núremberg; 1948.

¹⁴⁹ World Medical Association Declaration of Helsinki. 52nd WMA General Assembly, Edinburgh, Scotland, October 2000.

determinan aspectos como quién, dónde y cómo deben realizarse este tipo de experimentos.¹⁵⁰ Desde la adopción de dicha Directiva, han vuelto a surgir disparidades entre los Estados Miembros. Algunos han adoptado medidas nacionales de ejecución que garantizan el elevado nivel de protección de los animales utilizados con fines científicos, mientras que otros aplican únicamente los requisitos mínimos previstos en la Directiva 86/609/CEE.

España se limitó inicialmente a trasladar las exigencias europeas con la promulgación del Real Decreto 223/1988 de 14 de marzo, sobre protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos. En todo este tiempo, estas leyes de carácter internacional han ido evolucionando, siendo cada vez más estrictas, con el fin de mejorar el bienestar físico y psíquico de los animales empleados en experimentación.¹⁵¹ Estas modificaciones quedan recogidas en el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, vigente hoy día, donde se establece que las personas que manejen los animales deberán poseer una capacitación adecuada con carácter previo al desarrollo de su labor.¹⁵² A partir de dicho Decreto, se creó el CEPAFIC, un órgano encargado de asesorar tanto a la Administración General del Estado, como a las comunidades autónomas y ciudades de Ceuta y Melilla y a los órganos encargados del bienestar de los animales en cuestiones relacionadas con la adquisición, cría, alojamiento, cuidado y utilización de los animales con fines científicos. Además, la Orden Ministerial ECC/566/2015, de 20 de marzo, establece que, para el mantenimiento de la capacitación inicial, será necesario realizar un “Plan de formación continua en experimentación animal para investigadores y técnicos” para asegurar la mejora y puesta al día de las habilidades y conocimientos inicialmente adquiridos, al menos cada 8 años.¹⁵³

Sin embargo, en algunos países no existen requisitos formales con respecto al uso de animales para la realización de ensayos *in vivo*. Aunque la legislación varía entre los distintos países, resulta fundamental que los animales empleados en los ensayos se encuentren en una situación de bienestar. Por ello, la mayor parte de

¹⁵⁰ Directiva 86/609/CEE. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. 1986.

¹⁵¹ Rumbo Prieto, J. M^a. El respeto al bienestar de los animales de experimentación. *Ética de los cuidados*. 2012; 5(10).

¹⁵² Ministerio de la Presidencia, Relaciones con las Cortes y Memoria Democrática, Gobierno de España. https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2013-1337 Acceso marzo 2021.

¹⁵³ Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Gobierno de España. <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/bienestanimal/en-la-investigacion/CEPAFIC.aspx> Acceso mayo 2021.

las revistas científicas de prestigio no aceptan artículos de ensayos *in vivo* con animales que no contengan una declaración de bienestar animal.

En 2004, la Organización para el Desarrollo Económico y Cooperativo (OECD), de carácter internacional, publicó una metodología (Guideline 427) que describe la realización estándar de estudios de absorción percutánea *in vivo* con animales de experimentación.¹⁵⁴ La principal ventaja de esta metodología es que permite tener en cuenta características sistémicas como el sistema cardiovascular, sistema inmunológico, etc., que no puede replicarse utilizando un sistema *in vitro*. Sin embargo, una desventaja de las técnicas *in vivo* son que pueden requerir que el compuesto de prueba sea radiomarcado para permitir la detección del compuesto absorbido por vía dérmica. Además, también puede haber diferencias significativas en la permeabilidad de la piel de diferentes especies, por lo que el uso de animales puede no proporcionar una determinación precisa de la absorción del compuesto evaluado en humanos. Previamente al ensayo, es necesaria la selección de la especie animal con la que se realizará el estudio, aunque generalmente se suelen emplear ratas, ratones, cerdos o conejos. Posteriormente, se establece el número y sexo de animales que participarán en el estudio. Estos ensayos suelen llevarse a cabo a una temperatura de 22 ± 3 °C, con una humedad en el intervalo del 30 al 70 %, y con luz artificial durante 12 h y oscuridad durante otras 12 h. Además, los animales deben disponer de alimento y agua.¹⁵⁴

El principio de este test consiste en la evaluación de la absorción dérmica de una sustancia, preferiblemente radiomarcada. Para ello, esta sustancia se aplica en la piel del animal en una determinada dosis, y durante un tiempo de exposición establecido. Transcurrido el tiempo de exposición, se retira la sustancia evaluada y se limpia la piel de forma adecuada, conservándose la sustancia retirada y los materiales de limpieza para su posterior análisis. Además, el aire exhalado también es analizado. En cada estudio, generalmente hay varios grupos de animales de experimentación expuestos a la sustancia evaluada. Unos grupos serán sacrificados a intervalos de tiempo programados. Al final del tiempo de muestreo, se sacrifican los animales restantes, y se analiza su sangre, la piel expuesta y el cadáver para detectar cualquier material no excretado. Estas muestras se analizan por medios adecuados y se estima el grado de absorción percutánea.¹⁵⁴

¹⁵⁴ OECD, Test Guideline 427 Skin Absorption: *in vivo* Method. 2004.

El grado de absorción dérmica de sustancias químicas puede ser evaluado analizando dichas sustancias y/o sus metabolitos en sangre o excreciones, en piel extirpada, en otros tejidos, o en aire exhalado, por lo que no es necesario el sacrificio.^{155, 156, 157} Dado que para el estudio de algunas sustancias es necesario el análisis de sus metabolitos, es importante que la cinética y las características metabólicas del compuesto estén bien definidas, para así determinar con precisión la absorción dérmica del mismo. Algunos de los métodos utilizados en la evaluación de la permeabilidad son, la técnica de microdiálisis, la extracción con cinta del estrato córneo (tape stripping) y el análisis de piel mediante métodos espectroscópicos.^{158, 159}

La microdiálisis mide sustancias químicas aplicadas sobre la piel. El principio de esta técnica se basa en la difusión de las sustancias químicas a través de la membrana semipermeable de una sonda de microdiálisis que se introduce en la dermis paralela a la superficie de la piel expuesta (Figura 10). La sonda se introduce lentamente con un tampón estéril compatible con el tejido, imitando el flujo de sangre. Las moléculas capaces de atravesar la membrana de la sonda difundirán hacia el tampón, que se recoge a diferentes intervalos de tiempo para su análisis.^{160, 161}

Puesto que la sustancia química se mide antes de que entre en la circulación, la microdiálisis es una técnica adecuada para el estudio del metabolismo cutáneo. Además, permite la evaluación de la cinética de las sustancias químicas a través de la piel sin necesidad de realizar una exposición de referencia, y se puede evaluar varios puntos de muestreo al mismo tiempo en el mismo individuo.¹⁶² Ejemplos del

¹⁵⁵ Kielhom, J., Mangelsdorf, I. Environmental Health Criteria 235. Dermal Absorption. WHO. 2006.

¹⁵⁶ Akrill, P., Cocker, J., Dixon, S. Dermal exposure to aqueous solutions of N-methyl pyrrolidone. Toxicology Letters. 2002; 134:265-269.

¹⁵⁷ Kezic, S., Janmaat, A., Krüse, J. et al. Percutaneous absorption of m-xylene vapour in volunteers during pre-steady and steady state. Toxicology Letters. 2004; 153:273-282.

¹⁵⁸ Kezic, S. Methods for measuring in-vivo percutaneous absorption in humans. Human & Experimental Toxicology. 2008; 27:289-295.

¹⁵⁹ Morais Ruela, A. L., Perissinato, A. G. de Sousa Lino, M. E., et al. Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2016; 52(3):527-544.

¹⁶⁰ Benfeldt, E., Hansen, S. H., Vølund, A., et al. Bioequivalence of Topical Formulations in Humans: Evaluation by Dermal Microdialysis Sampling and the Dermatopharmacokinetic Method. Journal of Investigative Dermatology. 2007; 127(1):170-178.

¹⁶¹ Voelkner, N. M., Voelkner, A., Derendorf, H. Determination of Dermal Pharmacokinetics by Microdialysis Sampling in Rats. Current Protocols in Pharmacology. 2019; 85(1):1-17.

¹⁶² Erdő, F., Hashimoto, N., Karvaly, G., et al. Critical evaluation and methodological positioning of the transdermal microdialysis technique. A review. Journal of Controlled Release. 2016; 233:147-161.

empleo de microdiálisis son la determinación de la absorción dérmica de PAHs y ¹⁶³ principios activos de fármacos, ^{164, 165} en humanos o animales de experimentación.

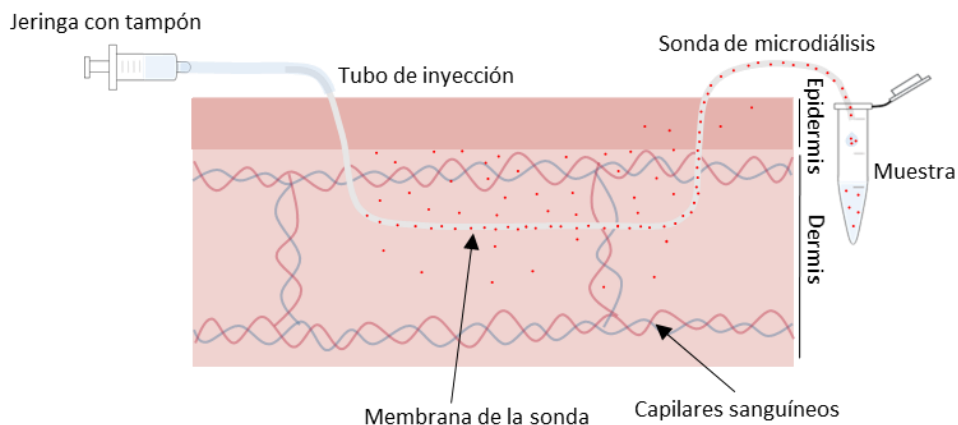


Figura 10. Prueba de microdiálisis in vivo para la evaluación de la absorción dérmica de sustancias químicas.

El tape stripping permite la determinación de la cantidad de compuesto absorbido en el estrato córneo tras un determinado tiempo de exposición. El tape stripping se basa en la eliminación de las células más superficiales del estrato córneo mediante el uso de tiras adhesivas, generalmente de materiales poliméricos.¹⁶⁶ Para ello, previamente se indica y se limpia la zona de piel evaluada para eliminar cualquier material residual de la superficie. Posteriormente, se cortan y se pesan las tiras adhesivas, y se aplica el compuesto evaluado en la piel. Transcurrido un

¹⁶³ Sui, X., Terán, J. E., Feng, C., et al. Quantification of anthracene after dermal absorption test via APCI-tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*. 2020; 12:2820-2826.

¹⁶⁴ Kuzma, B. A., Senemar, S., Ramezani, T., et al. Evaluation of local bioavailability of metronidazole from topical formulations using dermal microdialysis: Preliminary study in a Yucatan mini-pig model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021; 159:1-8.

¹⁶⁵ Voelkner, N. M. F., Voelkner, A., Costa, J., et al. Dermal pharmacokinetics of pyrazinamide determined by microdialysis sampling in rats. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2018; 51:190-196.

¹⁶⁶ Olesen, C. M., Krohn Fuchs, C. S., Philipsen, P. A., et al. Advancement through epidermis using tape stripping technique and Reflectance Confocal Microscopy. *Scientific Reports*. 2019; 9:12217.

determinado periodo de tiempo, se aplican y retiran las tiras adhesivas sucesivamente, eliminando así las células más superficiales del estrato córneo.¹⁶⁷

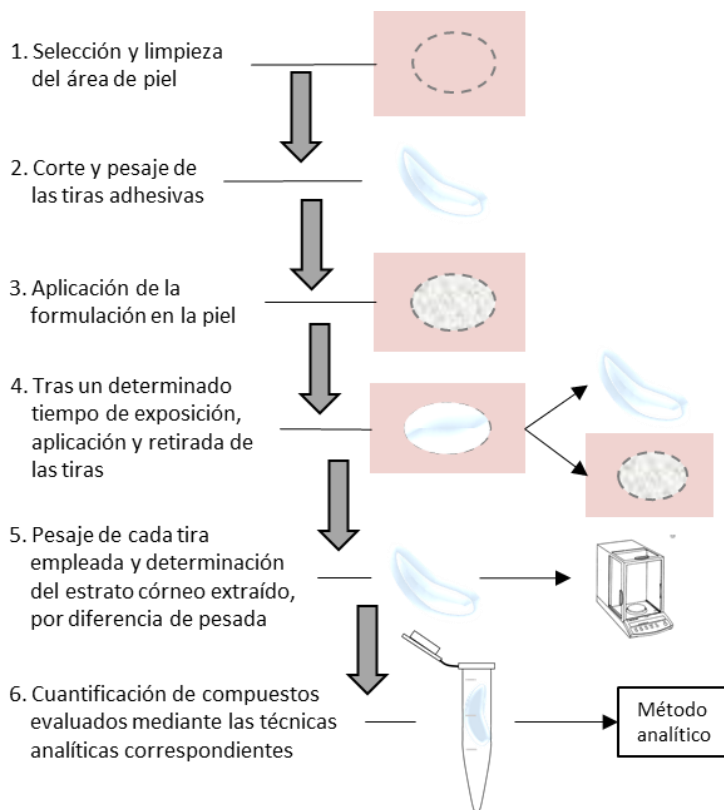


Figura 11. Esquema del método tape stripping.

La primera tira se desecha ya que se considera que contiene el exceso de compuesto no absorbido en la superficie de la piel. Estas tiras se vuelven a pesar y se determina la cantidad de estrato córneo extraído por diferencia de peso. Finalmente, las tiras utilizadas se analizan mediante el método analítico más adecuado para determinar los compuestos evaluados. Frecuentemente se realiza un análisis mediante LC, tras una etapa previa de extracción. En la Figura 11 aparece un esquema donde queda resumida las principales etapas de esta técnica. Ejemplos

¹⁶⁷ Escobar-Chávez, J. J., Merino-Sanjuán, V., López-Cervantes, M., et al. The Tape-Stripping Technique as a Method for Drug Quantification in Skin. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2008; 11(1):104-130.

del empleo de la metodología tape-stripping son la determinación de especies presentes en medicamentos como la clorhexidina,¹⁶⁸ y la evaluación de la bioequivalencia de productos farmacéuticos de administración tópica.¹⁶⁹

Una ventaja de esta técnica es que se puede realizar tanto en voluntarios humanos como en animales. Sin embargo, la principal limitación de esta metodología es que existe una gran variabilidad en el número de corneocitos extraídos con cada cinta, por lo que el número de cintas adhesivas empleado puede no ser proporcional al número de células extraídas. Esto se debe a que la extracción se encuentra afectada por diversos factores, como la fuerza de extracción de las tiras, la hidratación de la piel, etc.¹⁷⁰

Los métodos espectroscópicos son una herramienta útil para el análisis de las propiedades de la piel y para confirmar la penetración a través de la misma de sustancias de interés con un perfil espectroscópico adecuado. Se trata de técnicas rápidas y no invasivas, generalmente basadas en la espectroscopía infrarroja¹⁷¹ y la espectroscopía Raman confocal.¹⁷² La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) se emplea en estudios para la evaluación de la composición del estrato córneo, y por tanto para la evaluación de la absorción dérmica de compuestos de interés.^{173,174} En ocasiones, previamente se realiza un tape stripping que permite retirar y analizar las capas más superficiales del estrato córneo.¹⁷⁵ La espectroscopía Raman confocal (CRS) permite el análisis de sustancias, tanto en la superficie como dentro de las capas más profundas de la

¹⁶⁸ Zhao, X., Schanffzin, J. K., Carson, J., et al. Analysis of chlorhexidine gluconate in skin using tape stripping and ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2020; 183:1-8.

¹⁶⁹ Nallagundla, S., Patnala, S., Kanfer, I. Application of an Optimized Tape Stripping Method for the Bioequivalence Assessment of Topical Acyclovir Creams. *AAPS PharmSciTech*. 2018; 19(4):1567-1573.

¹⁷⁰ Escobar-Chávez, J. J., Merino-Sanjuán, V., López-Cervantes, M., et al. The Tape-Stripping Technique as a Method for Drug Quantification in Skin. *J Pharm Pharmaceut Sci*. 2008; 11(1):104-130.

¹⁷¹ Morais Ruela, A. L., Perissinato, A. G. de Sousa Lino, M. E., et al. Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016; 52(3):527-544.

¹⁷² Binder, L., Kulovits, E. M., Petz, R., et al. Penetration monitoring of drugs and additives by ATR-FTIR spectroscopy/tape stripping and confocal Raman spectroscopy – A comparative study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2018; 130:214-223.

¹⁷³ Rarovoy, Y., Drutis, D. M., Hancewicz, T. M., et al. Quantification of lipid phase order of in vivo human skin using attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR FT-IR) spectroscopy and multivariate curve resolution analysis. *Applied Spectroscopy*. 2019; 73(2):182-194.

¹⁷⁴ Westfall, A., Sigurdson, G. T., Rodriguez-Saona, L. E. et al. Ex Vivo and In Vivo Assessment of the Penetration of Topically Applied Anthocyanins Utilizing ATR-FTIR/PLS Regression Models and HPLC-PDA-MS. *Antioxidants*. 2020; 9(6):1-14.

¹⁷⁵ Reddy, M. B., Stinchcomb, A. L., Guy, R. H., et al. Determining Dermal Absorption Parameters *in Vivo* from Tape Strip Data. *Pharmaceutical Research*. 2002; 19(3):292-298.

piel, así como la evaluación de las propiedades de la piel. Esto se logra mediante la técnica confocal, en la que un láser se enfoca en un punto específico debajo de la superficie de la piel y solo se detecta la radiación dispersa Raman resultante de un pequeño volumen en el plano focal.¹⁷⁶ Algunos estudios realizados evalúan la absorción dérmica de compuestos peligrosos para la salud como el tolueno, pireno, 2-butoxietanol, etc.,¹⁷⁷ de principios activos presentes en cosméticos, etc.¹⁷⁸

3.5.2. Ensayos *in vitro*

Los ensayos *in vitro* son ampliamente utilizados en la industria y centros de investigación para evaluar la absorción dérmica de distintos compuestos. Esta metodología permite obtener información adicional frente a los estudios *in vivo*, como la velocidad de absorción dérmica de los compuestos estudiados. Estos ensayos ofrecen la posibilidad de profundizar en los diferentes factores que influyen en la absorción dérmica, como las propiedades físico-químicas de los compuestos evaluados, su concentración, la variabilidad existente entre membranas de distinto origen, etc., ya que permiten diseñar y controlar las condiciones en las que se desarrolla el estudio.

La OECD Guideline 428 es una guía que proporciona información sobre la realización de estudios *in vitro* para la evaluación de la absorción de sustancias de interés a través de simulantes de piel o piel extirpada, basados en el uso de celdas de Franz.¹⁷⁹ La sustancia evaluada (radiomarcada o no, según las necesidades del estudio), se aplica sobre la superficie de la membrana situada entre los dos compartimentos de la celda de difusión, y transcurrido un tiempo determinado, en condiciones específicas, se retira dicha sustancia mediante un procedimiento adecuado. A lo largo del ensayo, se realizan muestreos de la disolución receptora a distintos tiempos de exposición, que posteriormente serán analizados para así determinar la permeabilidad de la sustancia evaluada. Además, para obtener información adicional sobre la permeabilidad de dicha sustancia, también se puede

¹⁷⁶ Darlenski, R., Sassning, S., Tsankov, N., et al. Non-invasive *in vivo* methods for investigation of the skin barrier physical properties. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009; 72:295-303.

¹⁷⁷ Broding, H. C., van der Pol, A., de Sterke, J. et al. *In vivo* Monitoring of epidermal absorption of hazardous substances by confocal Raman micro-spectroscopy. *Journal of the German Society of Dermatology*. 2011; 9(8):618-627.

¹⁷⁸ Tippavajhala, V. K., de Oliveira Mendes, T., Martin, A. A. *In Vivo* Human Skin Penetration Study of Sunscreens by Confocal Raman Spectroscopy. *AAPS PharmSciTech*. 2017; 19(2):753-760.

¹⁷⁹ OECD 428, Test Guideline 428 Skin Absorption: *in vitro* Method. 2004.

analizar la piel tratada. Para demostrar la validez del estudio realizado, los resultados obtenidos para sustancias químicas relevantes se deben comparar con los disponibles en la literatura publicada.¹⁸⁰

Generalmente, la absorción dérmica, migración y/o permeabilidad de los compuestos orgánicos a través de la piel se determina mediante el empleo de celdas de difusión vertical (celdas de Franz).¹⁸¹ La celda de difusión vertical de Franz estática (Figura 12), desarrollada en 1975, está formada por dos cámaras, una donadora y otra receptora, separadas por una membrana de origen animal, humana o sintética que permite evaluar la difusión de los compuestos de una cámara a la otra. El compartimento donde se deposita la disolución receptora está rodeado por una camisa que permite la circulación de agua termostatazada, para mantener constante la temperatura. Sobre la disolución receptora se coloca la membrana, de manera que no queden burbujas. Así, un lado de la membrana quedará en contacto con la disolución receptora y el otro con el exterior, quedando por tanto expuesta a la disolución donadora. Como fase receptora se suele utilizar tampón fosfato salino (PBS) a pH 7.4.

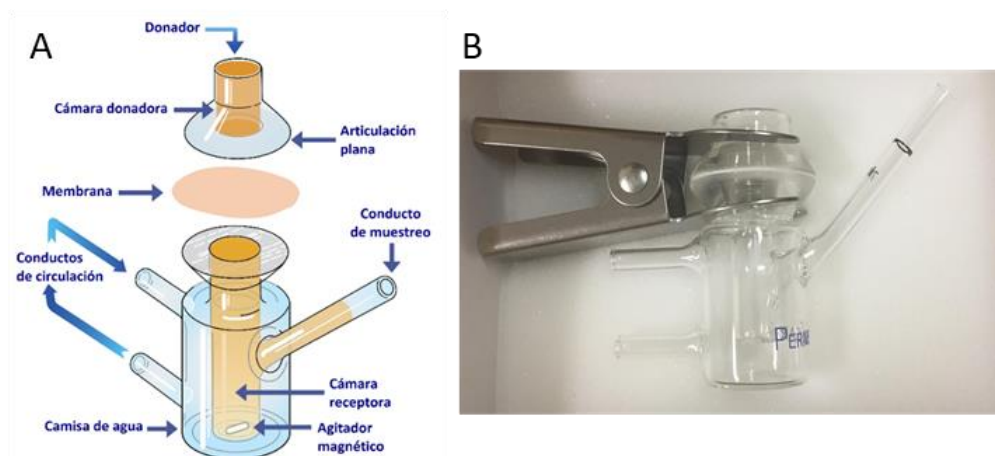


Figura 12. Esquema (A) y fotografía (B) de una celda de difusión vertical de Franz estática.¹⁸¹

Existen diferentes variantes de celdas de Franz (Figura 13) en función de las necesidades de los estudios a realizar. Las celdas de Franz de tipo 1 poseen puertos

¹⁸⁰ OECD. Guidance notes on dermal absorption. No 156. 2019.

¹⁸¹ PermeGear. 2019 <https://permeGear.com/franz-cells/> Acceso enero 2021.

de flujo, y si estos se cierran con tapones pueden ser utilizadas como celdas de difusión estáticas. Las celdas de tipo 2 son como las de tipo 1 excepto que el puerto de muestreo no está presente. Las de tipo 3 poseen dos puertos de flujo o muestreo dispuestos hacia la parte frontal de la celda. Finalmente, las celdas de tipo 4 son como las de tipo 1, excepto que los brazos de entrada y salida de flujo tienen una configuración diferente, formando un ángulo de 90°.¹⁸²

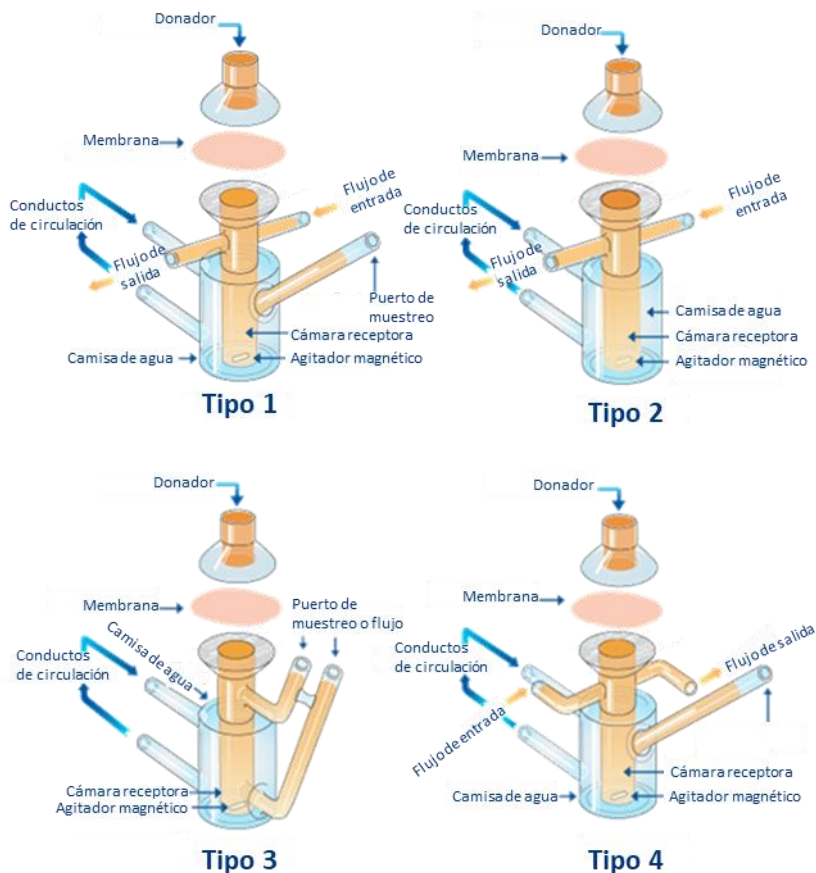


Figura 13. Variantes de las celdas de Franz.¹⁸²

¹⁸² PermeGear. 2019 <https://permegear.com/franz-cells/> Acceso enero 2021.

Entre los parámetros que influyen en la difusión de un determinado compuesto orgánico desde la disolución donadora a la receptora destacan: la temperatura, el tipo y naturaleza de la membrana, el medio del compartimento receptor, y de la disolución donadora.^{183, 184}

La temperatura afecta a la difusión de moléculas orgánicas a través de una membrana en la medida que afecta a la energía cinética de las moléculas que difunden. Este efecto ha sido previamente demostrado por otros investigadores, con experimentos en los que aumentando la temperatura obtienen una mayor absorción de los compuestos ya que aumenta la energía cinética de las moléculas.¹⁸⁵ Este aumento de la energía cinética se traduce en un aumento de la transitoriedad de las interacciones entre las moléculas que difunden y los grupos funcionales de los materiales que forman la membrana, disminuyendo, por tanto, el tiempo de transición entre las interfases de la membrana.

En cuanto a la naturaleza de la membrana, es obvio que el empleo de piel humana proporciona datos más reales de la exposición del ser humano a contaminantes atmosféricos. Sin embargo, el empleo de piel humana obtenida de cadáveres u operaciones de cirugía conlleva una serie de dificultades entre las que cabe destacar: i) la piel no es una membrana homogénea y uniforme, ii) conlleva una serie de variaciones impredecibles en función de la etnia, edad, sexo y parte del cuerpo, y iii) es difícil de conseguir.¹⁸⁶

Por otra parte, el empleo de piel de animal (rata, ratón, cerdo, etc.) conlleva adicionalmente la dificultad de las prohibiciones asociadas al desarrollo de productos cosméticos (o farmacéuticos) en los que se emplean modelos animales, así como a la dificultad de su obtención.¹⁸⁷ Además, también hay que tener en cuenta las diferencias entre las propiedades de la piel de animales con la piel humana. Por ejemplo, en un estudio se compara la permeabilidad de distintas

¹⁸³ Karadzovska, D., Brooks, J. D., Riviere, J. E. Experimental factors affecting in vitro absorption of six model compounds across porcine skin. *Toxicology in Vitro*. 2012; 26:1191-1198.

¹⁸⁴ Dragicevic, N., Maibach, H. I. *Percutaneous Penetration Enhancers. Drug Penetration Into/Through the Skin*. Springer; 2017.

¹⁸⁵ Yin, Q., Wang, R., Yang, S., et al. Influence of Temperature on Transdermal Penetration Enhancing Mechanism of Borneol: A Multi-Scale Study. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18(195):1-13.

¹⁸⁶ Haq, A., Dorrani, M., Goodyear, B., et al. Membrane properties for permeability testing: Skin versus synthetic membranes. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018; 539: 58-64.

¹⁸⁷ Consejo General de la Abogacía Española. <https://www.abogacia.es/publicaciones/blogs/blog-de-derecho-de-los-animales/animales-utilizados-en-experimentacion-especial-referencia-a-la-experimentacion-con-fines-cosmeticos-y-a-la-sentencia-del-tjue-de-21-de-septiembre-de-2016/> Acceso marzo 2021.

sustancias (docecilazacicloheptan-2-ona, dimetilsulfóxido, lauril sulfato de sodio, dodecil-L-piroglutamato y N-metil-2-pirrolidona) a través de piel humana y pieles obtenidas del dorso de distintas especies animales, muestra que los datos más similares a los del hombre se obtienen en cobaya, mientras que en animales como la rata y el ratón la penetración es aproximadamente entre 5 y 7 veces más elevada.¹⁸⁸

El desarrollo de membranas artificiales (sintéticas) como alternativa a estos modelos animales está cada vez más extendido, debido en gran parte a las ventajas inherentes de estos modelos (reproducibilidad experimental, inercia físico-química, de fácil obtención y menor coste).¹⁸⁹ Estas membranas artificiales se pueden clasificar en dos grupos: i) membranas que actúan como barrera, como las membranas de silicona, el polidimetilsiloxano (PDMS), y CarboSil,^{190, 191} las cuales son hidrófobas y limitadoras de velocidad, y ii) membranas empleadas como soporte, como los acetatos de celulosa, nitratos de celulosa y polisulfonas.^{192, 193, 194} Adicionalmente, se han empleado otros materiales como nylon, filtros Tuffryn, Durapore HVLP y Fluoropore FGLP, y membranas de nitrocelulosa VSWP en estudios de permeabilidad dérmica como simulantes de piel para evaluar la absorción dérmica de principios activos de fármacos como el aciclovir.¹⁹⁵

La silicona es un polímero isotrópico ampliamente utilizado como modelo alternativo para la predicción de la difusión o permeabilidad de compuestos orgánicos, por ejemplo principios activos de medicamentos como el ibuprofeno, a

¹⁸⁸ Priborsky, J., Mühlbachová, E. Evaluation of In-vitro Percutaneous Absorption across Human Skin and in Animal Models. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1990; 42:469-472.

¹⁸⁹ Haq, A., Goodyear, B., Ameen, D., et al. Strat-M[®] synthetic membrane: Permeability comparison to human cadaves skin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018; 547:432-437.

¹⁹⁰ Uchida, T., Yakumar, M., Nishioka, K., et al. Evaluation of a Silicone Membrane as an Alternative to Human Skin for Determining Skin Permeation Parameters of Chemical Compounds. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2016; 64(9):1338-1346.

¹⁹¹ Russeau, W., Mitchell, J., Tetteh, J., et al. Investigation of the permeation of model formulations and a commercial ibuprofen formulation in Carbosil[®] and human skin using ATR-FTIR and multivariate spectral analysis. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009; 374:17-25.

¹⁹² Chattaraj, S. C., Kanfer, I. Release of acyclovir from semi-solid dosage forms: a semi-automated procedure using a simple plexiglass flow-through cell. *International Journal of Pharmaceutics*. 1995; 125:215-222.

¹⁹³ Santoyo, S., Arellano, A., Ygartua, P., et al. In vitro percutaneous absorption of piroxicam through synthetic membranes and abdominal rat skin. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 1996; 71:141-146.

¹⁹⁴ Ng, S. F., Rouse, J. J., Sanderson, F. D., et al. The relevance of polymeric synthetic membranes in topical formulation assessment and drug diffusion study. *Archives of Pharmacal Research*. 2012; 35:579-593.

¹⁹⁵ Nallagundla, S., Patnala, S., Kanfer, I. Comparison of *In Vitro* Release Rates of Acyclovir from Cream Formulations Using Vertical Diffusion Cells. *AAPS PharmSciTech*. 2014; 15(4):994-999.

través de la piel.¹⁹⁶ La difusión de los compuestos orgánicos a través de silicona sigue la ley de Fick y posee propiedades hidrofóbicas como la piel, siendo un modelo aceptable para la capa córnea (la parte más externa de epidermis).¹⁹⁷

En este sentido, las membranas Strat-M® han sido diseñadas con el objetivo de imitar las características de la piel. Como se puede ver en la Figura 14, la membrana Strat-M® consiste en múltiples capas con diferente permeabilidad. Dicha membrana consta de dos capas de polietersulfona (PES) más resistentes a la difusión, sobre una capa de poliolefina (con una mayor permeabilidad). Estas capas poliméricas crean una estructura porosa con un gradiente a través de la membrana en términos de tamaño de poro y permeabilidad. La estructura porosa está impregnada con una mezcla de lípidos sintéticos, que le aportan a la membrana unas propiedades adicionales que la asemejan aún más a la piel humana. Se han realizado estudios de migración con este tipo de membranas y con piel humana (obtenida a partir de cadáveres) en compuestos orgánicos con pesos moleculares entre 162 y 425 g mol⁻¹ con valores de log P (que indican la lipofilidad relativa) entre -0.131 y 6.9, obteniendo resultados similares con ambas membranas.^{198,199,200}

¹⁹⁶ Ng, S-R., Rouse, J., Sanderson, D., et al. A Comparative Study of Transmembrane Diffusion and Permeation of Ibuprofen across Synthetic Membranes Using Franz Diffusion Cells. *Pharmaceutics*. 2010; 2:209-223.

¹⁹⁷ Uchida, T., Yakumar, M., Nishioka, K., et al. Evaluation of a Silicone Membrane as an Alternative to Human Skin for Determining Skin Permeation Parameters of Chemical Compounds. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2016; 64(9):1338-1346.

¹⁹⁸ Arce, F. JR., Asano, N., See, G. L., et al. Usefulness of Artificial Membrane, Strat.M®, in the Assessment of Drug Permeation from Complex Vehicles in Finite Dose Conditions. *Pharmaceutics*. 2020; 12(173): 2-11.

¹⁹⁹ Haq, A., Dorrani, M., Goodyear, B., et al. Membrane properties for permeability testing: Skin versus synthetic membranes. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018; 539(1-2):58-64.

²⁰⁰ Haq, A., Goodyear, B., Ameen, D., et al. Strat-M® synthetic membrane: Permeability comparison to human cadaver skin. 2018; 547:432-437.



Figura 14. Comparación de la estructura de la piel humana y la membrana Strat-M[®].²⁰¹

También se han realizado estudios de absorción dérmica mediante ensayos de permeabilidad de membrana artificial en paralelo (PAMPA). Este método permite determinar la permeabilidad de sustancias situadas en un compartimento donador, a través de una membrana artificial inducida con lípidos en un compartimento aceptor. Dicha membrana está formada por 50 % ceramidas, 15 % colesterol y 35 % ácidos grasos no esterificados.²⁰² Para estos ensayos se emplea una placa de múltiples pocillos para el donante y en la parte superior se coloca un compartimento membrana/aceptor, denominándose el conjunto completo como “sándwich”. Al inicio de la prueba, se añade el compuesto a evaluar en el compartimento donador, estando el compartimento aceptor libre de éste. Transcurrido un periodo de incubación (con o sin agitación), se separa el sándwich y se mide la concentración de cada compartimento.²⁰³

Se han desarrollado modelos de piel humana reconstruida para estudios dermatológicos *in vitro*. Algunos de ellos son EpiSkin[®], EpiDerm[®] y SkinEthic[®] para los que se ha demostrado que poseen similitudes razonables de morfología y composición de lípidos y marcadores bioquímicos con la piel humana.²⁰⁴ En Alemania se ha realizado un estudio llevado a cabo por 10 laboratorios diferentes,

²⁰¹ Merck Millipore. https://www.merckmillipore.com/ES/es/product/Strat-M-Membrane-for-Transdermal-Diffusion-Testing,MM_NF-C112892#overview Acceso marzo 2021.

²⁰² Siinkó, B., Garrigues, T. M., Balogh, G. T., et al. Skin-PAMPA: A new method for fast prediction of skin penetration. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012; 45:698-707.

²⁰³ Zhang, Y., Lane, M. E., Hadgraft, J., et al. A comparison of the *in vitro* permeation of niacinamide in mammalian skin and in the Parallel Artificial Membrane Permeation Assay (PAMPA) model. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019; 556:142-149.

²⁰⁴ Schäfer-Korting, M., Bock, U., Diembeck, W. et al. The Use of Reconstructed Human Epidermis for Skin Absorption Testing: Results of the Validation Study. *ATLA*. 2008; 36:161-187.

donde se evaluó la absorción dérmica de manitol, ácido benzoico, cafeína, nicotina, digoxina, ácido flufenámico, testosterona, clotrimazol e ivermectina B1a. Mediante la comparación de las características de estos modelos de piel reconstruída frente a modelos de piel humana y de cerdo, se demostró que a pesar de que existe correlación entre los parámetros de permeación obtenidos para cada caso, en general, los valores de permeación eran mayores para los modelos de piel reconstruída que los obtenidos para piel humana y de cerdo.²⁰⁵

²⁰⁵ Schäfer-Korting, M., Bock, U., Diembeck, W. et al. The Use of Reconstructed Human Epidermis for Skin Absorption Testing: Results of the Validation Study. ATLA. 2008; 36:161-187.

4. Estudios de absorción de contaminantes perjudiciales del aire a través de la piel

Debido a la importancia de la exposición dérmica a HAPs, se han realizado numerosos estudios en los que se evalúa la absorción cutánea de dichos compuestos. Dependiendo de las necesidades del estudio, se han realizado ensayos *in vivo* o *in vitro*. Como se ha explicado anteriormente, los estudios *in vivo* generalmente se realizan con animales y raramente con humanos, sin embargo, por cuestiones éticas se está tratando de minimizar este tipo de estudios. Con este objetivo, se están desarrollando métodos *in vitro*. Estos estudios se centran en el uso de celdas de Franz, empleando como membranas piel humana o de animal, así como simulantes de piel. También hay que destacar que la naturaleza de la fase donadora varía de unos estudios a otros, pudiendo ser desde una fase gaseosa a una solución acuosa, disolvente puro, disolución en disolventes orgánicos, formulaciones, etc. A continuación, se comentan algunos de los estudios de permeabilidad llevados a cabo para evaluar la absorción dérmica de distintos HAPs.

Algunos investigadores han llevado a cabo estudios *in vivo* en humanos y animales de experimentación para evaluar la absorción dérmica de HAPs como los BTEX, estireno, hexano, percloroetileno, 1,2-dichloroethane, cloroformo, tricloroetileno, 1,1,1-tricloroetano, tetracloruro de carbono y tetracloroetileno, entre otros.^{206, 207, 208}

En un estudio se evaluó la absorción dérmica de benceno en humanos mediante aplicación de disolvente puro sobre la piel del antebrazo o las palmas de las manos, y posterior análisis de orina tomada a distintos tiempos de exposición. Este se centró en obtener el porcentaje de absorción del benceno, en lugar del flujo molecular del mismo, obteniendo valores de absorción total de 0.07 ± 0.04 % para la exposición del antebrazo, y 0.13 ± 0.04 % para la exposición de la palma de la

²⁰⁶ McDougal, J. N., Jepson, G. W., Clewell III, H. J., et al. Dermal Absorption of Organic Chemical Vapor in Rats and Humans. *Fundamental and Applied Toxicology*. 1990; 14:299-308.

²⁰⁷ Modjtahedi, B. S., Maibach, H. I. In vivo percutaneous absorption of benzene in man: Forearm and palm. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46:1171-1174.

²⁰⁸ Morgan, D. L., Cooper, S. W., Carlock, D. L., et al. Dermal Absorption of Neat and Aqueous Volatile Organic Chemicals in the Fischer 344 Rat. *Environmental Research*. 1991; 55:51-63.

mano. Estos valores de absorción corroboran las diferencias existentes entre la piel de las distintas zonas del cuerpo humano.²⁰⁹

Otros estudios, donde se emplearon ratas como animales de experimentación, evalúan la absorción dérmica de benceno, tolueno, m-xileno, estireno, percloroetileno y hexano. Éstas fueron expuestas a vapores de los HAPs evaluados y tras el análisis de sangre extraída a distintos tiempos se obtuvieron valores de flujo comprendidos entre 6.5 y 54.1 $\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$.²¹⁰

También se ha evaluado la absorción dérmica de VOCs en ratas Fischer 344. Este estudio se llevó a cabo mediante la aplicación dérmica de VOCs puros y en disolución acuosa, y tras la toma de muestras de sangre a distintos tiempos de exposición y su análisis se obtuvieron las correspondientes curvas de permeabilidad. En ellas se puede observar que para todos los VOCs evaluados se alcanzó el equilibrio en 24 h, excepto para benceno y 1,2-dicloroetano en los cuales los niveles de concentración en sangre seguían aumentando transcurridas las 24 h de exposición.²¹¹

Otro estudio se centró en la evaluación de la absorción dérmica de cloroformo, tricloroetileno y tetracloroetileno en cobayas sin pelo. Estas se introdujeron, a través de un orificio que posteriormente se recubre con una capa de aluminio, en una cámara de exposición de 0.86 L, quedando la cabeza en el exterior. Así el cuerpo queda sumergido en la disolución donadora acuosa situada en el interior de la cámara, a 32 °C. Una vez realizado el experimento se analizaron todas las muestras de orina y heces tomadas a lo largo de 4 semanas para determinar la absorción dérmica de los VOCs radiomarcados previamente.²¹²

Los estudios *in vitro* para evaluar la absorción dérmica de compuestos de interés se centran en el uso de celdas de Franz con superficies de exposición y volumen del compartimento receptor variables. Como fase donadora generalmente se emplea una disolución tampón salina a pH 7.4.

²⁰⁹ Modjtahedi, B. S., Maibach, H. I. In vivo percutaneous absorption of benzene in man: Forearm and palm. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46:1171-1174.

²¹⁰ McDougal, J. N., Jepson, G. W., Clewell III, H. J., et al. Dermal Absorption of Organic Chemical Vapor in Rats and Humans. *Fundamental and Applied Toxicology*. 1990; 14:299-308.

²¹¹ Morgan, D. L., Cooper, S. W., Carlock, D. L., et al. Dermal Absorption of Neat and Aqueous Volatile Organic Chemicals in the Fischer 344 Rat. *Environmental Research*. 1991; 55:51-63.

²¹² Bogen, K. T., Colston, B. W., Jr. Colston, et al. Dermal absorption of dilute aqueous chloroform, trichloroethylene, and tetrachloroethylene in hairless guinea pigs. *Fundamental and Applied Toxicology*. 1992; 18(1):30-39.

En la Tabla 2 aparecen recogidos algunos estudios de absorción dérmica previos a esta tesis. En ellos se evalúa la absorción dérmica de contaminantes perjudiciales del aire mediante el uso de celdas de Franz. La naturaleza de la fase donadora varía en función de las necesidades del estudio, empleándose disolventes puros, disoluciones acuosas de los compuestos evaluados, distintos tipos de formulaciones, disoluciones en solventes orgánicos, etc. Algunos estudios emplean como membrana piel humana procedente de cirugías,^{213, 214, 215, 216, 217} sin embargo, otros utilizan piel de animales como el cerdo,²¹⁸ ratas,^{219,220} o cobayas.²²¹ Generalmente, a las membranas procedentes de piel humana o animal se les suele realizar un tratamiento previo a la piel empleada, donde se elimina el pelo, la grasa y se ajusta el grosor de la misma. Además de estas membranas, otro estudio emplea simulantes de piel como las membranas Strat-M[®],²²² las cuales no requieren la etapa previa de acondicionamiento. Las membranas situadas en las celdas de Franz se exponen a los contaminantes evaluados, y se realizan tomas de muestra de la disolución receptora a distintos tiempos de exposición. El volumen de las muestras tomado se reemplaza inmediatamente con disolución receptora fresca. Tras el análisis de estas muestras, se obtienen las correspondientes curvas de permeabilidad para cada uno de los HAPs evaluados, a partir de las cuales se obtienen parámetros de permeabilidad como el flujo y el tiempo de latencia.

²¹³ Adami, G., Larese, F., Venier, M., et al. Penetration of benzene, toluene and xylenes contained in gasolines through human abdominal skin in vitro. *Toxicology in Vitro*. 2006; 20(8):1321-1330.

²¹⁴ Blanck, I. H., McAuliffe, D. J. Penetration of Benzene Through Human Skin. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1985; 85(6):522-526.

²¹⁵ Frasch, H. F., Barbero, A. M. *In vitro* human skin permeation of benzene in gasolina: effects of concentration, multiple dosing and skin preparation. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*. 2018; 28:193-201.

²¹⁶ Zorin, S., Kuylenstierna, F., Thulin, H. *In Vitro* Test of Nicotine's Permeability through Human Skin. *Risk Evaluation and Safety Aspects. The Annals of Occupational Hygiene*. 1999; 43(6):405-413.

²¹⁷ Haq, A., Goodyear, B., Ameen, D., et al. Strat-M[®] synthetic membrane: Permeability comparison to human cadáver skin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018; 547:432-437.

²¹⁸ Schenk, L., Rauma, M., Fransson, M. N., et al. Percutaneous absorption of thirty-eight organic solvents *in vitro* using pig skin. *PLoS ONE*. 2018; 13(10):1-16.

²¹⁹ McDougal, J. N., Pollard, D. L., Weisman, W., et al. Assessment of Skin Absorption and Penetration of JP-8 Jet Fuel and Its Components. *Toxicological Sciences*. 2000; 55:247-255.

²²⁰ Nan, L., Liu, C., Li, Q., et al. Investigation of the enhancement effect of the natural transdermal permeation enhancers from *Ledum palustre* L. var. *Angustum* N. Busch: Mechanistic insight base don interaction among drug, enhancers and skin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018; 124:105-113.

²²¹ Frasch, H. F., Barbero, A. M., Alachkar, H., et al. Skin Penetration And Lag Times Of Neat And Aqueous Diethyl Phthalate, 1,2-Dichloroethane And Naphtalene. *Cutaneous and Ocular Toxicology*. 2007; 26(2):147-160.

²²² Uchida, T., Kadhum, W. R., Kanai, S., et al. Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane, Strat-MTM. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015; 67:113-118.

Tabla 2. Parámetros de permeabilidad de HAPs y condiciones experimentales de estudios *in vitro*.

Compuesto	Solución donadora	Membrana	J ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$)	t_{lag} (min)	Referencia
Benceno	Gasolina (0.4-1.1 %)	Piel humana	1-2	45-92	223
	Puro		1835		
	Vapor		905		
	Agua (0.2 %)	Piel humana	190	-	224
	Disolventes orgánicos (5 %)		43-165		
	Gasolina (5 %)		61		
	Gasolina (0.8-10 %)	Piel humana	9-106	7-14	225
Puro	566		35		
Tolueno	Gasolina (6-11 %)	Piel humana	2-6	76-119	223
	Puro	Piel de cerdo	380	27	226
	Combustible (0.06 %)	Piel de rata	0.5	30	227
Etilbenceno	Puro	Piel de cerdo	124	148	226
	Combustible (0.15 %)	Piel de rata	0.4	30	227
m-xileno	Puro	Piel de cerdo	63	69	226
Xilenos	Gasolina (9-14 %)	Piel humana	0.5-1.0	136-154	223
	Combustible (0.6 %)	Piel de rata	0.8	30	227

²²³ Adami, G., Larese, F., Venier, M., et al. Penetration of benzene, toluene and xylenes contained in gasolines through human abdominal skin *in vitro*. *Toxicology in Vitro*. 2006; 20(8):1321-1330.

²²⁴ Blanck, I. H., McAuliffe, D. J. Penetration of Benzene Through Human Skin. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1985; 85(6):522-526.

²²⁵ Frasch, H. F. Barbero, A. M. *In vitro* human skin permeation of benzene in gasolina: effects of concentration, multiple dosing and skin preparation. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*. 2018; 28:193-201.

²²⁶ Schenk, L., Rauma, M., Fransson, M. N., et al. Percutaneous absorption of thirty-eight organic solvents *in vitro* using pig skin. *PLoS ONE*. 2018; 13(10):1-16.

²²⁷ McDougal, J. N., Pollard, D. L., Weisman, W., et al. Assessment of Skin Absorption and Penetration of JP-8 Jet Fuel and Its Components. *Toxicological Sciences*. 2000; 55:247-255.

*Continuación de la Tabla 2.

Compuesto	Solución donadora	Membrana	J ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$)	t_{lag} (min)	Referencia
Nicotina	Pura	Piel humana	82	5-20	228
	Agua (1-50 %)		88-1341	5-18	
	Etanol (8-20 %)		6-12	5-15	
	Formulaciones en propilenglicol (1 %)	Piel humana	6-21	-	229
		Strat-M®	157-338		
p-cimeno	Pura	Piel humana	175	116	230
	Formulaciones (25 %)		4-130	97-498	
p-cimeno	Disolvente orgánico (10 %)	Piel de rata	29020	233	231
Ftalato de dietilo	Puro	Piel de cobaya	12-24	25-38	232
	Agua saturada		23	77	
1,2-Dicloetano	Puro	Piel de cobaya	3842-6280	2-7	232
	Agua saturada		1076	7	
Naftaleno	Puro	Piel de cobaya	8- 30	49-121	232
	Agua saturada		13.61	58	
	Combustible (0.26 %)	Piel de rata	1.04	30	233

Los parámetros de permeabilidad obtenidos para cada uno de estos compuestos varían significativamente entre los distintos estudios. Esto se debe a las distintas condiciones en las que se desarrollan cada uno de ellos, principalmente a la naturaleza de la membrana (humana, animal o sintética), así como a la naturaleza de la disolución donadora (disolvente puro, solución orgánica, formulaciones, etc.).

²²⁸ Zorin, S. Kuylenstierna, F., Thulin, H. *In Vitro* Test of Nicotine's Permeability through Human Skin. Risk Evaluation and Safety Aspects. The Annals of Occupational Hygiene. 1999; 43(6):405-413.

²²⁹ Haq, A., Goodyear, B., Ameen, D., et al. Strat-M® synthetic membrane: Permeability comparison to human cadáver skin. International Journal of Pharmaceutics. 2018; 547:432-437.

²³⁰ Frasch, H. F., Barbero, A. M. *In vitro* human epidermal permeation of nicotine from electronic cigarette refill liquids and implication for dermal exposure assessment. Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology. 2016; 27(6):618-624.

²³¹ Nan, L., Liu, C., Li, Q., et al. Investigation of the enhancement effect of the natural transdermal permeation enhancers from *Ledum palustre* L. var. *Angustum* N. Busch: Mechanistic insight base don interaction among drug, enhancers and skin. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2018; 124:105-113.

²³² Frasch, H. F., Barbero, A. M., Alachkar, H., et al. Skin Penetration And Lag Times Of Neat And Aqueous Diethyl Phthalate, 1,2-Dichloroethane And Naphtalene. Cutaneous and Ocular Toxicology. 2007; 26(2):147-160.

²³³ McDougal, J. N., Pollard, D. L., Weisman, W., et al. Assessment of Skin Absorption and Penetration of JP-8 Jet Fuel and Its Components. Toxicological Sciences. 2000; 55:247-255.

5. Cosméticos antipolución

Como se ha mencionado anteriormente, la piel está constantemente expuesta a factores externos, lo que tiene un gran impacto sobre ésta y en definitiva sobre la salud. Por este motivo, en los últimos años, la concienciación y preocupación de la sociedad con respecto a los niveles de polución del aire y su efecto sobre la salud se ha incrementado de forma notable.²³⁴ Un resultado directo de dicha preocupación es la aparición en el mercado de productos cosméticos antipolución, destinados a combatir el efecto de la polución ambiental. Sin embargo, el desarrollo de productos cosméticos antipolución que sean realmente efectivos es un gran desafío.

El primer paso en el desarrollo de productos cosméticos antipolución de elevada eficacia es entender los diferentes factores ambientales implicados y los mecanismos mediante los que afectan a la piel y/o la salud. En general, se considera una estrategia adecuada en el desarrollo de productos antipolución la que implica reducir o eliminar el grado de penetración de los contaminantes, proteger frente a sus mecanismos de acción y restaurar los posibles daños causados en la piel (prevenir, proteger, restaurar)²³⁵. En este sentido, se puede sobreentender que el primer nivel de protección consiste en evitar o reducir al máximo el contacto y la absorción de los contaminantes atmosféricos con la piel, generando una barrera adicional mediante productos poliméricos (formadores de barrera). Por tanto, las formulaciones de estos cosméticos antipolución se centran principalmente en el uso de principios activos con las siguientes funciones:

- *Formadores de barrera o filmógenos*: tienen la capacidad de formar una película sobre la superficie de la piel previniendo así el contacto de la piel con los contaminantes atmosféricos. Suelen ser compuestos que producen un aumento de los factores de consistencia de los cosméticos y por tanto en la viscosidad de los mismos.²³⁶

²³⁴ European Environment Agency, 2017 <https://www.eea.europa.eu/themes/air/intro> Acceso noviembre 2020.

²³⁵ Mistry, N. Guidelines for Formulating Anti-Pollution Products. *Cosmetics*. 2017; 4 (57): 1-16.

²³⁶ Robles Velasco, M. V., Saucedo, R., de Oliveira, C. A., et al. Active ingredients, mechanisms of action and efficacy tests of antipollution cosmetic and personal care products. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018; 5:1-8.

- *Fotoprotectores*: absorben la radiación ultravioleta para proteger la piel frente a los efectos negativos provocados por dicha radiación (quemaduras, daños celulares, enfermedades dermatológicas, etc.).^{237, 238}
- *Antioxidantes*: reducen el estrés oxidativo y las ROS, restaurando la piel dañada.²³⁹

Lo ideal sería un cosmético que combine estos objetivos para así obtener una buena capacidad de defensa frente a contaminantes ambientales. Generalmente, la formulación de cosméticos antipolución no se centra en el uso de un único activo, sino que se emplean como ingredientes productos elaborados mediante mezclas de proporciones determinadas de estos activos con el fin de obtener un cosmético capaz de prevenir, proteger y/o reparar la piel.²⁴⁰ En la Tabla 3 se muestran algunos principios activos empleados en la formulación de cosméticos antipolución, clasificados según su función principal. Por ejemplo, algunos principios activos como los polisacáridos de elevado peso molecular entre los que se encuentran la goma xantana,²⁴¹ la goma de biosacárido-4, el chitosán,²⁴² etc., o polímeros formadores como la silicona, acrilatos,²⁴³ dimeticona, estearatos, etc.²⁴⁴ poseen la capacidad de generar en la piel una capa adicional, la cual actúa de barrera, dificultando así la absorción dérmica de contaminantes atmosféricos. Otros, como el dióxido de titanio, óxido de zinc,²⁴⁵ minerales del Mar-Muerto,²⁴⁶ extractos del Himalaya,²⁴⁷ etc. son principios activos con función fotoprotectora. Sin embargo,

²³⁷ Robles Velasco, M. V., Sauce, R., Areias de Oliveira, C., et al. Active ingredients, mechanisms of activation and efficacy tests of antipollution cosmetic and personal care products. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018; 54:1-8.

²³⁸ Krutmann, J., Liu, W., Li, L., et al. Pollution and skin: From epidemiological and mechanistic studies to clinical implications. *Journal of Dermatological Science*. 2014; 76:163-168.

²³⁹ Silva, S., Ferreira, M., Oliveira, A. S., et al. Evolution of the use of antioxidants in anti-ageing cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science*. 2019; 41:378-386.

²⁴⁰ Richard, F., Creusot, T., Catoire, S., et al. Mechanisms of pollutant-induced toxicity in skin and detoxification: Anti-pollution strategies and perspectives for cosmetic products. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 2019; 77(6):446-459.

²⁴¹ Singhvi, G., Hans, N., Shiva, N., et al. *Natural Polysaccharides in Drug Delivery and Biomedical Applications*, Elsevier; 2019.

²⁴² Kanlayavattanukul, M., Lourith, N. *Biopolysaccharides for Skin Hydrating Cosmetics*. Springer; 2015.

²⁴³ Garaud, J. L., Baillet, H., Dupraz, E., et al. Silicones as materials with potential to reduce pollution particle adhesion on skin. *IFSCC*. 2015

²⁴⁴ Mittal, K. L., Etzler, F. M. *Adhesion in Pharmaceutical Biomedical and Dental Fields*. Scrivener Publishing. 2017.

²⁴⁵ Garnacho Saucedo, G. M., Salido Vallejo, R., Moreno Giménez, J. C. Effects of solar radiation and an update on photoprotection. *Anales de pediatría*. 2020; 92(6):377.e1-377.e9.

²⁴⁶ Portugal-Cohen, M., Soroka, Y., Ma'or, Z., et al. Protective effects of a cream containing Dead Sea minerals against IVB-induced stress in human skin. 2009; 18(9):781-788.

²⁴⁷ Wineman, E., Portugal-Cohen, M., Soroka, Y., et al. Photo-damage protective effect of two facial products, containing a unique complex of Dead Sea minerals and Himalayan actives. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2012; 11:183-192.

otros principios activos como el extracto de chía,²⁴⁸ el extracto de té blanco,²⁴⁹ y las cumarinas²⁵⁰ tienen la capacidad de restaurar la piel gracias a sus propiedades antioxidantes.

También hay que destacar que el estado de la piel es determinante en el modo en que los contaminantes afectan a la misma. Es decir, una piel sana se verá menos afectada que una piel dañada, por lo que también resulta esencial mantener la piel sana, hidratada, firme, etc.²⁵¹

²⁴⁸ Qu, D., Saito, L. L. Chia Seed Extract and Related Method of Manufacture. United States; US8846117 B2. 2014.

²⁴⁹ de Lima Cherubim, D. J., Buzanello Marins, C. V., Oliveira Fariña, L. et al. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2019; 19(1):15.

²⁵⁰ Worachartcheewan, A., Prachayasittikul, V., Prachayasittikul, S., et al. Rational design of novel coumarins: a potential trend for antioxidants in cosmetics. *EXCLI Journal*. 2020; 19:209-226.

²⁵¹ Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. NTP 697: Exposición a contaminantes químicos por vía dérmica. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, Gobierno de España. 2018

Tabla 3. Principios activos empleados en formulaciones de cosméticos antipolución.

Función	Principio activo	Composición	Referencia
Formador de barrera (filmógeno)	Goma de biosacárido-4 y 1,2-hexanodiol	Polisacárido de elevado peso molecular	252
	Aceite de chía	Aceite vegetal	253
	Goma de biosacárido-4	Polisacárido aniónico de elevado peso molecular	254
	Chitosán	Polisacárido de elevado peso molecular	254
	Goma xantana	Polisacárido aniónico	255
	Talco	Mineral	256
	Silicona	Polímero	257
	Acrilatos	Polímero	257
	Dimeticona	Polímero	258
	Estearatos	Polímero	258
Fotoprotector	Dióxido de titanio	Compuesto inorgánico	259
	Óxido de zinc	Compuesto inorgánico	259
	Minerales del Mar Muerto-agua enriquecida	Mineral	252, 260, 261
	Extractos del Himalaya	Extracto	261
Antioxidante	Extracto de chía	Extracto	253
	Extracto de té blanco	Extracto	262
	Cumarinas	Compuesto orgánico	263

²⁵² Portugal-Cohen, M., Oron, M., Cohen, D., et al. Antipollution skin protection – a new paradigm and its demonstration on two active compounds. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. 2017; 10:185-193.

²⁵³ Qu, D., Saito, L. L. Chia Seed Extract and Related Method of Manufacture. United States; US8846117 B2. 2014.

²⁵⁴ Kanlayavattanakul, M., Lourith, N. Biopolysaccharides for Skin Hydrating Cosmetics. Springer; 2015.

²⁵⁵ Singhvi, G., Hans, N., Shiva, N., et al. *Natural Polysaccharides in Drug Delivery and Biomedical Applications*, Elsevier; 2019.

²⁵⁶ Hashizume, H. Adsorption of aromatic compounds in water by talc. *ClayScience*. 2009; 14:61-64

²⁵⁷ Garaud, J. L., Baillet, H., Dupraz, E., et al. Silicones as materials with potential to reduce pollution particle adhesion on skin. *IFSCC*. 2015

²⁵⁸ Mittal, K. L., Etzler, F. M. *Adhesion in Pharmaceutical Biomedical and Dental Fields*. Scrivener Publishing. 2017.

²⁵⁹ Garnacho Saucedo, G. M., Salido Vallejo, R., Moreno Giménez, J. C. Effects of solar radiation and an update on photoprotection. *Anales de pediatría*. 2020; 92(6):377.e1-377.e9.

²⁶⁰ Portugal-Cohen, M., Soroka, Y., Ma'or, Z., et al. Protective effects of a cream containing Dead Sea minerals against IVB-induced stress in human skin. 2009; 18(9):781-788.

²⁶¹ Wineman, E., Portugal-Cohen, M., Soroka, Y., et al. Photo-damage protective effect of two facial products, containing a unique complex of Dead Sea minerals and Himalayan actives. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2012; 11:183-192.

²⁶² de Lima Cherubim, D. J., Buzanello Marins, C. V., Oliveira Fariña, L. et al. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2019; 19(1):15.

²⁶³ Worachartcheewan, A., Prachayasittikul, V., Prachayasittikul, S., et al. Rational design of novel coumarins: a potential trend for antioxidants in cosmetics. *EXCLI Journal*. 2020; 19:209-226.

5.1. Evaluación de la efectividad de cosméticos antipolución

Para el desarrollo adecuado de cosméticos antipolución, es necesario el desarrollo de ensayos apropiados que permitan la evaluación de su efectividad. Es fundamental que el diseño de estos estudios sea fiable y reproducible, además deben realizarse en condiciones similares a las reales. No existe un protocolo estándar disponible para la evaluación de la efectividad antipolución de un principio activo.²⁶⁴ Por ello, para determinar si el cosmético posee efectividad antipolución es necesario conocer la naturaleza de los contaminantes, cómo actúan sobre la piel y cómo medir su efecto, de manera que se puedan determinar estos cambios para así evaluar si resultan o no significativos. Gracias a esta información, es posible el desarrollo de estudios de eficacia *in vivo* o *in vitro* de cosméticos antipolución.²⁶⁵ En la Tabla 4 aparecen recogidas algunas de las metodologías empleadas para evaluar la integridad de la piel antes y después de su exposición a contaminantes atmosféricos.

Los estudios *in vivo* se llevan a cabo directamente sobre la piel de personas voluntarias, desarrollándose en condiciones reales y obteniendo resultados fiables. Permiten imitar condiciones reales, sin embargo, la interpretación de los resultados puede resultar más complicada que en estudios *in vitro*, debido al número limitado de voluntarios, así como la gran variabilidad que existe entre ellos. Para estos estudios es necesario que la piel quede expuesta a los contaminantes, lo cual podría suponer un problema ético. En ocasiones, los voluntarios se seleccionan en función de su estilo de vida, por ejemplo, personas que se encuentran durante un tiempo considerable expuestas a elevadas concentraciones de contaminantes, como pueden ser fumadores, operarios de industrias que puedan exponerse a un foco de contaminantes, etc. Sin embargo, en otros casos es necesario aplicar contaminantes de manera intencionada.²⁶⁶

²⁶⁴ Richard, F., Creusot, T., Catoire, S., et al. Mechanisms of pollutant-induced toxicity in skin and detoxification: Anti-pollution strategies and perspectives for cosmetic products. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 2019; 77(6):446-459.

²⁶⁵ Robles Velasco, M. V., Sauce, R., Areias de Oliveira, C., et al. Active ingredients, mechanisms of activation and efficacy tests of antipollution cosmetic and personal care products. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018; 54:1-8.

²⁶⁶ Rembiesa, J., Ruxgas, T., Engblom, J., et al. The Impact of Pollution on Skin and Proper Efficacy Testing for Anti-Pollution Claims. *Cosmetics*. 2018; 5(1):1-9.

Tabla 4. Técnicas para la evaluación de la integridad de la piel antes y después de su exposición a contaminantes atmosféricos.

Agentes externos	Método	Evaluación de la integridad de la piel	Referencia
Irritantes (material particulado, tensioactivos)	<i>in vivo</i>	Fotografía	267
Humo de tabaco	<i>in vivo</i>	Análisis de marcadores	268
Ozono, radiación UV, humo de cigarrillo	<i>in vivo e in vitro</i>	Análisis de marcadores	269
Material particulado, PAH, radiación UV	<i>in vitro</i>	Evaluación de la estructura de la piel	270
Ozono	<i>in vitro</i>	Evaluación de la estructura de la piel	271
PAH	<i>in vitro</i>	Evaluación de la estructura de la piel	272
Radiación UV	<i>in vitro</i>	Análisis de marcadores y evaluación de la estructura de la piel	273
Material particulado y metales pesados	<i>in vitro</i>	Análisis de marcadores y evaluación de la estructura de la piel	274
Radiación UV	<i>in vitro</i>	Análisis de marcadores Profundidad de las arrugas Hidratación de la piel	275
Material particulado	<i>in vitro</i>	Evaluación de las proteínas de la piel	276

²⁶⁷ Schlay, S., Slotta, U. Efficient Skin Protection Against Negative Environmental Influences by Breathable, Vegan Silk Polypeptides. *Sofw Journal*. 2016; 142:14-19.

²⁶⁸ Bielfeldt, S., Boehling, A., Springmann, G., et al. Pollution Protection and the Skin-Testing Strategies. *Household and Personal Care Today*. 2016; 11(5):18-21.

²⁶⁹ Pham, D. M., Boussoira, B., Moyal, D., et al. Oxidization of squalene, a human skin lipid: a new and reliable marker of environmental pollution studies. *International Journal of Cosmetic Science*. 2015; 37:357-365.

²⁷⁰ Soeur, J., Belaïdi, J.P., Chollet, C., et al. Photo-pollution stress in skin: Traces of pollutants (PAH and particulate matter) impair redox homeostasis in keratinocytes exposed to UVA1. *Journal of Dermatological Science*. 2017; 86:162-169.

²⁷¹ Cotovio, J., Onno, L., Justine, P., et al. Generation of oxidative stress in human cutaneous models following in vitro ozone exposure. *Toxicology In Vitro*. 2001; 15:357-362.

²⁷² Qiao, Y., Li, Q., Du, H.Y., et al. Airborne polycyclic aromatic hydrocarbons trigger human skin cells aging through aryl hydrocarbon receptor. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 2017; 488:445-452.

²⁷³ Portugal-Cohen, M., Soroka, Y., Ma'or, Z., et al. Protective effects of a cream containing Dead Sea minerals against UVB-induced stress in human skin. *Experimental Dermatology*. 2009; 18:781-788.

²⁷⁴ Portugal-Cohen, M., Oron, M., Cohen, D., et al. Antipollution skin protection-a new paradigm and its demonstration on two active compounds. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. 2017; 10:185-193.

²⁷⁵ Wineman, E., Portugal-Cohen, M., Soroka, Y., et al. Photo-damage protective effect of two facial products, containing a unique complex of Dead Sea minerals and Himalayan actives. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2012; 11:183-192.

²⁷⁶ Li, Q., Kang, Z., Jiang, S., et al. Effects of Ambient Fine Particles PM_{2.5} on Human HaCaT Cells. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2017; 14(1):1-10.

Una de las técnicas *in vivo* empleadas para la evaluación de la efectividad antipolución de cosméticos consiste en el análisis de fotografías de la piel antes y después de la aplicación del cosmético y la exposición dérmica a los contaminantes como material particulado, tensioactivos y otros compuestos capaces de generar una respuesta inflamatoria de la piel.²⁷⁷ Otras técnicas se centran en el análisis de marcadores, como son el monohidroperóxido de escualeno y el malondialdehído, para medir el estrés oxidativo de la piel, ya que ambas sustancias aumentan durante la oxidación de los lípidos cutáneos como consecuencia de la exposición de contaminantes atmosféricos, entre ellos los HAPs procedentes del humo del tabaco, el ozono y la radiación UV.^{278, 279}

Los diferentes estudios *in vitro* para evaluar la integridad de la piel se centran en evaluar el efecto de los contaminantes ambientales, como la radiación UV, material particulado, ozono, PAHs, y otros HAPs, sobre la estructura de la piel empleando queratinocitos epidérmicos humanos, modelos de piel reconstituida^{280, 281}, y fibroblastos humanos;²⁸² así como en el análisis de marcadores específicos. Este tipo de estudios pueden emplearse para determinar la efectividad de productos cosméticos antipolución mediante comparación de la integridad de la piel en muestras con cosmético y controles sin el mismo. Algunos de los marcadores evaluados más relevantes son los marcadores de inflamación como las interleucinas, prostaglandinas, o factores transformadores del crecimiento, los cuales son analizados mediante ensayos ELISA.^{283, 284} Para evaluar la integridad de la piel se emplean ensayos como la determinación caspasa 3, ya que se trata de una encima indicadora de apoptosis celular, o el ensayo de actividad mitocondrial

²⁷⁷ Schlay, S., Slotta, U. Efficient Skin Protection Against Negative Environmental Influences by Breathable, Vegan Silk Polypeptides. *Sofw Journal*. 2016; 142:14-19.

²⁷⁸ Bielfeldt, S., Boehling, A., Springmann, G., et al. Pollution Protection and the Skin-Testing Strategies. *Household and Personal Care Today*. 2016; 11(5):18-21.

²⁷⁹ Pham, D. M., Bousouira, B., Moyal, D., et al. Oxidization of squalene, a human skin lipid: a new and reliable marker of environmental pollution studies. *International Journal of Cosmetic Science*. 2015; 37:357-365.

²⁸⁰ Soeur, J., Belaïdi, J.P., Chollet, C., et al. Photo-pollution stress in skin: Traces of pollutants (PAH and particulate matter) impair redox homeostasis in keratinocytes exposed to UVA1. *Journal of Dermatological Science*. 2017; 86:162-169.

²⁸¹ Cotovio, J., Onno, L., Justine, P., et al. Generation of oxidative stress in human cutaneous models following in vitro ozone exposure. *Toxicology In Vitro*. 2001; 15:357-362.

²⁸² Qiao, Y., Li, Q., Du, H.Y., et al. Airborne polycyclic aromatic hydrocarbons trigger human skin cells aging through aryl hydrocarbon receptor. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 2017; 488:445-452.

²⁸³ Portugal-Cohen, M., Soroka, Y., Ma'or, Z., et al. Protective effects of a cream containing Dead Sea minerals against UVB-induced stress in human skin. *Experimental Dermatology*. 2009; 18:781-788.

²⁸⁴ Portugal-Cohen, M., Oron, M., Cohen, D., et al. Antipollution skin protection-a new paradigm and its demonstration on two active compounds. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. 2017; 10:185-193.

MTT.²⁸⁵ Otras técnicas se centran en la evaluación de las proteínas que conforman la piel antes y después del periodo de exposición a material particulado en condiciones controladas;²⁸⁶ o en la determinación de la pérdida de agua, así como de la conductividad de la piel.²⁸⁷

En resumen, teniendo en cuenta toda esta información, los ensayos *in vitro* resultan la opción más adecuada para evaluar la efectividad de cosméticos antipolución, no solo por motivos éticos, sino también por los resultados que proporcionan, ya que permiten el control de condiciones específicas. Sin embargo, no existe un protocolo estándar disponible para dicho fin,²⁸⁸ por lo que el desarrollo de nuevas metodologías *in vitro* que permitan determinar la efectividad de cosméticos antipolución es actualmente un objetivo de investigación para la ciencia.

²⁸⁵ Wineman, E., Portugal-Cohen, M., Soroka, Y., et al. Photo-damage protective effect of two facial products, containing a unique complex of Dead Sea minerals and Himalayan actives. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2012; 11:183-192.

²⁸⁶ Li, Q., Kang, Z., Jiang, S., et al. Effects of Ambient Fine Particles PM_{2.5} on Human HaCaT Cells. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2017; 14(1):1-10.

²⁸⁷ Zhang, Q., Murawsky, M., LaCount, T., et al. Transepidermal water loss and skin conductance as barrier integrity tests. *Toxicology in Vitro*. 2018; 51:129-135.

²⁸⁸ Richard, F., Creusot, T., Catoire, S., et al. Mechanisms of pollutant-induced toxicity in skin and detoxification: Anti-pollution strategies and perspectives for cosmetic products. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 2019; 77(6):446-459.

Capítulo 2: Objetivos

La contaminación ambiental es un problema global de gran importancia en la actualidad. En concreto, la contaminación urbana es uno de los principales peligros para la salud humana, y en especial para la salud de la piel. Por este motivo, se está produciendo un incremento notable de la concienciación y la preocupación con respecto a los niveles de contaminación del aire y su efecto sobre la salud. La aparición de cosméticos antipolución es el resultado de dicha preocupación. Sin embargo, el desarrollo de metodologías analíticas adecuadas para la evaluación de su efectividad es un gran desafío.

Por ello, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral se centrará en el desarrollo de métodos analíticos adecuados para evaluar la efectividad de cosméticos antipolución frente a dos grupos principales de HAPs: los VOCs y los compuestos presentes en el humo de tabaco.

Este objetivo principal se puede desglosar en los siguientes objetivos específicos:

- Diseño, desarrollo y puesta a punto de una cámara de migración, que permite la generación de atmósferas controladas en su interior, tanto en condiciones de dosis infinitas como en condiciones de dosis finitas y semi-infinitas.
- Diseño y desarrollo de una celda vertical de Franz modificada para el estudio de la migración de compuestos orgánicos.
- Evaluación de diferentes membranas sintéticas como simulantes de piel humana.
- Puesta a punto de métodos analíticos para el análisis de compuestos de interés
- Evaluación de la efectividad de los cosméticos antipolución por comparación de estudios de migración en presencia o ausencia de producto cosmético.
- Desarrollo de una máquina para fumar cigarrillos en el interior de la cámara de simulación.

Capítulo 3: Materiales y métodos

1. Reactivos y materiales

Los reactivos benceno, tolueno, etilbenceno, o-xileno, m-xileno, p-xileno, clorobenceno, nitrobenceno, 1,2-dicloroetano, bromodiclorometano, 1,2-dibromoetano, bromoformo, naftaleno, estireno, p-cimeno, limoneno, acenaftileno, 1-metilfenantreno, 2-metilantraceno y nicotina se han adquirido de Scharlau (Barcelona, España) y Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos). Como patrón interno se empleó tolueno-d₈ y nicotina-d₄ de Sigma-Aldrich. Los patrones y las disoluciones empleadas se prepararon en acetona (con grado de análisis de GC) de Scharlau. Las sales de la disolución de tampón fosfato salino son de Scharlau. El metanol, el acetato de amonio y el tampón fosfato salino, empleados en la preparación de fases móviles y patrones para el análisis mediante LC, son de Scharlau.

Las membranas PDMS con espesores comprendidos entre 0.5 y 3 mm han sido suministrados por TOVSI (Valencia, España), y las membranas Strat-M[®] son del proveedor Millipore (Termecula, MA, Estados Unidos).

Los cigarrillos, de marca estadounidense, se han obtenido en estancos.

2. Cámara de simulación

La evaluación de la exposición dérmica a posibles contaminantes perjudiciales del aire, se ha desarrollado en una cámara de simulación que permite generar atmósferas controladas en su interior. Se trata de una campana cerrada de laboratorio, modelo HZ08252 de Bruker (Billerica, MA, Estados Unidos), ubicada en un laboratorio de 50 m³ con una temperatura controlada de 24 ± 2 °C. Está formada por una base metálica y paredes y techo de polimetilmetacrilato, con un volumen interno de 640 L aproximadamente (Figura 15). En el interior de la cámara se introdujo un flujo de aire limpio y seco, obtenido de un compresor con filtros de humedad y carbón activo. El flujo de aire se ha regulado con una llave de paso, un manorreductor y un rotámetro de bola MPB1200 de MPB Industries (Kent, Reino Unido) calibrado mediante un flujómetro de burbuja de volumen elevado (800 mL). En su interior posee dos ventiladores de 120 mm de diámetro de aspa y unas dimensiones de 140x120x75 mm. Cuenta con un orificio de 105 mm de diámetro,

conectado mediante una serie de tubos de aluminio de 100 mm de diámetro a un sistema de extracción con filtros.

Para la introducción de contaminantes en el interior de la cámara en condiciones de dosis infinita, se dispone de una bomba isocrática de un instrumento de cromatografía líquida (LC) HP 1050 de Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, Estados Unidos), situada en el exterior de la misma, conectada directamente al conducto de aire limpio y seco mediante un conector en T de vidrio transparente (Figura 16). De esta manera, el flujo de aire, perpendicular y mucho mayor al flujo de contaminantes introducidos, evapora completamente la disolución de contaminantes introduciéndolos hacia el interior de la cámara de simulación en estado gaseoso.

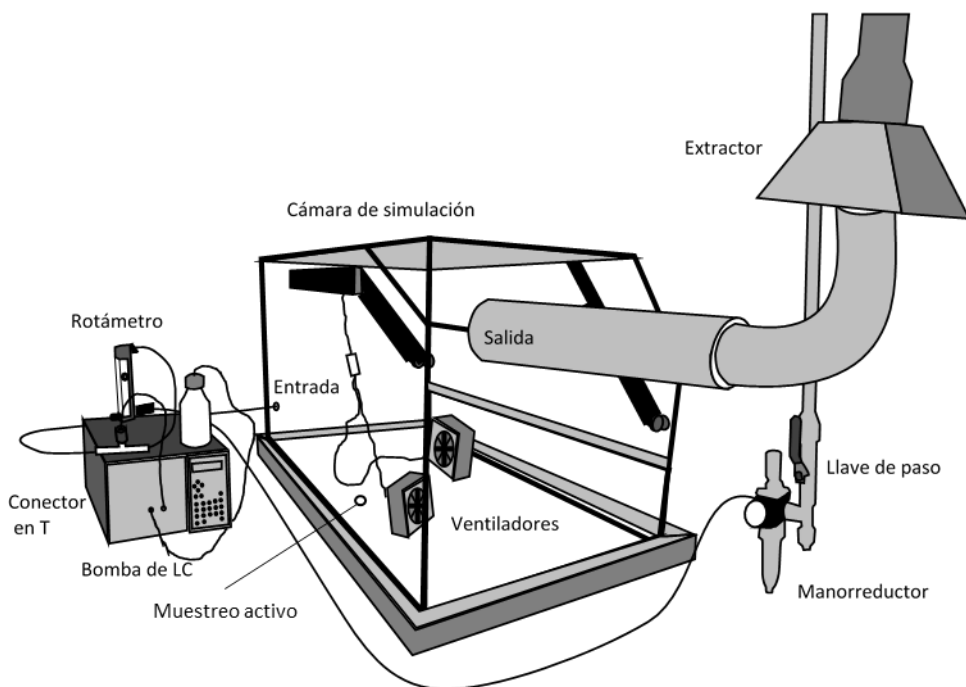


Figura 15. Esquema de la cámara de simulación empleada para la generación de una atmósfera controlada.



Figura 16. Conexión en T de cristal transparente.

Para la introducción de los contaminantes orgánicos en condiciones de dosis finita, la cámara dispone de una máquina de fumar que consta de una mini bomba de vacío de diafragma, modelo Laboport, de VWR International (Radnor, PA, Estados Unidos), con un caudal de 5.5 L min^{-1} . La bomba de vacío se encuentra conectada a tres cigarrillos mediante tubos de silicona de 10 mm de diámetro interno y accesorios de manguera de 3 vías, así como una trampa de vacío (Figura 17).

Además, se han introducido una serie de dispositivos de monitoreo de aire en el interior de la cámara, que incluyen un anemómetro multifunción de flujo de aire TA465-P de TSI (Shoreview, MN, Estados Unidos), equipado con tecnología de espectroscopía infrarroja, para medir la concentración de CO_2 , y CO , así como la temperatura y la humedad relativa, un detector de partículas modelo CEL-712 Microdust Pro de Casella Cel (Kempston, Reino Unido) con un sensor fotoeléctrico para determinar la concentración de PM suspendido en el aire. Se empleó un contador de partículas modelo Airy Technology P311 (Stoughton, MA, USA), para determinar la cantidad de PM en función del tamaño de partícula, y un detector de VOCs modelo PhoCheck Tiger de Ion Science (Laubach, Alemania). Todos los dispositivos fueron previamente calibrados y empleados tras su estabilización.

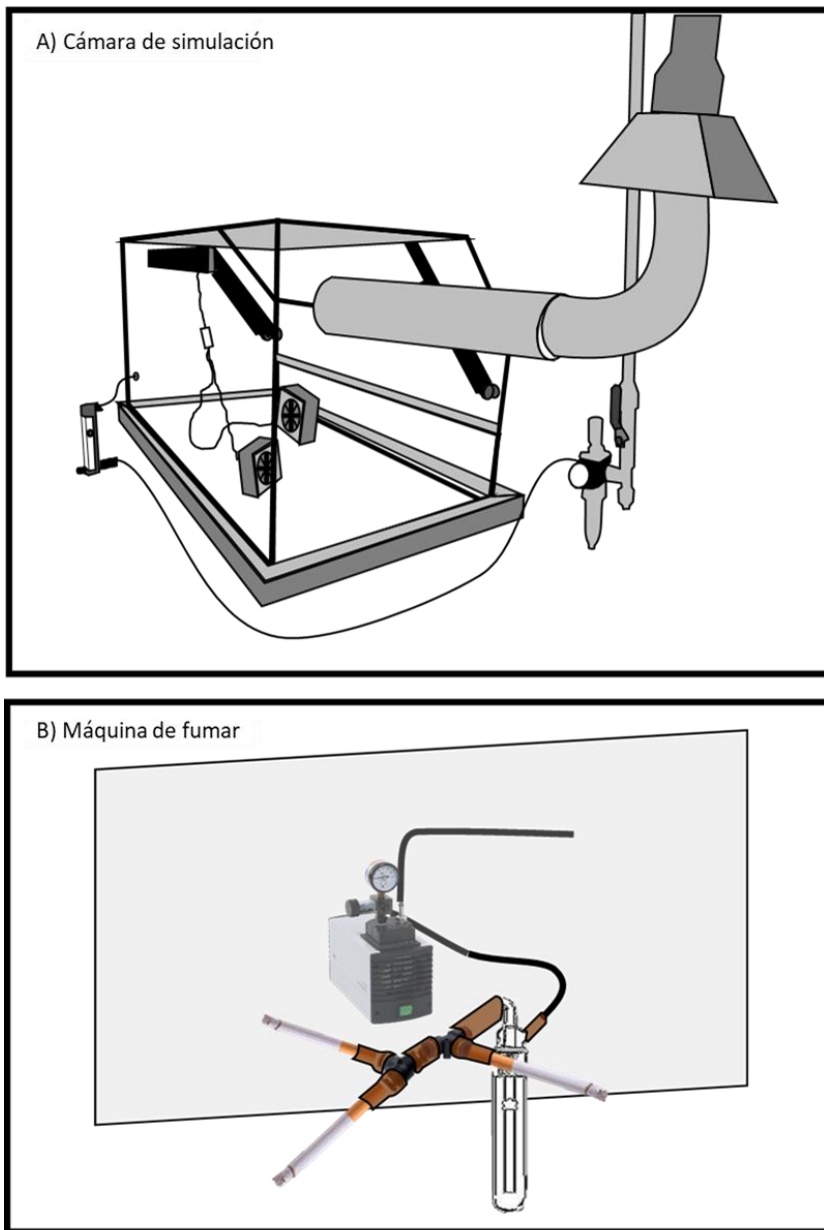


Figura 17. Esquema (A) de la cámara de simulación desarrollada y máquina de fumar (B) empleada para el desarrollo de estudios de absorción dérmica de compuestos orgánicos perjudiciales procedentes del humo de tabaco.

3. Estudios de absorción dérmica en la cámara de simulación

Los estudios de absorción dérmica *in vitro*, generalmente se llevan a cabo empleando dispositivos de migración similares a las celdas de difusión vertical, según el método de Franz.²⁸⁹ Las celdas de difusión de Franz así como las celdas de Franz modificadas son probablemente las configuraciones más utilizadas para estudios de absorción dérmica. Así pues, se han empleado celdas de Franz modificadas con membranas de PDMS y Strat-M® de 14 mm de diámetro y 0.7 cm² de superficie expuesta, y PBS a pH 7.4 como disolución receptora (Figura 18).

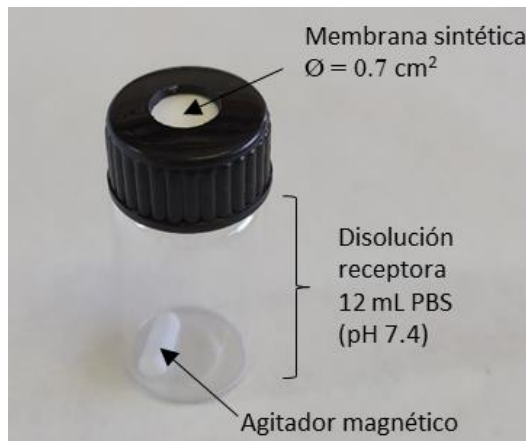


Figura 18. Esquema de la celda de Franz modificada empleada en este estudio.

El compartimento donador se corresponde con la atmósfera simulada en el interior de la cámara, y el compartimento receptor está formado por 12 mL de PBS a pH 7.4, que se mantienen a una temperatura de 24 °C mediante el control de la temperatura del exterior. El área de difusión de la membrana simulante de piel es de 0.7 cm². Así, los dispositivos de migración se introducen en el interior de la cámara durante distintos tiempos de exposición. La disolución receptora se homogeniza gracias al uso de agitadores magnéticos recubiertos de Teflón. Una vez transcurrido el tiempo de exposición, los dispositivos de migración se retiran del

²⁸⁹ Franz, T. J. Percutaneous absorption: on the relevance of *in vitro* data. *Journal of Investigative Dermatology*. 1975; 64(3):190-195.

interior de la cámara, se cierran herméticamente y se almacenan a 4 °C para evitar la evaporación de los contaminantes evaluados, hasta su posterior análisis.

La determinación cuantitativa de los contaminantes que difunden a través de los simulantes de piel se realiza mediante GC-MS por inyección directa, HS-GC-MS y LC-MS (ver siguientes apartados para condiciones específicas), en función de las características físico-químicas de los analitos, tras diferentes tiempos de exposición, entre 0.5 y 24 h, obteniendo así los perfiles de absorción correspondientes a cada analito.

4. Evaluación de la efectividad de cosméticos antipolución frente a compuestos orgánicos perjudiciales

Una vez obtenidos los perfiles de absorción de los compuestos orgánicos evaluados, se procedió a la evaluación de la efectividad de cosméticos anti-polución. Para ello, se aplicó de forma homogénea 2 mg de producto por cm² de membrana expuesta, quedando esta cara de la membrana en contacto con la atmósfera contaminada. Además, se han realizado experimentos de control empleando membranas Strat-M® en las mismas condiciones, sin aplicación de cosmético en la membrana. Asimismo, en el exterior de la cámara también se colocaron dispositivos de migración, con y sin cosmético, empleados como blancos, para confirmar la ausencia de posibles contaminaciones. Finalmente, mediante comparación de los resultados obtenidos para controles y muestras de cosméticos, se ha determinado la efectividad anti-polución de los mismos.

5. Materias primas y cosméticos evaluados

Se ha evaluado la efectividad antipolución de materias primas de cosméticos de distintos tipos: extractos vegetales, péptidos, polisacáridos, aceites, filtros solares, activos naturales y activos sintéticos. Además, se ha evaluado la efectividad antipolución de distintos cosméticos: crema hidratante antiarrugas, mascarilla, serum, crema con SPF medio, cremigel antiedad, crema facial, agua mist, crema SPF medio con activo antipolución. Todas estas materias primas, así como los productos

cosméticos fueron proporcionados por los laboratorios de origen farmacéutico de RNB S.L. (Valencia, España).

El cosmético antipolución A es una crema para el cuidado diario de la piel (emulsión viscosa) que protege de la radiación solar y la luz azul, previniendo el fotoenvejecimiento. Este cosmético reafirma, suaviza y reduce las arrugas gracias al extracto de planta de paracress. Está indicado para pieles sensibles por la presencia de principios activos como el extracto de regaliz y moléculas bioactivas de células madre del algodón.

El cosmético antipolución B es también una crema de textura rica (emulsión viscosa) que suaviza y protege la piel de agentes externos como la contaminación, la radiación solar (infrarrojo, UV y luz azul) y agentes antioxidantes, aumentando la firmeza y elasticidad de la piel a la vez que hidrata intensamente. Estas propiedades para tratar y prevenir efectos ambientales adversos son proporcionadas por su combinación de principios activos que incluyen vitamina C, péptidos (carnosina y oligopéptido-1), alantoína, pantenol y moléculas bioactivas de células madre del algodón.

El cosmético antipolución C es una crema remodeladora del óvalo facial (emulsión viscosa) que suaviza y protege la piel frente a agentes externos, aumentando la firmeza y elasticidad de la piel. Estas propiedades para tratar y prevenir los efectos ambientales adversos son proporcionadas por su combinación de principios activos que incluyen acetato de tocoferilo, colágeno hidrolizado, ácido cítrico y moléculas bioactivas de células madre de algodón y *Lycium Barbarum* y extractos de plantas y algas que incluyen la fruta *Caesalpinia Spinosa* y *Kappaphycus Alvarezii*.

6. Determinación de las propiedades físicoquímicas de los cosméticos evaluados

Las propiedades físicoquímicas como la viscosidad, densidad, pH, conductividad e índice de refracción de los cosméticos estudiados se determinaron de la siguiente manera. La viscosidad se obtuvo empleando un viscosímetro rotacional DV-III Ultra de AMETEK Brookfiel (Middleboro, MA). La medición se llevó a cabo durante 3 segundos, con una velocidad de rotación de 50 rpm. La densidad se determinó con un densímetro electrónico MDS-300 de Alfa Mirage (Tokio, Japón). Se llenó una

jeringa de 3 mL con muestra y se llenó la cubeta hasta que fluyó por la otra salida (2 mL de muestra, aproximadamente). El pH se obtuvo empleando un medidor de pH PHS-3B de TBT (Nanjing, China). Los valores de conductividad eléctrica se midieron con un medidor de CE GLP-31 de Crison (Barcelona, España). El índice de refracción se midió con un refractómetro RE40D de Mettler Toledo (Barcelona, España). Todos estos parámetros se obtuvieron a una temperatura de muestra de 25 °C, y son el resultado del promedio de tres medidas independientes.

7. Determinación de compuestos orgánicos perjudiciales en la cámara de simulación mediante muestreo activo

Para determinar la concentración real de HAPs en el interior de la cámara, se ha realizado muestreo activo empleando una bomba de muestreo modelo TUFF Standard de Casella Measurements (Bedford, Reino Unido) y un reductor de flujo, a 76 mL min⁻¹ durante 30 segundos en el caso de condiciones de dosis infinitas y a 45 mL min⁻¹ durante 5 minutos en el caso de condiciones de dosis finitas, a través del orificio señalado en la Figura 15, el cual se encuentra cerrado a lo largo de los experimentos excepto cuando se realiza muestreo activo. El flujo de la bomba se calibró antes de cada muestreo con un flujómetro ADM calibrado, de Agilent Technologies (Palo Alto, CA, Estados Unidos). Dicho muestreo se ha realizado empleando tubos de vidrio de desorción térmica (TD), con tapones de perfluoroalcoxi-politetrafluoroetileno (PFA-PTFE), de PerkinElmer (Waltham, MA, Estados Unidos). En su interior se introdujeron 150 mg de Tenax TA (malla 35-60) de Alltech (Selmsdorf, Alemania). Antes de realizar el muestreo activo, los tubos con Tenax se acondicionaron a 300 °C durante un periodo de 2 h, y posteriormente se analizaron para comprobar que dicho procedimiento es eficaz. Para realizar el muestreo activo, los tubos de desorción térmica se acoplan a la bomba de muestreo empleando un tubo de silicona. Una vez realizado el muestreo, los tubos se tapan con tapones de PFA-PTFE y se almacenan a -20 °C hasta su análisis mediante TD-GC-MS. Para el análisis cuantitativo del muestreo activo realizado, se ha preparado una curva de calibrado mediante la adición directa de 10 µL de disoluciones patrón a 5 niveles de concentración comprendidos entre 0.5 y 100 µg mL⁻¹, para los analitos de los estudios en condiciones infinitas y entre 10 y 400 µg mL⁻¹, para condiciones finitas, lo que supondría una masa final de cada uno de los analitos en el interior del tubo de Tenax en el intervalo de 0.005 a 1 µg y 0.1 y 4.0 µg, para dosis infinitas

y finitas, respectivamente. Además, también se adicionaron 10 μL de una disolución de tolueno- d_8 de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ lo que supondría una masa final de 0.1 μg de patrón interno en el interior del tubo de Tenax.

Tanto los tubos de Tenax de patrones como de muestras, se analizan mediante desorción térmica empleando un equipo de TD modelo Turbo Matrix series TD de Perkin Elmer acoplado a un detector de trampa iónica modelo Trace GC-Polaris Q MS de Finningan (Waltham, MA, Estados Unidos), y equipado con una columna capilar HP-5MS (30 m, 0.25 mm, 0.25 μm) de Agilent Technologies.

La desorción térmica se llevó a cabo a 260 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 min empleando un flujo de helio de 75 mL min^{-1} . Los analitos desorbidos se transfieren a una trampa fría de Tenax a -10 $^{\circ}\text{C}$ sin división de flujo. Posteriormente, se realiza una desorción rápida de la trampa a 270 $^{\circ}\text{C}$ a 99 $^{\circ}\text{C s}^{-1}$ y los analitos se desorben y se transfieren directamente a la columna cromatográfica usando una temperatura de la línea de transferencia de 275 $^{\circ}\text{C}$, y con una división de flujo de 1:15. Las condiciones cromatográficas empleadas consisten en una temperatura inicial de 40 $^{\circ}\text{C}$ que se mantienen durante 8 min, posteriormente se aplica una rampa de temperatura de 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta 200 $^{\circ}\text{C}$ y finalmente se mantiene durante 2 min. La adquisición se realizó en modo full scan en el rango de masas de 50 a 200 m/z.

8. Determinación de HAPs en la disolución receptora mediante GC-MS

La determinación de VOCs se llevó a cabo mediante el análisis de las disoluciones receptoras por HS-GC-MS o GC-MS por inyección directa, en función de las propiedades físicoquímicas de los compuestos analizados. Para el análisis mediante HS-GC-MS, se han introducido 5 mL de disolución receptora en un vial de 10 mL de HS con una concentración de 200 ng mL^{-1} de patrón interno (tolueno- d_8), y se cerró herméticamente. Como condiciones de HS se ha empleado una temperatura de 60 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 min de calentamiento de la muestra. En el método de inyección directa, se ha llevado a cabo una extracción líquido-líquido de 5 mL de la disolución receptora con una concentración de 20 ng mL^{-1} de tolueno- d_8 , con 0.5 mL de hexano y 2 minutos de agitación en vórtex. Tras la extracción, se introdujo la disolución de la parte superior en un vial de vidrio de 2 mL con un inserto de 200 μL en su interior y se analizó mediante GC-MS.

El sistema cromatográfico empleado consta de un inyector de HS modelo 7697 A, acoplado a un GC 7890 A de Agilent Technologies equipado con una columna capilar Zebron ZB-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) y un detector de espectrometría de masas (MS) de tipo cuadrupolo simple Agilent Technologies 5975Cinert XL EI/CI MSD triple axial. El programa de temperaturas del horno consiste en una temperatura inicial de 40 °C, mantenida durante 8 min, y una rampa de temperatura de 20 °C min⁻¹ hasta 200 °C, mantenida durante 2 min. La temperatura de inyección es de 250 °C, empleando helio como gas portador a un flujo constante de 0.8 mL min⁻¹. Las temperaturas de la fuente y la línea de transferencia son de 300 y 250 °C, respectivamente. La ionización por impacto electrónico se realiza con una energía de 70 eV.

9. Determinación de nicotina en la disolución receptora mediante LC-MS-MS

La determinación de nicotina en la disolución receptora se ha llevado a cabo mediante LC-MS-MS. Para ello, se ha empleado un equipo UHPLC-MS, modelo ACQUITY® TQD, de Waters (Milford, MS, Estados Unidos), con una columna KINETEX C18 evo (50 x 2.1 mm, 1.7 μ m), de Phenomenex (Torrance, CA, Estados Unidos). La fase móvil empleada consiste en una disolución de acetato de amonio 50 mM en agua (A) y metanol (B). Se empleó un gradiente de elución de 5 a 95 % de fase móvil B en 2 minutos, con un caudal de 0.4 mL min⁻¹, un volumen de inyección de 5 μ L, y una temperatura de columna de 30 °C. Las adquisiciones de MS se realizaron empleando un voltaje capilar de 3.5 kV, una temperatura de la fuente de 120 °C, una temperatura de desolvatación de 300 °C y una tasa de flujo de gas de desolvatación de 690 L h⁻¹. Las condiciones de masas en tandem se ajustaron para la nicotina y la nicotina-d₄, empleándose las transiciones m/z 163 → 130 y 167 → 136, respectivamente.

10. Determinación de HAPs y nicotina en la membrana Strat-M® mediante TD-GC-MS

El análisis de HAPs y nicotina procedentes del humo de tabaco absorbidos en la membrana sintética se ha llevado a cabo mediante el análisis de las membranas Strat-M® empleadas en los experimentos, las cuales tienen un peso de 25 mg, mediante TD-GC-MS. Así, las membranas Strat-M® empleadas en los experimentos, se introdujeron en los tubos TD y se analizaron en las condiciones cromatográficas descritas en el apartado 7 de este capítulo. Las curvas de calibrado se han preparado en tubos TD cargados con membranas Strat-M® nuevas, dopadas con 10 μL de disolución estándar de HAPs en acetona, obteniendo una cantidad de HAPs en el interior del tubo comprendida entre 0.1 y 0.4 μg . Además, se ha adicionado 10 μL de disolución estándar de tolueno- d_8 en acetona de 10 mg L^{-1} , tanto a patrones como a muestras.

11. Determinación de los parámetros de absorción dérmica

Los resultados de concentración de las disoluciones receptoras de los distintos tiempos de exposición ($\mu\text{g L}^{-1}$) en condiciones de dosis infinitas se transformaron en unidades de masa de analito/área ($\mu\text{g cm}^{-2}$). Mediante la representación de la permeabilidad de cada uno de los analitos ($\mu\text{g cm}^{-2}$) frente al tiempo de exposición se obtienen los perfiles de absorción para cada uno de ellos. A partir de dichas gráficas se pueden calcular los parámetros de permeabilidad a través de la membrana sintética de cada uno de los analitos, como el flujo molecular (J) y tiempo de latencia (t_{lag}). J se determina a partir de la pendiente de la recta obtenida de forma experimental durante el primer periodo de exposición donde se produce un aumento lineal de la permeabilidad. Por otro lado, t_{lag} se corresponde con el punto en el que la dicha recta cruza el eje x.

Capítulo 4: Resultados y discusión

1. Diseño, desarrollo y puesta a punto de la cámara de simulación

Para la evaluación de la exposición dérmica a posibles contaminantes presentes en el aire, se ha llevado a cabo el diseño, desarrollo y puesta a punto de una cámara de simulación atmosférica. Se trata de una campana cerrada formada por una base metálica, y paredes y techo de polimetilmetacrilato (Figura 19). Se ha empleado polimetilmetacrilato debido a su elevada transparencia (93%), siendo el plástico más transparente, y a su elevada resistencia al impacto, capacidad de aislamiento térmico, ligereza y resistencia química. Esta cámara permite generar en su interior una atmósfera con una concentración conocida de posibles contaminantes atmosféricos. Posee un volumen interno de 640 L, lo que hace posible el desarrollo de estudios de absorción dérmica en su interior.



Figura 19. Fotografía de la cámara de simulación empleada para la generación de una atmósfera controlada.

La cámara dispone de un sistema de conducciones para introducir un flujo constante de aire limpio y seco. El aire se suministró por los compresores de la instalación disponible en el edificio donde se desarrollan los ensayos, y pasa una serie de filtros para eliminar la humedad y posibles contaminantes orgánicos, garantizando así su calidad y pureza. El flujo de aire seco en el interior de la cámara de simulación se controla mediante una llave de paso, un manorreductor y un rotámetro (Figura 20). La llave de paso es una válvula de bola o de esfera y se caracteriza porque el mecanismo para regular el flujo de aire seco tiene forma de esfera perforada. El manorreductor tiene como función reducir la elevada presión de aire seco generada por el sistema de compresión y adecuarlo al necesario en los experimentos de la cámara de simulación. El flujo de aire seco introducido en la cámara de simulación se controla con un rotámetro de bola. Para conocer de forma exacta el flujo de aire introducido en la cámara de simulación y calibrar de forma exacta y precisa el rotámetro se utiliza un flujómetro de burbuja de elevado volumen (800 mL).

Para homogenizar el aire del interior de la cámara de simulación se introducen dos ventiladores. Todos los orificios de la cámara de simulación se sellan para evitar la entrada y/o salida no controlada de aire seco de la cámara, a excepción de un orificio de 105 mm de diámetro, colocado en el lateral opuesto a la entrada de aire seco (utilizado para la introducción de contaminantes orgánicos en la cámara de simulación) y que se empleó como salida de aire para evitar la sobrepresión en el interior de la cámara, y para la introducción y extracción de las muestras y demás operaciones necesarias en la realización de los experimentos en el interior de la cámara. Esta salida de aire se ha conectado mediante una serie de tubos de aluminio de 100 mm de diámetro con un sistema de extracción para evitar que los operadores queden expuestos los contaminantes evaluados.

La cámara de simulación se ubicó en un laboratorio con una temperatura controlada de 24 ± 2 °C y un sistema de extracción de aire con un sistema de filtros para retener posibles trazas de contaminación.



Figura 20. Fotografía de la llave de paso, el manorreductor y el rotámetro empleado en la instalación del aire comprimido.

Para conseguir una concentración conocida y constante (condiciones de dosis infinita) de contaminantes orgánicos en el interior de la cámara de simulación se ha utilizado una bomba isocrática de un instrumento de LC. La concentración de los contaminantes orgánicos en el interior de la cámara de simulación se ajusta mediante el control de la concentración de la disolución estándar, el flujo de la misma, y el flujo de aire seco introducido. Se emplea acetona como disolvente en la preparación de las disoluciones estándar de contaminantes debido a su elevada presión de vapor, lo que favorece su evaporación en la conexión tipo T, además la acetona no modifica la absorción dérmica de compuestos lipofílicos, como los BTEX.²⁹⁰ A través de un conector en T (Figura 16) se introduce el flujo de aire limpio y seco ($2.0-3.0 \text{ L min}^{-1}$), siendo este perpendicular al flujo constante de contaminantes orgánicos introducidos ($4-5 \mu\text{L min}^{-1}$). De esta forma, el flujo de la disolución estándar de contaminantes, mucho menor que el de aire seco, se evapora completamente, introduciendo los compuestos de interés en estado gaseoso en el interior de la cámara de simulación. Se decidió emplear un conector en T de cristal transparente (Figura 16) para así poder confirmar de forma continua

²⁹⁰ Monteiro-Riviere, N. A. Toxicology of the Skin, CRC Press; 2010

que el flujo de disolución de los contaminantes orgánicos se evapora completamente.

Para conocer y controlar la concentración de los compuestos de interés en el interior de la cámara de simulación se deben evaluar dos parámetros experimentales: el flujo de disolución de analitos (de una concentración conocida) y el flujo de aire seco introducido en la cámara de simulación (Ecuación 11). De esta relación se puede conocer la concentración en el interior de la cámara en mg de analito por metro cúbico de aire:

$$[\text{Analito en aire}] \text{ (mg m}^{-3}\text{)} = \frac{[\text{Analito en disol}](\text{mg L}^{-1}) \cdot \text{Flujo de disol}(\text{L min}^{-1})}{\text{Flujo de aire seco}(\text{m}^3 \text{min}^{-1})} \quad (11)$$

Por tanto, en primer lugar, se debe conocer con exactitud y precisión el flujo de disolución de analito dispensado por la bomba de LC 1050 y asegurarse que éste se mantiene constante durante la realización de todo el experimento, teniendo en cuenta que puede llegar a ser de hasta 48 h. Para ello, se fijó el flujo de la bomba en valores de 0.010 y 0.005 mL min⁻¹, se dispuso el volumen en un vial de 10 mL previamente pesado durante 1 y 2 horas, respectivamente. A continuación, se volvió a pesar el vial de 10 mL con el volumen recogido y por diferencia de pesada se calculó el volumen dispensado y el flujo real de la bomba de LC. Estas medidas se realizaron en distintos días, sin apagar la bomba en ningún momento, obteniéndose los resultados de la Figura 21.

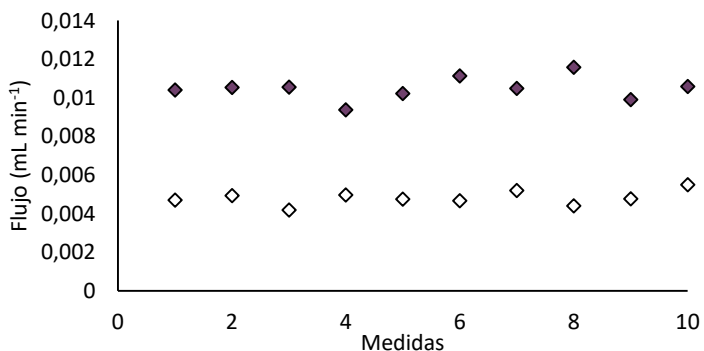


Figura 21. Medidas experimentales del flujo de disolución de analitos dispensado por la bomba de LC durante varios días para flujos de 0.010 mL min⁻¹ (marcadores violetas) y 0.005 mL min⁻¹ (marcadores blancos).

Por otra parte, la segunda variable experimental que se debe controlar para conocer la concentración de los analitos en el aire en el interior de la cámara de simulación es el flujo de aire seco. Como se ha comentado, el rotámetro de bola es el encargado de controlar el flujo de aire seco que se introduce en la cámara de simulación, y éste se calibra con un flujómetro de burbuja de volumen elevado. Para conocer el flujo de aire que se introduce en la cámara, se conecta el rotámetro con el flujómetro y se calcula el flujo de aire seco.

Al igual que en el caso anterior, es necesario comprobar que el flujo de aire seco se mantiene constante a lo largo de todo el experimento para asegurar así que la concentración de analitos en el interior de la cámara también lo hace. Para ello, se ajustó el flujo de aire a 2 L min^{-1} y se realizaron medidas del mismo durante varios días, sin apagar en ningún momento el flujo de aire y sin modificar el flujo indicado por el rotámetro. Los resultados obtenidos han sido los que aparecen en la Figura 22, siendo el valor medio de $1.94 \pm 0.05 \text{ L min}^{-1}$.

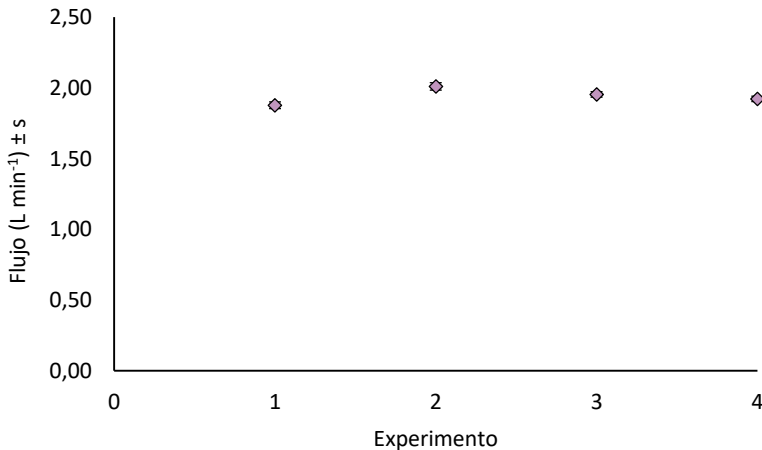


Figura 22. Medidas experimentales del flujo de aire seco obtenidas en distintos días. Nota: el valor indicado es la media de 10 medidas experimentales obtenidas para cada día.

Para la realización de experimentos en condiciones de dosis infinitas de contaminantes orgánicos en el interior de la cámara de simulación, ésta se acondiciona durante un periodo de 16-18 h. Teniendo en cuenta el flujo de aire de entrada en la cámara para cada experimento ($2.0\text{-}3.0 \text{ L min}^{-1}$) y el volumen interno

de la misma, en este periodo de tiempo se renovarían completamente el aire entre 3 y 4 veces. Así pues, se asume, que tras el ciclo de acondicionamiento de la cámara se obtiene un balance de entrada-salida de analito igual a cero.

Para evaluar la utilidad de la cámara de simulación y el sistema de introducción de contaminantes orgánicos, se ajustó el flujo de aire limpio y seco a 2.7 L min^{-1} y el flujo de disolución estándar de contaminantes orgánicos a $4.6 \pm 0.7 \mu\text{L min}^{-1}$, siendo ésta última una disolución de BTEX en acetona al 3 % (p/v). Teniendo en cuenta la relación de la ecuación 11, la concentración teórica de BTEX en aire es 51 mg m^{-3} . Para evaluar la concentración real de cada uno de los analitos en el interior de la cámara de simulación se realiza muestreo activo dos veces al día, durante tres días seguidos. La concentración real de BTEX en el interior de la cámara fue de $46 \pm 4 \text{ mg m}^{-3}$, siendo estadísticamente comparable al valor teórico. Además, la presencia de dos ventiladores en el interior de la cámara permite mantener la homogeneidad del aire en el interior de la cámara. Esto se comprobó introduciendo celdas de Franz modificadas (descritas en el apartado 3 del Capítulo 3) en diferentes posiciones de la cámara (Figura 23). Los resultados mostraron una precisión, establecida como desviación estándar relativa (RSD) de 4 mediciones inferiores al 15 %.

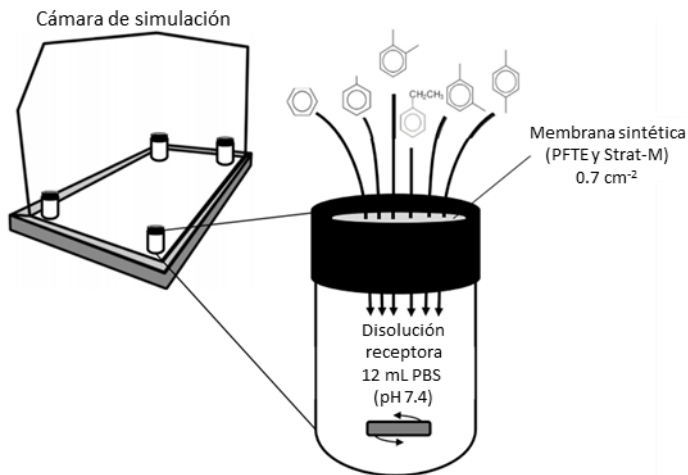


Figura 23. Dispositivo de migración y posiciones de la cámara de simulación evaluadas para el estudio de la homogeneidad de en el interior de la misma.

Las concentraciones de BTEX analizadas en la disolución receptora una vez se ha alcanzado el equilibrio, se pueden comparar con las concentraciones de BTEX en el aire a través de la ley de Henry tal y como se muestra en la Ecuación 12.²⁹¹

$$H_{CC} = \frac{C_{ac}}{C_{gas}} \quad (12)$$

donde H_{CC} se corresponde con la constante de Henry adimensional, y C_{ac} y C_{gas} son las concentraciones de los analitos en la fase acuosa y gas, respectivamente. Como se puede observar en la Tabla 5, empleando la ley de Henry se obtuvo una concentración de BTEX de $42 \pm 3 \text{ mg m}^{-3}$.

Para comprobar la capacidad del sistema de introducción de contaminantes para generar atmósferas contaminadas con concentraciones inferiores, se ajustó el flujo de aire a 2.7 mL min^{-1} , y empleando una disolución estándar de BTEX en acetona al 1 % (p/v) se fijó el flujo a $4.0 \pm 0.9 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$. Teniendo en cuenta la relación de la ecuación 11, la concentración teórica de BTEX en aire es $15 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

De igual forma, se analizó la concentración real de BTEX en aire empleando muestreo activo, además con celdas de Franz modificadas se obtuvo la concentración de BTEX en el aire mediante la ley de Henry. Los valores obtenidos se pueden observar en la Tabla 5. A partir de estos resultados, se demuestra la estabilidad del flujo de aire seco y los flujos de disoluciones BTEX, lo cual es imprescindible para obtener una atmósfera controlada para realizar experimentos de absorción dérmica en condiciones de dosis infinita.

Tabla 5. Condiciones operativas de la cámara de simulación y concentraciones en aire de BTEX.

Parámetro	Concentración baja	Concentración alta
Flujo de aire (L min^{-1})	2.7 ± 0.1	2.7 ± 0.2
[Disolución estándar] (% p/v)	1.00	3.00
Flujo de la disolución estándar ($\mu\text{L min}^{-1}$)	4.0 ± 0.9	4.6 ± 0.7
Concentración del aire ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
Teórica	15	51
Muestreo activo	15 ± 2	46 ± 4
Ley de Henry	20 ± 2	42 ± 3

²⁹¹ Sander, R. Compilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent. Atmospheric Chemistry and Physics. 2015; 15(8):4399-4981.

En resumen, podemos concluir que se ha diseñado una cámara de simulación, que permite la introducción de contaminantes orgánicos de forma controlada generando atmósferas contaminadas de forma homogénea.

2. Evaluación de la absorción dérmica de BTEX en atmósferas contaminadas

Empleando la cámara de simulación desarrolla y descrita en el apartado anterior, se procedió a la evaluación de la absorción dérmica de BTEX en atmósferas contaminadas. Tras el desarrollo y validación del método analítico basado en HS-GC-MS, se determinaron parámetros de difusión in vitro, como el flujo y el tiempo de latencia para el benceno, tolueno y xilenos.

2.1. Desarrollo y validación de métodos analíticos basados en HS-GC-MS para la determinación de BTEX

Se llevó a cabo la puesta a punto y validación de métodos analíticos basados en técnicas cromatográficas para el análisis de BTEX. Los compuestos conocidos como BTEX se suelen determinar mediante cromatografía de gases (GC) debido a sus propiedades físico-químicas y su estabilidad térmica.²⁹² Durante el desarrollo de los métodos analíticos hay que tener en cuenta, no solamente las propiedades físico-químicas del analito, sino también las características de la muestra. En este caso concreto, la muestra es una disolución en PBS (pH 7.4), ya que se trata de la disolución receptora empleada para evaluar la permeabilidad del BTEX a través de simulantes de piel. Con el fin de intentar que el método analítico sea lo más simple posible y evitar añadir etapas de extracción que lo compliquen y alarguen de forma excesiva, se va a desarrollar un método basado en GC-MS empleando un sistema de introducción de muestra mediante espacio de cabeza (HS).

Para evaluar el efecto de diferentes parámetros que afectan a la sensibilidad del análisis de BTEX mediante HS-GC-MS, como el volumen de muestra en el vial HS, la fuerza iónica de la muestra, la temperatura y tiempo de extracción, y el tiempo de

²⁹² Martines, C., Longo, M., Lerda, D., et al. A GC Method for the Quantitative Determination of BTEX in Gasoline. *Journal of Chromatographic Science*. 1996; 34 (9): 413-417

inyección, se analiza una disolución de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de BTEX en diferentes condiciones y se compara el área obtenida para cada uno de los patrones en el cromatograma.

Se evaluó el efecto del volumen de muestra en el vial de HS sobre la señal analítica del BTEX. Para ello, se analizan por el método HS-GC-MS descrito en el apartado 8 del Capítulo 3, muestras con una concentración de BTEX de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ introduciendo en el vial de HS diferentes volúmenes entre 1 y 7 mL y manteniendo constantes el resto de variables (fuerza iónica de la muestra: 0.9 % NaCl (0.15 M); temperatura del horno HS: $60 \text{ }^\circ\text{C}$; tiempo de calentamiento: 20 minutos; tiempo de inyección: 0.1 minutos).

En la Figura 24, se pueden observar los resultados obtenidos. Al aumentar el volumen, aumenta la señal del BTEX, sin embargo, a volúmenes superiores a 5 mL comienza a aumentar la desviación estándar de los resultados, debido a fugas provocadas por sobrepresiones en el vial. Por tanto, se decide emplear un volumen de 5 mL como valor más adecuado para el resto de experimentos.

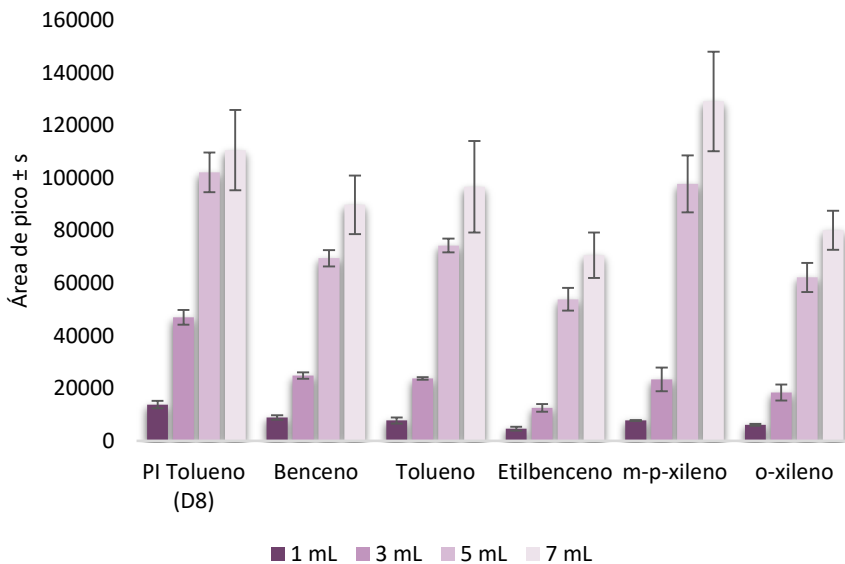


Figura 24. Efecto del volumen de muestra en la señal analítica de un patrón de BTEX de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ en PBS analizado mediante HS-GC-MS.

Para evaluar el efecto de la fuerza iónica de la muestra sobre la señal analítica del BTEX, se analizan de nuevo por el método HS-GC-MS anterior, muestras con una concentración de BTEX de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ y con fuerzas iónicas comprendidas entre 0.15 y 3.58 M de NaCl, manteniendo constantes el resto de variables (volumen de muestra: 5 mL; temperatura del horno HS: $60 \text{ }^\circ\text{C}$; tiempo de calentamiento: 20 minutos; tiempo de inyección: 0.1 minutos).

En la Figura 25 se observan los resultados obtenidos. Como se puede ver, el aumento de fuerza iónica, con respecto a la disolución de muestra original que contiene un 0.9 % de NaCl (0.15 M), no implica un aumento significativo en la señal del patrón de BTEX. Por tanto, se selecciona la disolución acuosa al 0.9 % de NaCl como condiciones más apropiadas.

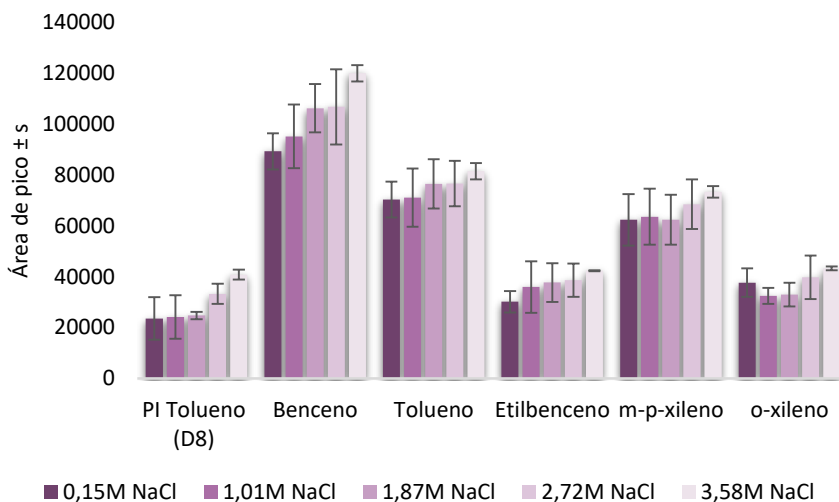


Figura 25. Efecto de la fuerza iónica de la muestra en la señal analítica de un patrón de BTEX de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ en PBS analizado mediante HS-GC-MS.

Posteriormente, se evaluó el efecto de la temperatura del horno sobre la señal analítica del BTEX. Para ello, empleando el mismo método HS-GC-MS que anteriormente, se analizaron muestras con una concentración de BTEX de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ a distintas temperaturas de horno, comprendidas entre 40 y $75 \text{ }^\circ\text{C}$, manteniendo constantes el resto de variables (volumen de muestra: 5 mL; fuerza iónica: 0.9 % NaCl (0.15 M); tiempo de calentamiento: 20 minutos; tiempo de inyección: 0.1 minutos).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 26. Como se puede observar la señal aumenta al aumentar la temperatura del horno hasta alcanzar un valor máximo a 60 °C a partir del cual se mantiene constante. Hay que indicar que no se evaluaron temperaturas superiores a 75 °C para evitar posibles sobrepresiones en el interior del vial de HS debido a la evaporación del agua.

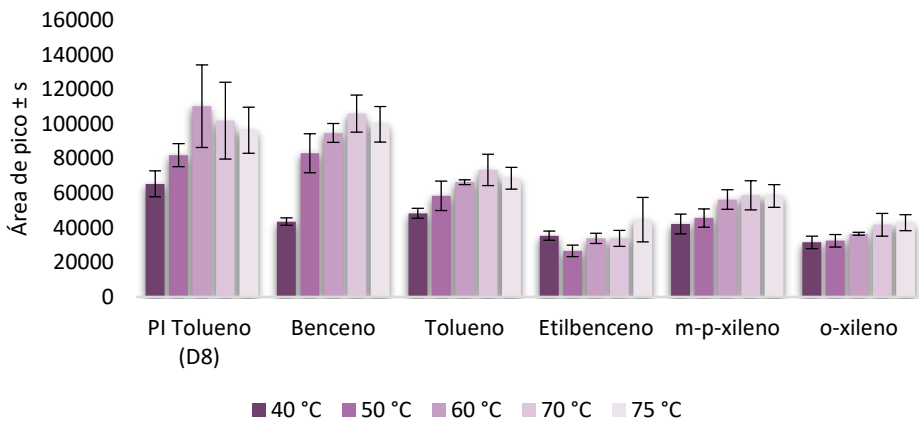


Figura 26. Efecto de la temperatura de extracción en la señal analítica de un patrón de BTEX de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ en PBS analizado mediante HS-GC-MS.

Para evaluar el efecto del tiempo de extracción sobre la señal analítica del BTEX, se analizan por el método HS-GC-MS anterior, muestras con una concentración de BTEX de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ a distintos tiempos de extracción, comprendidos entre 5 y 40 minutos, manteniendo constantes el resto de variables (volumen de muestra: 5 mL; fuerza iónica: 0.9 % NaCl (0.15 M); temperatura del horno HS: 60 °C; tiempo de inyección: 0.1 minutos).

Los resultados se muestran en la Figura 27. Como cabe esperar, al aumentar el tiempo de calentamiento de la muestra, aumenta la señal, hasta el punto en el que se llega a un equilibrio, donde a pesar de calentar más tiempo, la señal no aumenta. Se puede observar que la señal más alta se obtiene tras 20 minutos de calentamiento, por lo que este tiempo será el que se emplee para los siguientes experimentos.

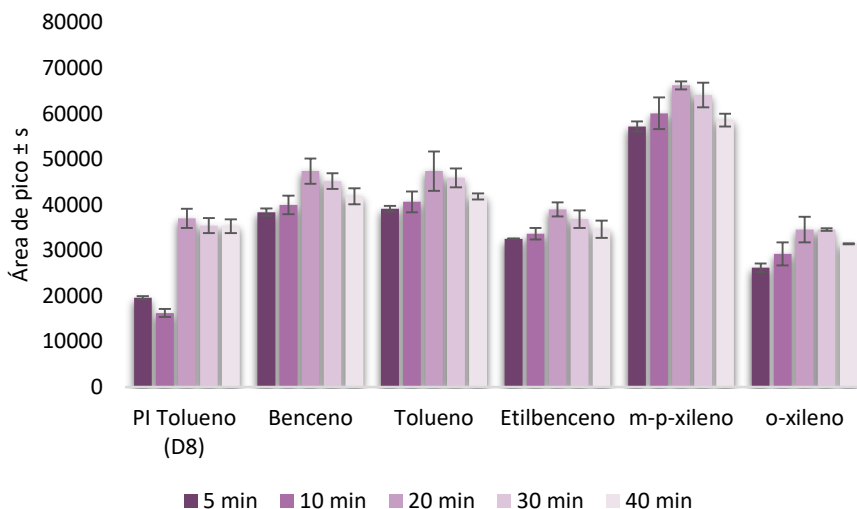


Figura 27. Efecto del tiempo de extracción en la señal analítica de un patrón de BTEX de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ en PBS analizado mediante HS-GC-MS.

Finalmente, se evaluó el efecto del tiempo de inyección del HS sobre la señal analítica del BTEX. Para ello, se analizan por el método HS-GC-MS descrito previamente, muestras con una concentración de BTEX de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ a distintos tiempos de inyección, comprendidos entre 0.1 y 0.4 minutos, manteniendo constantes el resto de variables (volumen de muestra: 5 mL; fuerza iónica: 0.9 % NaCl (0.15 M); temperatura del horno HS: 60°C ; tiempo de calentamiento: 20 min).

Como se puede ver en la Figura 28, el aumento del tiempo de inyección superior a 0.1 minutos provoca el ensanchamiento y la superposición de los picos. Aunque se esperaba un aumento de la sensibilidad al aumentar el tiempo de inyección, la disminución de la resolución y la forma no gaussiana de los picos, indican que el tiempo de inyección más adecuado es de 0.1 min.

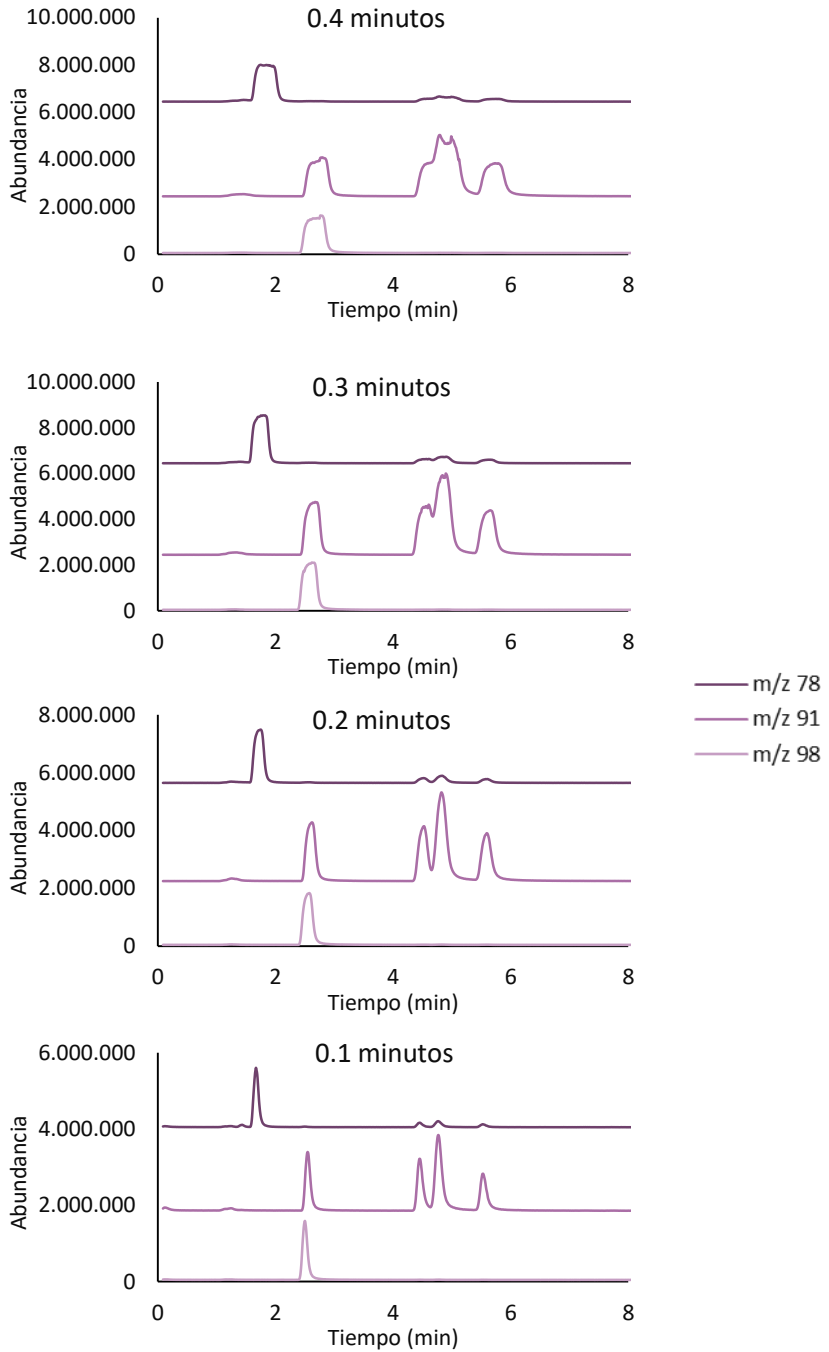


Figura 28. Cromatogramas obtenidos un patrón de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de BTEX a distintos tiempos de inyección, y m/z correspondientes al benceno (m/z 78), tolueno, etilbenceno y xilenos (m/z 91) y tolueno- d_8 (m/z 98).

En la Tabla 6 aparecen reflejadas las condiciones experimentales más adecuadas para el análisis de BTEX mediante HS-GC-MS, a modo de resumen.

Tabla 6. Condiciones experimentales seleccionadas para el análisis de BTEX mediante HS-GC-MS.

Volumen de muestra (mL)	5
Fuerza iónica	0.9 % (0.15 M)
Temperatura del horno (°C)	60
Tiempo de calentamiento (min)	20
Tiempo de inyección (min)	0.1

2.2. Características analíticas del procedimiento de HS-GC-MS

Empleando las condiciones experimentales descritas en la Tabla 6, se ha realizado un calibrado para los diferentes analitos, preparando disoluciones entre 25 y 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ en PBS y analizándolas mediante el procedimiento HS-GC-MS. En la Tabla 7 aparecen reflejadas las características analíticas de la metodología propuesta para la determinación de BTEX en términos de linealidad, precisión y límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ).

Tabla 7. Características analíticas del método de análisis de BTEX mediante HS-GC-MS.

Compuesto	Coefficiente de determinación (R^2)	% RSD ^a	LOD ^b ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ^c ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Benceno	0.993	5	1.5	5
Tolueno	0.990	4	1.5	5
Etilbenceno	0.9992	4	2	7
m,p-xileno	0.9993	2	4	12
o-xileno	0.998	4	3	10

^aDesviación estándar relativa de un patrón de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BTEX ($n = 5$)

^bLímite de detección calculado como tres veces la desviación de la ordenada en el origen entre la pendiente de la curva de calibrado.

^cLímite de cuantificación calculado como diez veces la desviación de la ordenada en el origen entre la pendiente de la curva de calibrado.

La determinación de los coeficientes (R^2) del BTEX se realizó empleando la curva de calibrado en el intervalo de concentraciones entre 25-500 $\mu\text{g L}^{-1}$, con valores R^2

superiores a 0.99 en todos los casos. Los errores residuales se distribuyeron aleatoria y simétricamente alrededor de cero, con los valores residuales estandarizados inferiores a 2. La repetitividad de las medidas se calculó como el % RSD de los valores del área de pico obtenidos para cinco medidas independientes de una disolución estándar de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de BTEX, obteniendo valores de % RSD entre 2-5 %. Los valores de LOD y LOQ se calcularon como tres y diez veces, respectivamente, la desviación estándar de la ordenada en el origen entre la pendiente de la curva de calibrado, obteniendo valores entre $1.5\text{-}4 \mu\text{g L}^{-1}$ y $5\text{-}12 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

2.3. Estudio de las condiciones experimentales más apropiadas para realizar estudios de permeabilidad a través de simulantes de piel

2.3.1. Efecto del espesor y la naturaleza de la membrana en los parámetros de permeabilidad

El objetivo de este estudio se centra en evaluar el espesor y la naturaleza de las membranas empleadas como simulantes de piel. Para ello, se compararon los parámetros de permeabilidad J y t_{lag} de membranas de PDMS de distinto espesor y de membranas Strat-M®. El PDMS, se emplea a menudo como simulante de piel en estudios con celdas de Franz.²⁹³ Es de naturaleza hidrófoba y posee propiedades de permeación que limitan la velocidad, similares a las de la piel, por lo que es una opción adecuada para predecir la absorción dérmica de contaminantes orgánicos como los VOCs, y en particular los BTEX, ya que la absorción dérmica de compuestos orgánicos siguen la ley de Fick.²⁹⁴ Por otro lado, las membranas Strat-M® son membranas sintéticas formadas por múltiples capas con diferente permeabilidad, desarrolladas con el objetivo de simular la piel humana.²⁹⁵

Por tanto, para evaluar si las membranas PDMS se pueden utilizar como alternativa a membranas sintéticas más complejas y costosas como la Strat-M®, se ha llevado

²⁹³ Uchida, T., Yakumaru, M., Nishioka, K., et al. Evaluation of a Silicone Membrane as an Alternative to Human Skin for Determining Skin Permeation Parameters of Chemical Compounds. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2016; 64(9):1338-1346.

²⁹⁴ Waters, L. J. Recent developments in skin mimic systems to predict transdermal permeation. *Current Pharmaceutical Design*. 2015; 21(20):2725-2732.

²⁹⁵ Arce, F. JR., Asano, N., See, G. L., et al. Usefulness of Artificial Membrane, Strat.M®, in the Assessment of Drug Permeation from Complex Vehicles in Finite Dose Conditions. *Pharmaceutics*. 2020; 12(173): 2-11.

a cabo un experimento de permeabilidad tanto de las membranas PDMS con grosores comprendidos entre 0.5 y 3.0 mm como de las membranas Strat-M® (0.3 mm), empleando una concentración constante de $51 \mu\text{g L}^{-1}$ de BTEX en el aire del interior de la cámara de simulación (Tabla 5).

En la Figura 29 y 30 se han representado las curvas de permeabilidad obtenidas a lo largo de 24 h para las membranas Strat-M® y PDMS (0.5, 1.0 mm) así como para las membranas de PDMS de 2.0 y 3.0 mm de espesor, respectivamente. Como se puede observar, durante las primeras horas de exposición se produce un aumento lineal de la permeabilidad de todos los compuestos evaluados, lo que corrobora que los BTEX siguen la primera ley de Fick. Por tanto, se calcularon los parámetros de permeabilidad J y t_{lag} (Tabla 8), a partir de la pendiente de la parte lineal de la curva de permeabilidad por mínimos cuadrados y el punto en que esta línea atraviesa el eje x, respectivamente.

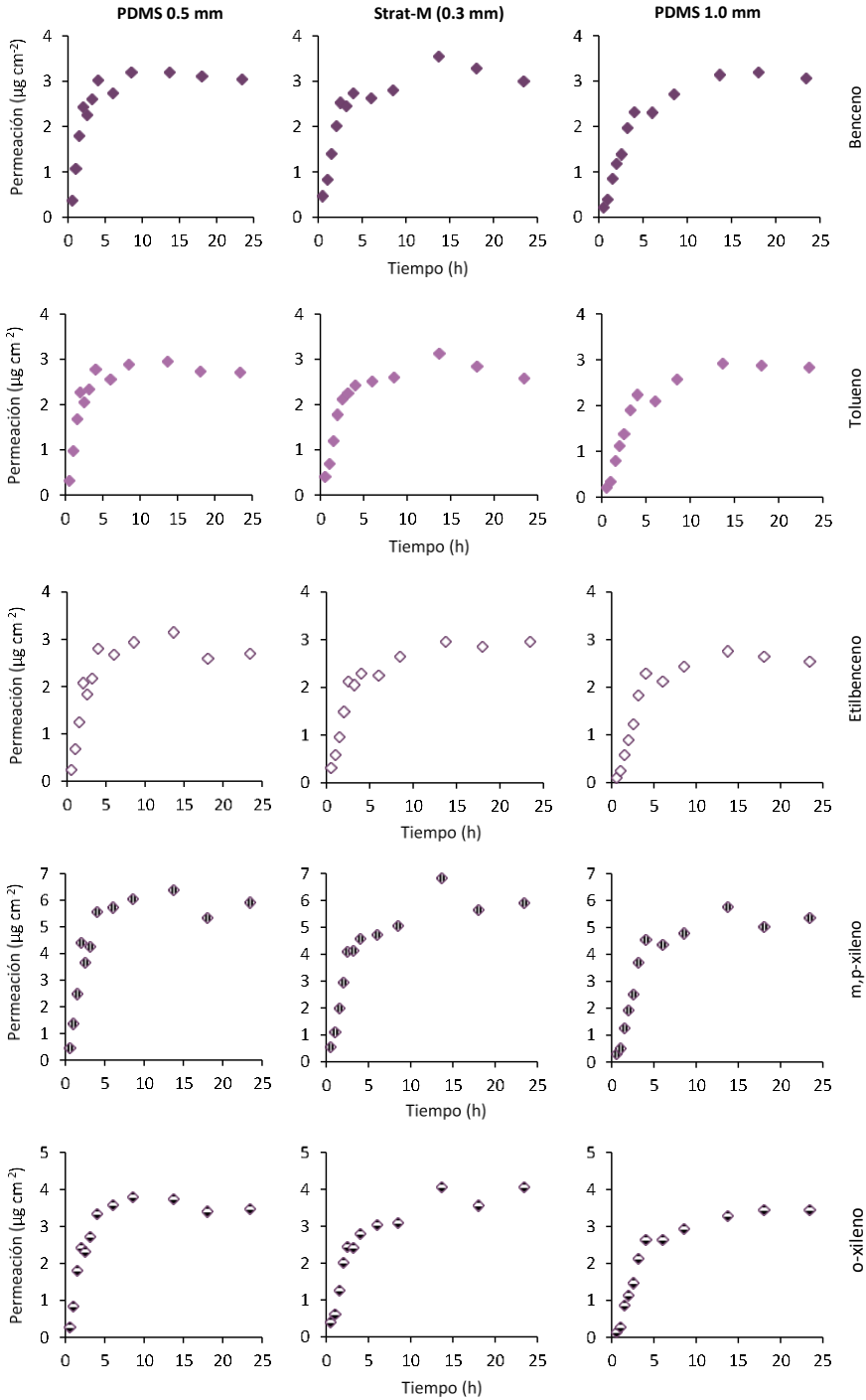


Figura 29. Curvas de permeabilidad de BTEX durante 24 h a una concentración de $51 \mu\text{g L}^{-1}$ en aire, empleando membranas Strat-M® y PDMS (0.5 y 1.0 mm).

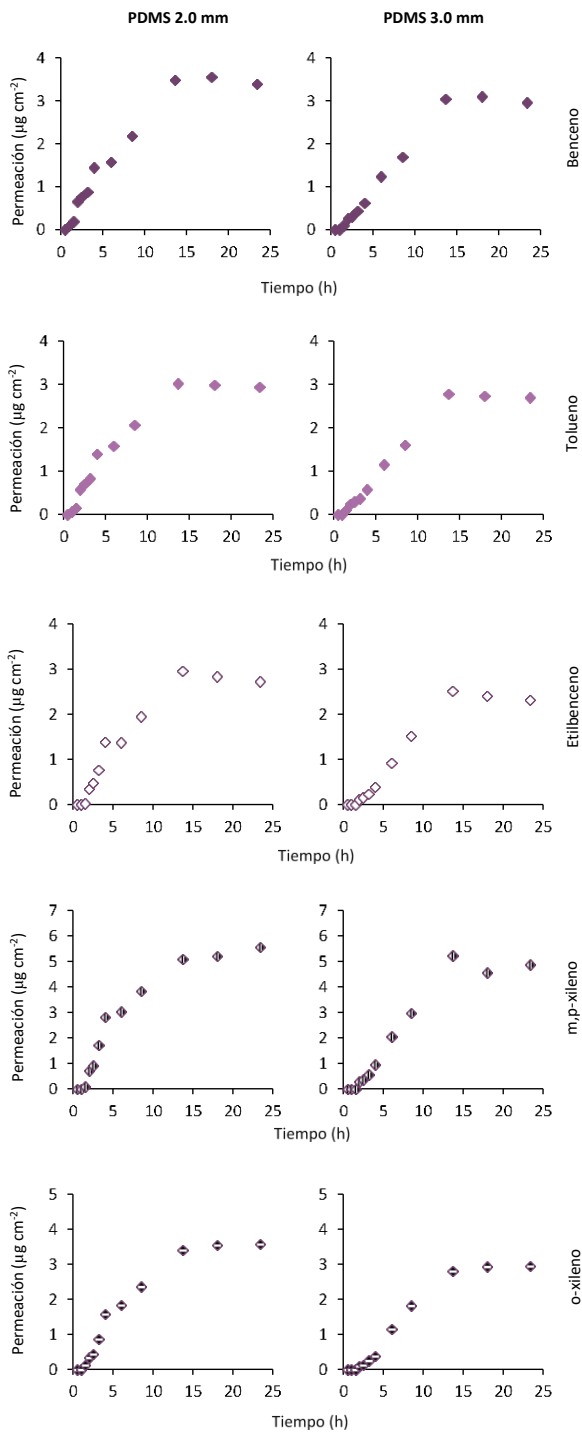


Figura 30. Curvas de permeabilidad de BTEX durante 24 h a una concentración de 51 µg L⁻¹ en aire, empleando membranas PDMS (2.0 y 3.0 mm).

Tabla 8. J y t_{lag} obtenidos de forma experimental en función del analito y de la naturaleza de la membrana para una concentración de BTEX en aire de 51 mg m^{-3} , así como las diferencias en porcentaje con respecto a los resultados obtenidos para las membranas Strat-M®, representadas entre paréntesis.

J ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1} \pm s$)					
	Strat-M™	PDMS 0.5 mm	PDMS 1.0 mm	PDMS 2.0 mm	PDMS 3.0 mm
Benceno	1.1 ± 0.1	1.28 ± 0.07 (28)	0.74 ± 0.04 (26)	0.49 ± 0.09 (55)	0.23 ± 0.02 (79)
Tolueno	0.90 ± 0.07	1.23 ± 0.07 (37)	0.62 ± 0.03 (31)	0.51 ± 0.09 (43)	0.19 ± 0.01 (79)
Etilbenceno	1.0 ± 0.2	1.2 ± 0.2 (20)	0.65 ± 0.03 (35)	0.56 ± 0.09 (44)	0.20 ± 0.03 (80)
m,p-Xileno	1.9 ± 0.2	2.3 ± 0.4 (21)	1.31 ± 0.06 (31)	1.1 ± 0.2 (42)	0.39 ± 0.03 (79)
o-Xileno	1.1 ± 0.1	1.5 ± 0.2 (36)	0.74 ± 0.04 (33)	0.5 ± 0.1 (54)	0.21 ± 0.02 (81)
Media de diferencias	-	28 ± 8	31 ± 3	48 ± 6	80 ± 2

t_{lag} (min \pm s)					
	Strat-M™	PDMS 0.5 mm	PDMS 1.0 mm	PDMS 2.0 mm	PDMS 3.0 mm
Benceno	< 10	< 10 (-) ^a	10 ± 10 (-) ^a	40 ± 10 (-) ^a	54 ± 3 (-) ^a
Tolueno	< 10	< 10 (-) ^a	15 ± 6 (-) ^a	50 ± 20 (-) ^a	51 ± 3 (-) ^a
Etilbenceno	23 ± 9	21 ± 9 (9)	31 ± 7 (35)	90 ± 40 (291)	130 ± 10 (465)
m,p-Xileno	20 ± 10	20 ± 10 (0)	30 ± 10 (50)	80 ± 30 (300)	100 ± 10 (400)
o-Xileno	20 ± 8	22 ± 8 (10)	25 ± 8 (25)	70 ± 30 (250)	103 ± 9 (415)
Media de diferencias	-	6 ± 6	37 ± 13	280 ± 30	430 ± 30

^a Para el caso de benceno y tolueno no es posible obtener las diferencias en porcentaje entre los t_{lag} de las membranas PDMS de distinto espesor con respecto a la membrana Strat-M®, ya que los t_{lag} obtenidos para ésta última son inferiores a 10 min.

En la Tabla 8 a parecen reflejados los valores de J y t_{lag} obtenidos de forma experimental para cada uno de los compuestos y membranas evaluadas, los cuales varían entre 0.2 y $2.3 \mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ y entre tiempos inferiores a 10 minutos y 130 min, respectivamente. Por un lado, los valores de flujo disminuyen a medida que aumenta el espesor de la membrana. Por el contrario, los tiempos de latencia aumentan a medida que se produce un aumento del espesor de la membrana lo que indica que los analitos tardan más tiempo en atravesarla y alcanzar la disolución aceptora. Estudios previos donde se evalúa la absorción dérmica de compuestos orgánicos a través de piel humana o animal, de distinto espesor (0.4-1.2mm) empleada como membrana en celdas de difusión, corroboran que un mayor espesor de membrana provoca una disminución de la permeabilidad de

compuestos orgánicos y por tanto, una disminución del J y un aumento del t_{lag} .^{296, 297}

Además, a partir de los resultados obtenidos, se llega a la conclusión de que las membranas de PDMS de 0.5 y 1.0 mm de grosor presentan J y t_{lag} similares a los obtenidos para las membranas Strat-M® para la permeabilidad de BTEX. Se han calculado las diferencias en porcentaje en la Tabla 8. Como puede verse, las membranas PDMS de 0.5 y 1.0 mm de grosor son comparables a las Strat-M®, teniendo diferencias medias de J entre 28 y 31 % respectivamente. Por otro lado, los valores de t_{lag} de la membrana PDMS de 0.5 mm proporcionan una diferencia media del 6 % con respecto a los valores de t_{lag} obtenidos con las membranas Strat-M®. Los valores de t_{lag} de la membrana PDMS de 1.0 mm de grosor pueden considerarse aceptables con una diferencia media del 37 %, mientras que los valores de t_{lag} de las membranas PDMS de 2.0 y 3.0 mm proporcionan diferencias medias de 280 y 427 %, respectivamente, lo que indica que no son comparables a las Strat-M®.

2.3.2. Efecto de la concentración de BTEX en aire en los parámetros de permeabilidad

Para evaluar el efecto que tiene la concentración de BTEX en el aire sobre los parámetros de permeabilidad, se ha llevado a cabo un estudio de absorción dérmica a dos concentraciones de BTEX en el interior de la cámara, de 15 y 51 $\mu\text{g L}^{-1}$. En la Tabla 9 se muestran los parámetros de permeabilidad obtenidos en función de los compuestos evaluados, la membrana sintética (PDMS de 1.0 mm y Strat-M®), y la concentración de BTEX en el aire del interior de la cámara de simulación (15 y 51 $\mu\text{g L}^{-1}$).

²⁹⁶ Wilkinson, S. C., Maas, W. J. M., Nielsen, J. B., et al. Interactions of skin thickness and physicochemical properties of test compounds in percutaneous penetration studies. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 2016; 79:405-413.

²⁹⁷ Takeuchi, H., Ishida, M., Furuya, A., et al. Influence of Skin Thickness of *in Vitro* Permeabilities of Drugs through Sprague-Dawley Rat of Yucatan Micropig Skin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2012; 35(2):192-202.

Tabla 9. J y t_{lag} obtenidos experimentalmente en función del analito y las membranas evaluadas empleando concentraciones de 15 y 51 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BTEX en aire.

J ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1} \pm s$)				
	Strat-M®		PDMS 1.0 mm	
[BTEX] ($\mu\text{g L}^{-1}$)	15	51	15	51
Benceno	0.49 ± 0.03	1.0 ± 0.1	0.43 ± 0.03	0.74 ± 0.04
Tolueno	0.46 ± 0.03	0.90 ± 0.07	0.47 ± 0.02	0.62 ± 0.03
Etilbenceno	0.37 ± 0.05	1.0 ± 0.2	0.41 ± 0.03	0.65 ± 0.03
m,p-xileno	0.85 ± 0.08	1.9 ± 0.2	0.79 ± 0.04	1.31 ± 0.06
o-xileno	0.45 ± 0.04	1.1 ± 0.1	0.50 ± 0.03	0.74 ± 0.04

t_{lag} (min ± s)				
	Strat-M®		PDMS 1.0 mm	
[BTEX] ($\mu\text{g L}^{-1}$)	15	51	15	51
Benceno	17 ± 3	< 10	20 ± 3	< 10
Tolueno	15 ± 3	< 10	26 ± 2	15 ± 6
Etilbenceno	26 ± 2	23 ± 9	35 ± 2	31 ± 7
m,p-xileno	29 ± 7	20 ± 10	34 ± 3	30 ± 10
o-xileno	30 ± 3	20 ± 8	38 ± 3	25 ± 8

Teniendo en cuenta estos resultados, se puede concluir que el flujo aumenta proporcionalmente a la concentración de BTEX en el aire, mientras que t_{lag} disminuye a medida que aumenta la concentración de BTEX en el aire. Este hecho, se ha demostrado en estudios previos, donde se evaluó el efecto de la concentración del compuesto estudiado sobre la permeabilidad del mismo.^{298, 299, 300} Además, teniendo en cuenta que J es directamente proporcional a la concentración del compuesto evaluado (Ecuación 1), es de esperar que un aumento de la concentración provoque un aumento en el flujo molecular del compuesto a través de la membrana. Por otro lado, cabe señalar que los valores de t_{lag} obtenidos para el benceno y el tolueno, comprendidos entre tiempos inferiores a 10 minutos y 17 minutos, difieren de los obtenidos para el etilbenceno y los xilenos, teniendo resultados más elevados en todas las condiciones experimentales evaluadas,

²⁹⁸ Bialik, W., Walters, K. A., Brain, K. R., et al. Some factors affecting the in vitro penetration of ibuprofen through human skin. *International Journal of Pharmaceutics*. 1993; 92:219-223.

²⁹⁹ Frasch, H. F., Barbero, A. M. *In vitro* human epidermal permeation of nicotine from electronic cigarette refill liquids and implication for dermal exposure assessment. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*. 2016; 27(6):618-624

³⁰⁰ Frasch, H. F., Barbero, A. M., Alachkar, H., et al. Skin Penetration And Lag Times Of Neat And Aqueous Diethyl Phthalate, 1,2-Dichloroethane And Naphtalene. *Cutaneous and Ocular Toxicology*. 2007; 26(2):147-160.

comprendidos entre 25 y 38 minutos. Este aspecto también se ha observado en los resultados encontrados en bibliografía, lo que indica una absorción dérmica más rápida para benceno y tolueno a través de la membrana debido a su menor tamaño.^{301, 302, 303}

3. Evaluación de la absorción dérmica de VOCs y semiVOCs en atmósferas contaminadas

Una vez desarrollada la cámara de simulación en condiciones de dosis infinitas y demostrada su validez para realizar estudios de absorción dérmica de BTEX en su interior, se evaluó su aplicabilidad para la determinación de los parámetros de absorción dérmica para un mayor número de HAPs, incluyendo VOCs y semiVOCs. Por ello, se llevó a cabo un estudio de absorción dérmica, empleando membranas Strat-M®, para 1,2-dicloroetano, benceno, bromodichlorometano, tolueno, etilbenceno, m,p-xileno, o-xileno 1,2-dibromoetano, clorobenceno, bromoformo, nitrobenceno y naftaleno en las condiciones experimentales indicadas en la Tabla 10. Para ello, se evaluó la absorción dérmica a distintos tiempos de exposición, comprendidos entre 0.5 y 24 h, y se analizaron las disoluciones receptoras mediante HS-GC-MS y GC-MS por inyección directa (después de una etapa previa de extracción con hexano). En la Tabla 11 se muestra el procedimiento analítico, los iones seleccionados, el tiempo de retención y el límite de cuantificación de cada uno de los analitos evaluados.

³⁰¹ Adami, G., Larese, F., Venier, M., et al. Penetration of benzene, toluene and xylenes contained in gasolines through human abdominal skin in vitro. *Toxicology in Vitro*. 2006; 20(8):1321-1330.

³⁰² Schenk, L., Rauma, M., Fransson, M. N., et al. Percutaneous absorption of thirty eight organic solvents in vitro using pig skin. *Plos One*. 2018; 13(10):1-16.

³⁰³ Blanck, I. H., McAuliffe, D. J. Penetration of benzene through human skin. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1985; 85:522-526.

Tabla 10. Condiciones experimentales de la cámara de simulación y la concentración de HAPs en el aire.

Parámetro	Valor
Temperatura (°C)	24 ± 2
Flujo de aire (L min ⁻¹)	2.73 ± 0.04
Concentración VOCs en disolución (% p/v)	0.35
Flujo de disolución (µL min ⁻¹)	3.9 ± 0.5
Concentración en el aire (µg L ⁻¹)	
Teórica	5
Muestreo activo	4.9 ± 0.4
Ley de Henry	5 ± 2

Tabla 11. Procedimiento analítico, iones seleccionados, tiempo de retención y límite de cuantificación de cada uno de los analitos estudiados.

Analito	Procedimiento analítico	Iones (m/z)	Tiempo de retención (min)	LOQ (µg L ⁻¹)
1,2-diclorometano	HS-GC-MS	62	1.54	10
Benceno	HS-GC-MS	77, 78	1.58	5
Bromodiclorometano	HS-GC-MS	83	1.87	10
Tolueno	HS-GC-MS	91, 92	2.36	5
Etilbenceno	GC-MS	91, 106	3.69	8
m,p-xileno	GC-MS	91, 106	3.99	17
o-xileno	GC-MS	91, 106	4.65	10
1,2-dibromoetano	GC-MS	107	2.63	25
Clorobenceno	GC-MS	112	3.32	91
Bromoformo	GC-MS	173	4.65	50
Nitrobenceno	GC-MS	123	11.00	500
Naftaleno	GC-MS	128	12.06	50

Como se puede observar en la Figura 31, todos los HAPs evaluados se comportan según la ley de Fick, que establece que, a tiempos cortos de exposición, se produce un aumento lineal de la permeabilidad hasta que se alcanza un equilibrio entre la disolución receptora y la disolución donadora, teniendo valores de permeabilidad en el equilibrio comprendidos entre $0.27 \pm 0.2 \mu\text{g cm}^{-2}$ para el caso del benceno y $26 \pm 3 \mu\text{g cm}^{-2}$ para el nitrobenceno. Estos resultados corroboran la validez de la cámara de simulación en condiciones de dosis infinita para realizar estudios de absorción dérmica en su interior, no solo de BTEX sino de un número mayor de compuestos orgánicos.

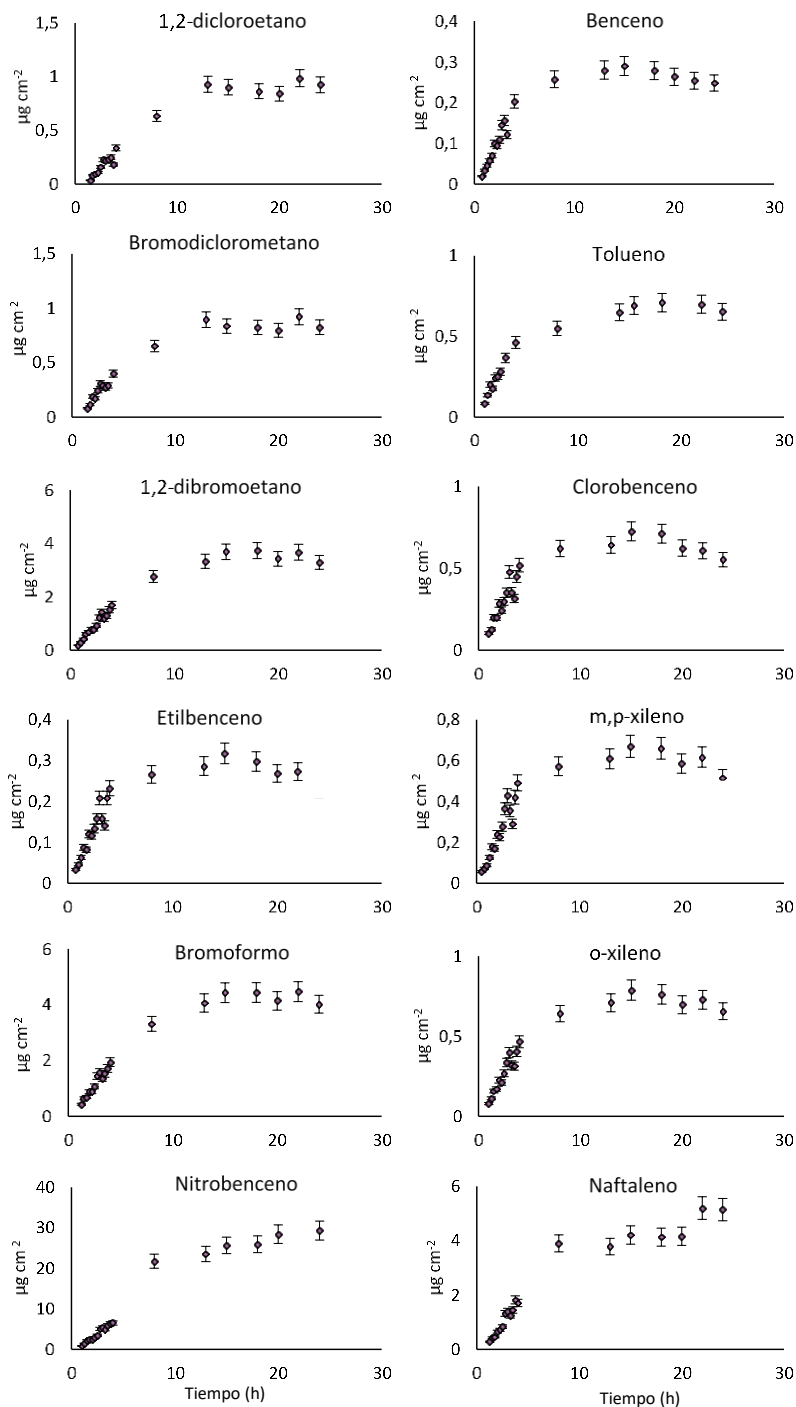


Figura 31. Perfiles de absorción a través de membranas Strat-M[®] obtenidos para los HAPs evaluados a distintos tiempos de exposición a aire contaminado a un nivel de concentración teórica de $5 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabla 12. Valores de K_{OW} y H_{CC} característicos de los HAPs evaluados y parámetros de permeabilidad obtenidos experimentalmente empleando la cámara de simulación a una concentración de HAPs en aire de $5 \mu\text{g L}^{-1}$.

HAPs	K_{OW} ³⁰⁴	H_{CC} ³⁰⁵	Permeabilidad en el equilibrio ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1} \pm \text{s}$)	J ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1} \pm \text{s}$)	t_{lag} (min $\pm \text{s}$)
1,2-dicloroetano	1.47	19.83	0.9 ± 0.1	0.114 ± 0.005	69.1 ± 0.8
Benceno	2.13	4.21	0.27 ± 0.02	0.088 ± 0.003	< 10
Bromodichlorometano	2.10	9.92	0.82 ± 0.09	0.11 ± 0.02	34 ± 2
Tolueno	2.69	3.72	0.66 ± 0.06	0.12 ± 0.02	< 10
1,2-dibromoetano	1.60	44.62	3.4 ± 0.3	0.43 ± 0.02	15 ± 5
Clorobenceno	2.84	7.44	0.64 ± 0.06	0.13 ± 0.01	4 ± 2
Etilbenceno	3.13	3.22	0.28 ± 0.03	0.057 ± 0.003	14 ± 2
m,p-xileno	3.18-3.20	3.47	0.60 ± 0.05	0.126 ± 0.008	15 ± 2
Bromoformo	2.35	42.14	4.1 ± 0.4	0.50 ± 0.02	22 ± 4
o-xileno	3.13	4.71	0.71 ± 0.4	0.120 ± 0.07	17 ± 1
Nitrobenceno	1.85	1140.32	26 ± 3	2.0 ± 0.1	30 ± 20
Naftaleno	3.36	57.01	4.4 ± 0.6	0.65 ± 0.02	61 ± 9

En la Tabla 12 aparecen reflejados los valores de J obtenidos para cada HAPs evaluado a través de membranas Strat-M®, teniendo resultados en el intervalo de $0.057\text{-}2.0 \mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$, así como los valores de t_{lag} , comprendidos entre tiempos inferiores a 10 minutos y 69 minutos. Hay que destacar que los principales parámetros físicoquímicos que afectan a los parámetros de absorción dérmica (J, t_{lag} y permeabilidad en el equilibrio) de los HAPs evaluados están relacionados con su peso molecular y su coeficiente de partición octanol-agua (K_{OW}).^{306, 307} En el caso de los VOCs, como los compuestos evaluados, el coeficiente de partición estrato córneo-aire (K_{sc_G}), el cual está relacionado directamente con el coeficiente de partición estrato córneo-agua (K_{sc_W}) y con el coeficiente de partición agua-aire (K_{W_G}), es un buen indicador del flujo molecular.

Como K_{sc_W} está directamente relacionado con K_{OW} , y K_{W_G} está relacionado con la constante de Henry (H_{CC}), se puede suponer que para compuestos con K_{OW} similar

³⁰⁴ Agency for Toxic Substances and Disease Registry website, Atlanta, GA, USA. <https://wwwn.cdc.gov/TSP/index.aspx> Acceso abril de 2021.

³⁰⁵ Sander, R. Copilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent. Atmospheric Chemistry and Physics. 2015; 15(8):4399-4981.

³⁰⁶ Vera Fiservoa-Bergerova, T., et Pierce, J. T. Horizons: Biological Monitoring V: Dermal Absorption. Applied Industrial Hygiene. 1989; 4(8):F14-F21.

³⁰⁷ Magnusson, B. M., Anissimov, Y. G., Cross, S. E., et al. Molecular size as the main determinant of solute maximum flux across the skin. Journal of Investigative Dermatology. 2004; 122(4):993-999.

(de 1.47 para 1,2-dicloroetano a 3.36 para naftaleno³⁰⁸) el principal parámetro físicoquímico que afecta al flujo dérmico es H_{CC} y, a medida que aumenta la constante de Henry, también aumenta el flujo molecular ($R^2 = 0.92$) (Figura 32).

309,310

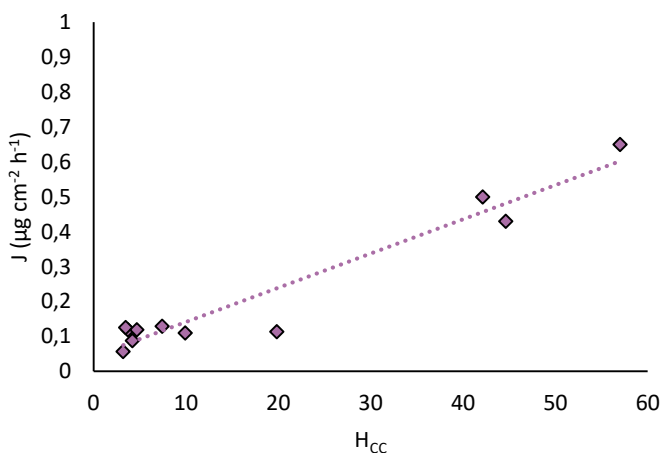


Figura 32. Representación gráfica de la correlación obtenida entre los valores experimentales de J y los valores teóricos de H_{CC} para los HAPs evaluados (exceptuando el nitrobenzeno).

En cuanto a los valores de permeabilidad obtenidos para los diferentes HAPs, cabe señalar que cuanto mayor es la constante de solubilidad de Henry, mayor es la permeabilidad en equilibrio de los analitos en agua. Así, una vez más, el valor de H_{CC} es el principal parámetro físicoquímico que afecta a la permeabilidad en el equilibrio. Como se puede ver en la Figura 31, los compuestos halogenados alcanzaron permeabilidades en el equilibrio (de 0.64 a 4.1 $\mu\text{g cm}^{-2}$), significativamente más altas que las obtenidas para el BTEX (de 0.27 a 0.71 $\mu\text{g cm}^{-2}$). Además, cabe destacar que en los casos del naftaleno y nitrobenzeno

³⁰⁸ Rathbun, R. E. Transport, behavior, and fate of volatile organic compounds in streams. Professional Paper, 1589. 1998.

³⁰⁹ Sander, R. Copilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent. Atmospheric Chemistry and Physics. 2015; 15(8):4399-4981.

³¹⁰ Agency for Toxic Substances and Disease Registry website, Atlanta, GA, USA. <https://wwwn.cdc.gov/TSP/index.aspx> Acceso abril de 2021.

se obtuvieron valores de permeabilidad de 4.4 y 26 $\mu\text{g cm}^{-2}$ respectivamente, lo que puede atribuirse a sus elevados valores de H_{cc} de 57 y 1140, respectivamente.

Con estos resultados se demuestra la validez de la cámara de simulación desarrollada para la realización de experimentos de absorción dérmica de VOC y semiVOCs en condiciones de dosis infinita.

4. Evaluación de la efectividad de materias primas y cosméticos antipolución frente a HAPs

Una vez estudiado el comportamiento de los HAPs en el interior de la cámara de simulación, se procedió a evaluar la efectividad de varios cosméticos antipolución y materias primas empleadas en su desarrollo, en condiciones de dosis infinitas.

Para evaluar la efectividad antipolución de diferentes productos cosméticos, en las condiciones de la cámara de simulación mencionadas anteriormente (Tabla 10), se han realizado varios ensayos independientes a tres tiempos de exposición (2, 4 y 24 h). A todos ellos se les ha aplicado 2 mg de producto sobre la parte superior de la membrana Strat-M® y se han introducido dispositivos de control en los que no se ha aplicado producto cosmético. En el caso de materias primas, para poder aplicarlas sobre la membrana de forma homogénea, éstas se han mezclado con glicerina al % de efectividad indicado por cada fabricante. A continuación, se ha evaluado la efectividad antipolución de las mismas en condiciones de dosis infinitas (Tabla 10). En todos los casos, se han realizado tres experimentos independientes. En la Figura 33, se muestra a modo de ejemplo los resultados obtenidos para uno de los tipos de materias primas evaluadas, los aceites.

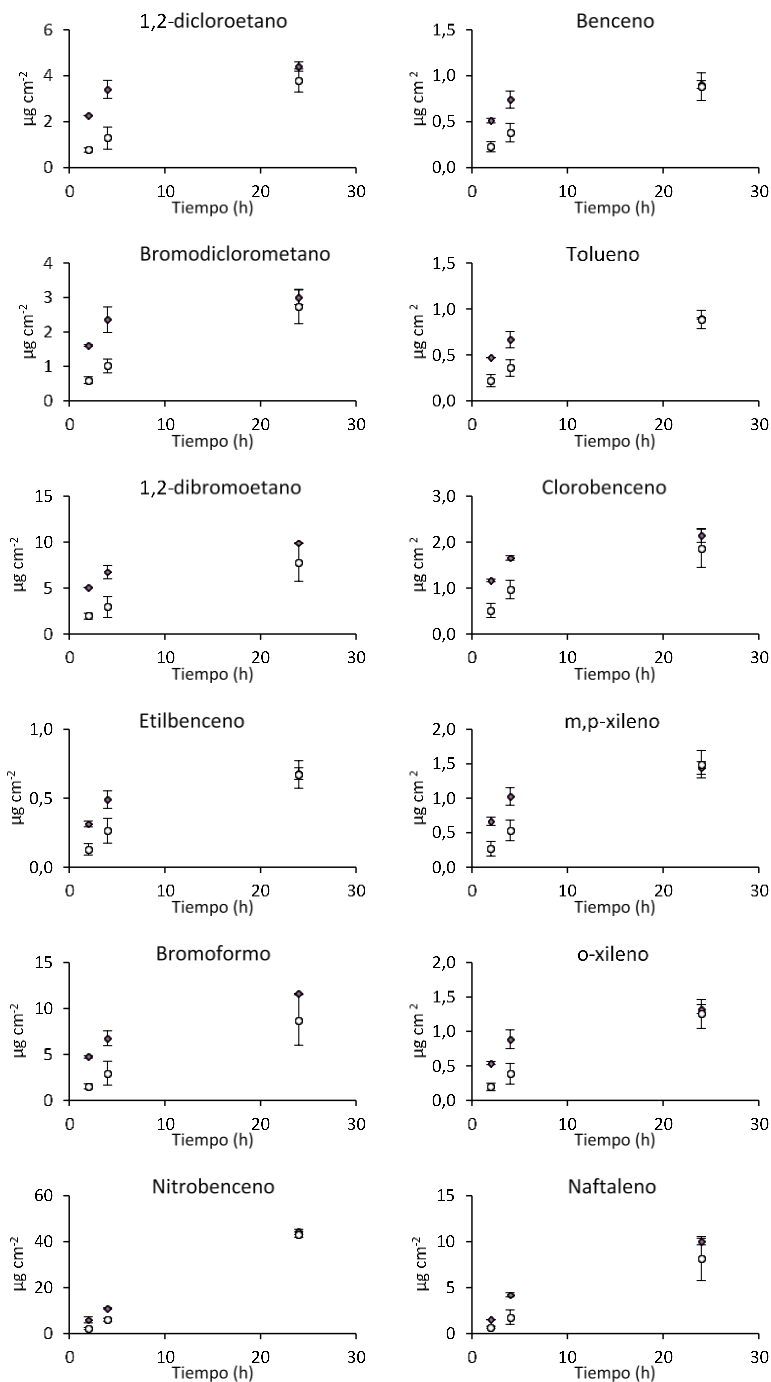


Figura 33. Efectividad en la reducción de la permeabilidad cutánea de los HAPs evaluados para el caso de uno de los aceites estudiados, representando los resultados obtenidos para las muestras control (marcadores violetas) y las muestras de cosmético (marcadores blancos).

Tabla 13. Diferencias de la permeabilidad cutánea entre controles y muestras de uno de los aceites estudiados, de los HAPs evaluados expresadas en % obtenidas a distintos tiempos de exposición.

Aceite			
Diferencia en % exposición			
Analitos	Tiempo 2h	Tiempo 4h	Tiempo 24h
1,2-dicloroetano	66 ± 4	62 ± 14	0
Benceno	55 ± 11	48 ± 13	0
Bromodichlorometano	63 ± 6	57 ± 12	0
Tolueno	53 ± 14	46 ± 18	0
1,2-dibromoetano	62 ± 6	56 ± 15	0
Clorobenceno	56 ± 13	41 ± 13	0
Etilbenceno	59 ± 13	46 ± 19	0
m,p-xileno	60 ± 16	48 ± 18	0
Bromoformo	68 ± 6	56 ± 19	0
o-xileno	64 ± 10	57 ± 18	0
Nitrobenceno	65 ± 8	45 ± 6	0
Naftaleno	54 ± 7	58 ± 19	0
Media	57	50	0

A partir de dichos resultados, se han obtenido las diferencias en porcentaje de la permeabilidad de los HAPs entre los dispositivos control y los de las diferentes materias primas evaluadas. En este caso en concreto, donde se evaluó uno de los aceites, las diferencias de permeabilidad para cada uno de los HAPs evaluados a distintos tiempos de exposición, quedan recogidas en la Tabla 13. Así, se puede observar una protección superior al 50 % durante las primeras 2 h de exposición, y en este caso en concreto, transcurridas 4 h de exposición esta efectividad se mantiene por encima del 40 %. En la Tabla 14 se resumen los resultados más relevantes obtenidos para los diferentes tipos de materias primas evaluadas.

Tabla 14. Resultados obtenidos para los análisis de la efectividad antipolución de diferentes tipos de materias primas.

Familia	Función	Resultados
Extractos vegetales	Actividad protectora de las células germinales de la piel, evita los daños producidos por la contaminación potenciando las defensas naturales de las células. <i>Excepción:</i> extracto rico en polisacárido inulina.	No ha demostrado ser eficaz frente a ninguno de los HAPs estudiados. Excepción: protecciones superiores al 50 % para la mayoría de HAPs durante 2 h, desapareciendo esta protección a tiempos mayores.
Péptidos	Bloqueo de la unión de los VOCs con los receptores arilo. Dicha unión activa rutas metabólicas relacionadas con un aumento del estrés oxidativo, aumento de la inflamación y glicación.	En el caso de péptidos sintéticos de propiedad antioxidante, se muestra una protección inferior al 50 % para la mayoría de VOCs analizados a 2 y 4 h.
Polisacáridos	Creación de un film sobre la piel que minimiza la absorción de los contaminantes.	Proporciona protecciones superiores al 50 % a 2 h de exposición. La protección va disminuyendo al aumentar el tiempo de exposición, siendo efectivo en algunos casos a las 4 h de exposición.
Aceites	Formación de una capa sobre la piel impidiendo la fijación de la polución.	Para la mayoría de los VOCs proporciona protecciones superiores al 50 % durante 2 h y para periodos superiores mantiene protecciones superiores al 30 %.
Filtros solares	Protección contra la radiación UV.	Protección media-alta frente a la mayoría de los VOCs evaluados durante 2 y 4 h de exposición.
Activos naturales	Se ha estudiado un activo que forma complejos acuosos que recubren las células y las protege de la contaminación.	No muestra una protección superior al 50 % para ninguno de los VOCs analizados. La mayor protección la muestra durante 2 h de exposición perdiendo efectividad con el paso del tiempo.
	Activo con propiedad antimanchas (sustancia pura aislada de la salvia).	Protección media durante los primeros tiempos de exposición, pero pierde efectividad con el tiempo
Activos sintéticos	Clasificado como protector de la piel frente a factores externos.	Se observa una efectividad, para la mayoría de los VOCs, cercana al 70 % durante 2 h de exposición, a medida que aumenta el tiempo de exposición se va perdiendo efectividad.

Nota: Es posible que alguna de las materias primas analizadas esté compuesta por una mezcla de ingredientes, en este caso al efecto antipolución de los ingredientes activos se debe sumar el posible efecto generado por alguno/s de los otros componentes.

Teniendo en cuenta los resultados de la Tabla 14, los extractos vegetales han demostrado ser los activos menos eficaces frente a la absorción dérmica de los

HAPs evaluados que el resto de las materias primas estudiadas. Se ha observado que la protección frente al nitrobenzeno, en general es baja o nula, siendo el más eficaz el filtro solar. En definitiva, de los resultados obtenidos se puede concluir que ninguno de los activos analizados es capaz de bloquear, por sí mismo, la absorción dérmica de los HAPs evaluados, pero es posible que la combinación de estos activos, filtros solares, antioxidantes y polisacáridos, junto con otros compuestos formadores de barrera, reduzcan la absorción dérmica de contaminantes atmosféricos.

Las Figuras 34 y 35 muestran, a modo de ejemplo, la permeabilidad obtenida para los HAPs estudiados, en los dispositivos de control (marcadores morados) y en aquellos en que se ha aplicado el cosmético cremigel antiedad y agua mist (marcadores blancos), respectivamente.

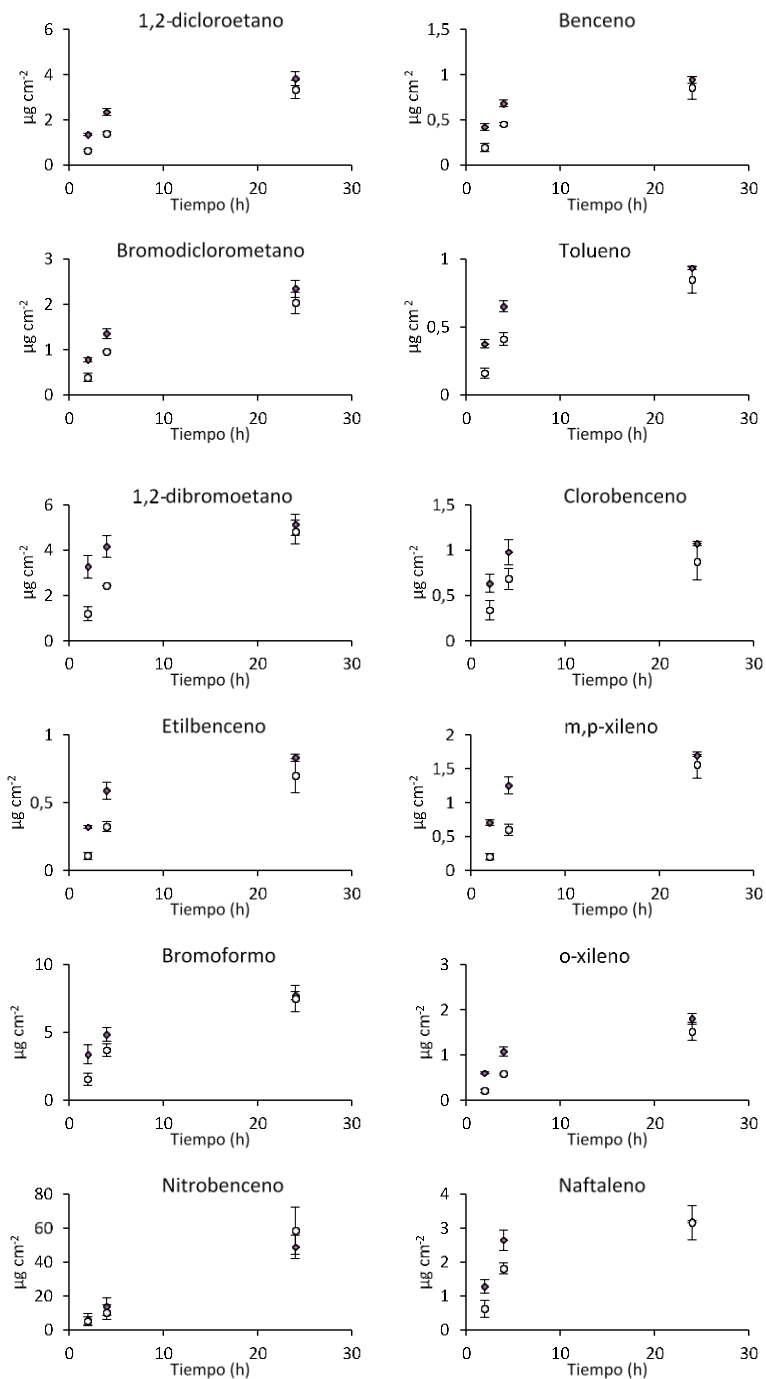


Figura 34. Efectividad en la reducción de la permeabilidad cutánea de los HAPs evaluados para un cremigel antiedad, representando los resultados obtenidos para las muestras control (marcadores violetas) y las muestras de cosmético (marcadores blancos).

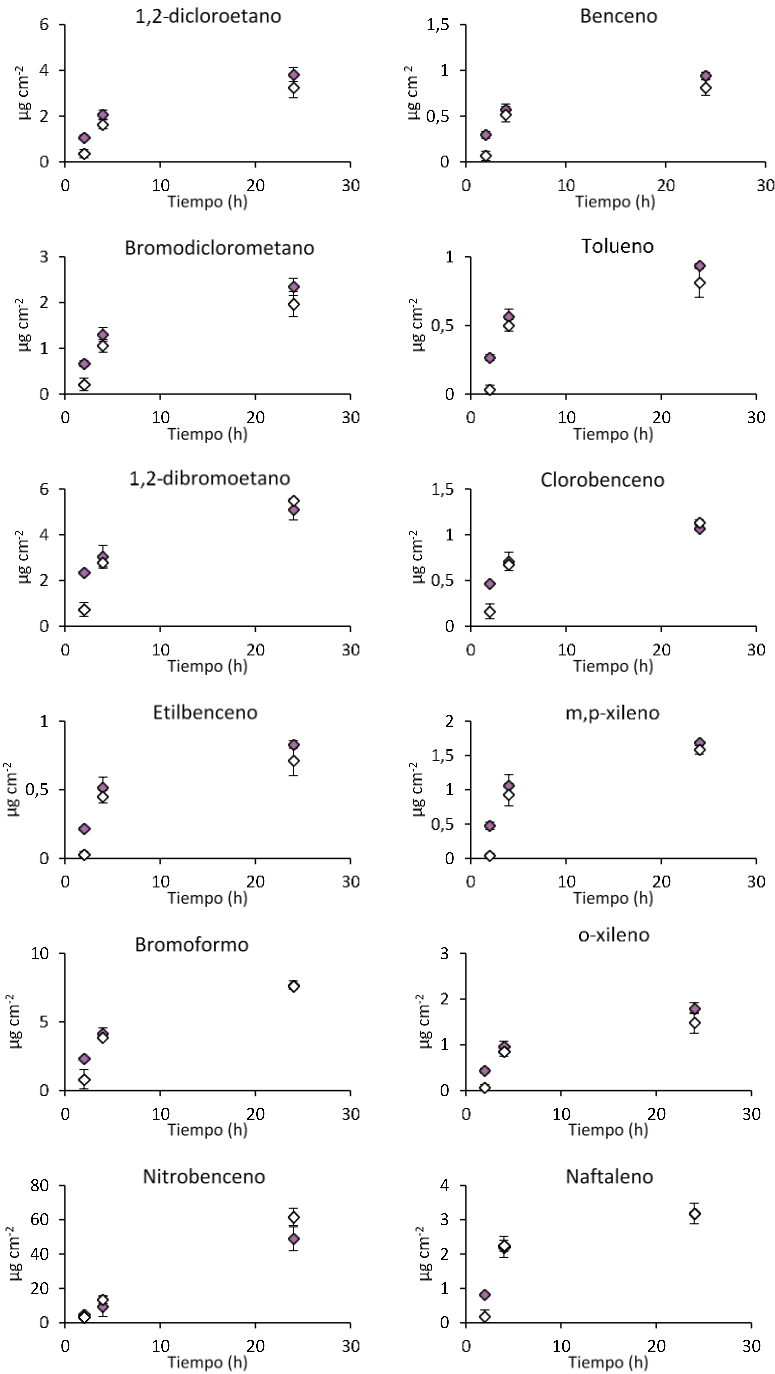


Figura 35. Efectividad en la reducción de la permeabilidad cutánea de los HAPs evaluados para un agua mist, representando los resultados obtenidos para las muestras control (marcadores violetas) y las muestras de cosmético (marcadores blancos).

Así pues, se han obtenido las diferencias en porcentaje de la permeabilidad de los HAPs entre los dispositivos control y los de los diferentes productos cosméticos evaluados. A modo de ejemplo, en las Tablas 15 y 16 se muestran las diferencias de permeabilidad de cada uno de los HAPs evaluados a distintos tiempos de exposición, obtenidas para el Cremigel antiedad y el Agua mist, respectivamente.

Tabla 15. Diferencias de la permeabilidad cutánea entre controles y muestras de Cremigel antiedad, de los HAPs evaluados expresadas en % obtenidas a distintos tiempos de exposición.

Cremigel antiedad			
Diferencia en % exposición			
Analitos	Tiempo 2h	Tiempo 4h	Tiempo 24h
1,2-dicloroetano	52 ± 4	40 ± 3	0
Benceno	54 ± 11	34 ± 3	0
Bromodichlorometano	50 ± 12	29 ± 1	0
Tolueno	57 ± 10	37 ± 7	0
1,2-dibromoetano	64 ± 9	42 ± 2	0
Clorobenceno	47 ± 17	30 ± 12	0
Etilbenceno	67 ± 8	45 ± 6	0
m,p-xileno	71 ± 7	52 ± 7	0
Bromoformo	54 ± 13	24 ± 9	0
o-xileno	66 ± 7	46 ± 2	0
Nitrobenceno	0	0	0
Naftaleno	51 ± 19	31 ± 6	0
Media	52	34	0

Tabla 16. Diferencias de la permeabilidad cutánea entre controles y muestras de Agua mist, de los HAPs evaluados expresadas en % obtenidas a distintos tiempos de exposición.

Agua mist			
Diferencia en % exposición			
Analitos	Tiempo 2h	Tiempo 4h	Tiempo 24h
1,2-dicloroetano	66 ± 17	0	0
Benceno	75 ± 12	0	0
Bromodichlorometano	68 ± 19	0	0
Tolueno	80 ± 10	0	0
1,2-dibromoetano	73 ± 9	0	0
Clorobenceno	64 ± 15	0	0
Etilbenceno	86 ± 13	0	0
m,p-xileno	79 ± 15	0	0
Bromoformo	62 ± 18	0	0
o-xileno	71 ± 18	0	0
Nitrobenceno	0	0	0
Naftaleno	80 ± 20	0	0
Media	67	0	0

A modo de resumen, en la Tabla 17 se muestran la media de las diferencias de permeabilidad de los HAPs estudiados obtenidas para cada uno de los productos cosméticos evaluados, a distintos tiempos de exposición.

Tabla 17. Efectividad antipolución expresada como diferencia de permeabilidad cutánea media entre controles y muestras de cosméticos, de los HAPs evaluados a distintos tiempos de exposición.

	Diferencia en % exposición		
	Tiempo 2h	Tiempo 4h	Tiempo 24h
Crema hidratante antiarrugas	5	0	0
Mascarilla	30	46	5
Serum	34	2	0
Crema con SPF medio	44	7	0
Cremigel antiedad	52	34	0
Crema facial	62	69	19
Agua mist	67	0	0
Crema SPF medio con activo antipolución	92	89	0

Teniendo en cuenta estos resultados, se puede observar que algunas formulaciones prácticamente no poseen efectividad antipolución como es el caso de la Crema hidratante antiarrugas. Por otro lado, otras formulaciones como es el caso del Agua mist, poseen elevada efectividad antipolución durante las 2 primeras horas de exposición, sin embargo, esta efectividad desaparece transcurridas 4 h. Otras formulaciones son capaces de mantener su efectividad antipolución durante al menos 4 h, como es el caso de la Crema SPF medio con activo *antipolución*, o la Crema facial donde incluso transcurridas 24 h se observa que aún posee efectividad, aunque mucho menor que durante las primeras horas de exposición. Por tanto, a la hora de determinar la efectividad antipolución de un cosmético, es necesario evaluar tanto su capacidad para evitar que los contaminantes atraviesen la piel como su capacidad para mantener dicha efectividad a lo largo del tiempo.

Tras tener una visión general de la efectividad de las materias primas y los cosméticos antipolución evaluados, se decidió realizar un estudio en profundidad, donde se obtuvieron los perfiles de absorción completos (0.5-24 h), para dos de estos cosméticos: Crema con SPF medio (A) y Crema SPF medio con activo antipolución (B).

Previamente, se determinaron las propiedades fisicoquímicas (viscosidad, densidad, pH, conductividad e índice de refracción) de los cosméticos antipolución evaluados (Tabla 18). La viscosidad es un parámetro importante para los cosméticos antipolución ya que una viscosidad elevada se encuentra asociada a una composición rica en principios activos o factores de consistencia. Por otro lado, una viscosidad baja podría generar problemas de disolución y absorción del producto. Como se puede observar en la Tabla 18, el cosmético B tiene una viscosidad comprendida entre 3.95 y 4.95 Pa s⁻¹, mientras que el cosmético A posee una viscosidad inferior, entre 2.53 y 3.53 Pa s⁻¹.

Tabla 18. Propiedades fisicoquímicas de los cosméticos antipolución evaluados.

	SPF medio (A)	SPF medio con activo antipolución (B)
Viscosidad (Pa s⁻¹)	2.53-3.53	3.95-4.95
Densidad (g cm⁻³)	1.0158-1.0258	1.0136-1.0236
pH	6-7	6-7
Conductividad (μS cm⁻¹)	377-701	1888-2832
Índice de refracción (n_D)	1.3748-1.3948	1.3999-1.4199

La densidad de ambos cosméticos es similar, teniendo valores entre 1.01 y 1.03 g cm⁻³, siendo un valor normal para este tipo de formulaciones. Puesto que estas cremas se aplican directamente sobre la piel, es preferible que posean un pH similar al de ésta. Según literatura, se han obtenido valores de pH ácido para la piel comprendidos en el rango de pH de 4.0 a 7.0.³¹¹ Como se puede observar en la Tabla 18, ambos cosméticos poseen un pH ácido con valores comprendidos entre 6 y 7.

La conductividad generalmente se emplea para determinar el tipo de emulsión y estimar la estabilidad de la misma. Valores altos de conductividad (>50 μS cm⁻¹) indican emulsiones de aceite/agua, mientras que valores bajos de conductividad (<1 μS cm⁻¹) indican emulsiones agua/aceite.³¹² Los valores de conductividad obtenidos para los cosméticos evaluados aparecen en la Tabla 18. Como puede verse, el cosmético A (377-701 μS cm⁻¹) posee una menor conductividad que el B (1888-2832 μS cm⁻¹), siendo ambas emulsiones aceite/agua. En cuanto al índice de

³¹¹ Lambers, H. Piessens, S., Bloem, A., et al. Natural skin Surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *International Journal of Cosmetic Science*. 2006; 28(5):359-370.

³¹² Jiang, J., Mei, Z., Xu, J., et al. Effect of inorganic electrolytes on the formation and the stability of water-in-oil (W/O) emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2013; 429(20):82-90.

refracción, se puede observar que ambas formulaciones poseen valores comprobables en el rango de 1.37-1.42.

La evaluación de la efectividad antipolución de estos dos cosméticos se llevó a cabo a una concentración teórica de $15 \mu\text{g L}^{-1}$ de HAPs en el interior de la cámara de simulación. Para ello, se ajustó el flujo de aire seco a 3 L min^{-1} , y se empleó una disolución de HAPs en acetona al 0.9 % (p/v) a un flujo de $5.0 \mu\text{L min}^{-1}$. Para determinar la concentración real de HAPs en el interior de la cámara de simulación se realizó por muestreo activo. Además, dicha concentración se comparó con la obtenida mediante la ley de Henry una vez se alcanza el equilibrio entre la fase donadora y aceptora. Como se puede observar en la Tabla 19, todos estos valores se encuentran en el mismo rango que las concentraciones teóricas, con concentraciones de $12\text{-}15 \mu\text{g L}^{-1}$ y $8\text{-}14 \mu\text{g L}^{-1}$, excepto para el caso del nitrobenzono para el que se obtuvieron concentraciones de $4\text{-}3 \mu\text{g L}^{-1}$, para medidas mediante muestreo activo y empleando la ley de Henry, respectivamente.

Tabla 19. Concentraciones obtenidas mediante muestreo activo, y empleando la ley de Henry.

HAPs	[HAPs] ($\mu\text{g L}^{-1} \pm s$)	
	Muestreo activo	Ley de Henry
1,2-dicloroetano	15 ± 3	12 ± 3
Benceno	12 ± 3	9 ± 1
Bromodiclorometano	14 ± 3	11 ± 1
Tolueno	12 ± 2	10 ± 1
1,2-dibromoetano	13 ± 3	10 ± 3
Clorobenceno	14 ± 3	12 ± 3
Etilbenceno	13 ± 2	10 ± 1
m,p-xileno	25 ± 4	21 ± 1
Bromoformo	13 ± 4	10 ± 4
o-xileno	14 ± 3	14 ± 2
Nitrobenzono	3 ± 1	4 ± 2
Naftaleno	12 ± 3	8 ± 3

Para evaluar la efectividad de dos cosméticos antipolución se realizaron experimentos de control empleando membranas Strat-M® sin cosmético, así como muestras con cosmético a las que se les adicionó de forma homogénea 2 mg de cosmético en la cara expuesta a la atmósfera contaminada de las membranas Strat-M®. Así, se introdujeron las celdas de Franz modificadas para controles y

cosméticos en el interior de la cámara de simulación durante distintos tiempos de exposición comprendidos entre 0.5 y 24 h. Transcurridos dichos tiempos de exposición se fueron sacando los dispositivos de migración del interior de la cámara para el posterior análisis de las disoluciones receptoras mediante GC-MS. Hay que destacar que para cada tiempo de exposición se evaluaron 10 muestras: 1 blanco, 3 controles, 3 muestras del cosmético A y 3 muestras del cosmético B.

La Figura 36 muestra los perfiles de absorción obtenidos para cada uno de los HAPs evaluados en muestras control y de cosméticos A y B. Se puede observar un aumento lineal para todos los compuestos hasta alcanzar el equilibrio a tiempos superiores a 12 h, lo que corrobora que todos los HAPs evaluados siguen la ley de Fick. Sin embargo, en el caso de los cosméticos evaluados, el equilibrio se alcanza a tiempos superiores a los de los experimentos de control, con un máximo de 18 h.

A partir de estos resultados obtenidos de forma experimental, se calcularon los valores de J de controles y muestras de cosméticos para cada uno de los HAPs evaluados (Tabla 20). Posteriormente, se realizó una prueba t-student para determinar si los valores de J obtenidos para los cosméticos A y B, y el control eran estadísticamente diferentes para un valor de P inferior a 0.05. Como se puede observar, los valores de J obtenidos para el cosmético A son significativamente inferiores a los obtenidos para controles. Sin embargo, los valores de J obtenidos para el cosmético B son significativamente inferiores a los obtenidos para el cosmético A y las muestras control. Esto indica que ambos cosméticos poseen efectividad antipolución. Sin embargo, los valores de flujo menores obtenidos para B indican una mayor efectividad que el cosmético A, ya que valores de flujo menores indican una reducción de la cantidad de HAPs absorbidos por unidad de tiempo.

En la Tabla 21 se muestran los valores de t_{lag} obtenidos para muestras control y de cosméticos. Como se puede ver, los valores de t_{lag} para el cosmético A son similares a los del control, teniendo valores de t_{lag} inferiores a 10 min para todos los analitos evaluados. Sin embargo, los valores de t_{lag} obtenidos para el cosmético B son significativamente más altos que los de la muestra control, con valores comprendidos entre 33 y 74 min, lo que demuestra una mayor efectividad antipolución, ya que provoca un aumento del tiempo que tardan los HAPs evaluados en alcanzar la disolución receptora.

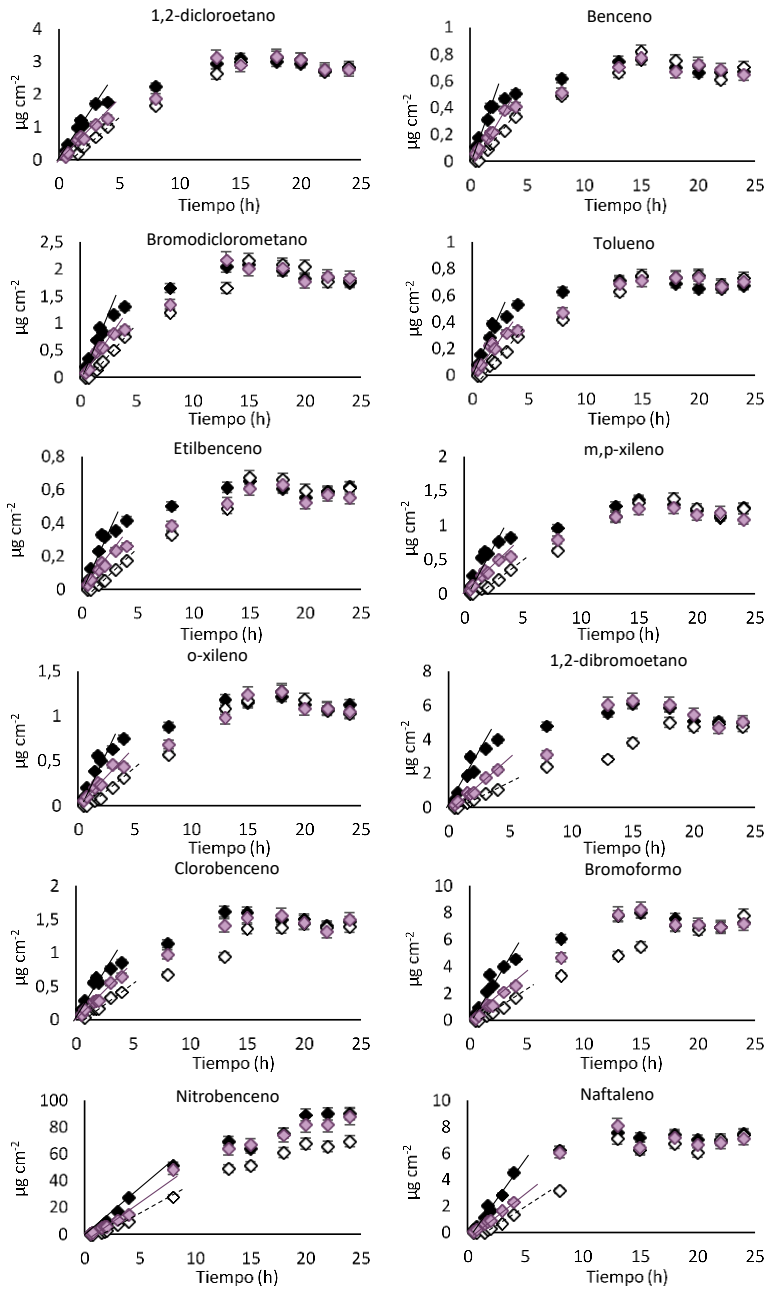


Figura 36. Perfiles de absorción obtenidas para los HAPs estudiados a concentraciones en aire comprendidas entre $3\text{-}15 \mu\text{L}^{-1}$ en controles (marcadores negros), y muestras de cosméticos A (marcadores violetas) y B (marcadores blancos)

Tabla 20. Concentración de HAPs en la cámara de simulación y flujos (J) obtenidos experimentalmente para controles y muestras de cosméticos SPF medio (A) y SPF medio con activo antipolución (B), y comparación t-student.

HAPs	[HAPs] ($\mu\text{g L}^{-1} \pm s$)	J ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1} \pm s$)					
		Control	Cosmético A	t-test ^a	Cosmético B	t-test ^a	t-test ^a (cosmético A-B)
1,2-dicloroetano	15 ± 3	0.566 ± 0.007	0.48 ± 0.01	17.258	0.324 ± 0.009	51.990	28.403
Benceno	18 ± 3	0.140 ± 0.006	0.118 ± 0.005	6.900	0.099 ± 0.003	14.971	7.982
Bromodichloroetano	14 ± 3	0.377 ± 0.006	0.30 ± 0.01	15.543	0.243 ± 0.009	30.345	10.378
Tolueno	12 ± 2	0.138 ± 0.008	0.10 ± 0.01	7.268	0.084 ± 0.009	10.985	2.913
1,2-dibromoetano	13 ± 3	1.2 ± 0.2	0.6 ± 0.1	6.573	0.33 ± 0.02	6.573	4.677
Clorobenceno	14 ± 3	0.24 ± 0.04	0.17 ± 0.02	3.834	0.13 ± 0.02	6.025	3.464
Etilbenceno	13 ± 2	0.114 ± 0.005	0.075 ± 0.002	17.740	0.056 ± 0.005	20.092	8.642
m,p-xileno	25 ± 4	0.25 ± 0.04	0.18 ± 0.06	2.378	0.11 ± 0.02	7.668	2.711
Bromoforno	13 ± 4	1.4 ± 0.3	0.7 ± 0.1	5.422	0.5 ± 0.2	5.978	3.944
o-xileno	14 ± 3	0.21 ± 0.02	0.15 ± 0.03	4.076	0.10 ± 0.01	12.050	3.873
Nitrobenceno	3 ± 1	5.1 ± 0.3	4.0 ± 0.1	8.521	3.5 ± 0.2	10.870	5.477
Naftaleno	12 ± 3	1.1 ± 0.1	0.6 ± 0.1	8.660	0.45 ± 0.05	14.241	3.286

^a Valor de t-crítico igual a 2.230 (n = 10).

Tabla 21. Valores de t_{lag} obtenidos experimentalmente para cada uno de los HAPs evaluados en controles y muestras de cosméticos SPF medio (A) y SPF medio con activo antipolución (B).

HAPs	t_{lag} (min \pm s)			t-test ^a
	Control	Cosmético A	Cosmético B	
1,2-dicloroetano	< 10	< 10	50 \pm 5	14.237
Benceno	< 10	< 10	37 \pm 3	21.362
Bromodiclorometano	< 10	< 10	54 \pm 6	14.347
Tolueno	< 10	< 10	39 \pm 3	19.106
1,2-dibromoetano	< 10	< 10	41 \pm 4	3.431
Clorobenceno	< 10	< 10	33 \pm 8	6.713
Etilbenceno	< 10	< 10	53 \pm 5	20.428
m,p-xileno	< 10	< 10	50 \pm 7	11.521
Bromoformo	< 10	< 10	50 \pm 6	3.789
o-xileno	< 10	< 10	55 \pm 6	17.249
Nitrobenceno	< 10	< 10	60 \pm 30	3.757
Naftaleno	< 10	< 10	71 \pm 7	10.379

^a Valor de t-crítico igual a 2.230 (n = 10).

Según bibliografía científica, se ha demostrado que los surfactantes y los materiales poliméricos formadores de barrera aumentan notablemente la efectividad antipolución frente a compuestos orgánicos.³²⁴ El cosmético antipolución B tiene un total de factores de consistencia en su composición, principalmente poliacrilatos, estearatos de glicerilo y polímeros céreos hidrófobos, de 3.02 % p/p, frente al 1 % del cosmético A. Esta diferencia de factores de consistencia supone diferencias significativas en la viscosidad (Tabla 18) pero también en la efectividad antipolución frente a compuestos orgánicos (Tablas 20 y 21). En este sentido, cabe destacar que el porcentaje de dimeticona (polidimetilsiloxano) utilizado como emoliente en la fórmula es también mayor (6.0 % p/p) en el cosmético antipolución B que en el A (3.0 % p/p). El polidimetilsiloxano se ha empleado previamente como simulante sintético de piel para la realización de experimentos de absorción dérmica, donde se demuestra que al aumentar el grosor de la membrana de PDMS disminuye J y aumenta el t_{lag} (Tabla 8). Por tanto, cabía esperar que la presencia de un mayor porcentaje de PDMS en la fórmula cosmética aumente su efectividad antipolución. De manera que las diferencias de factores de consistencia son

³²⁴ Mistry, N. Guidelines for Formulating Anti-Pollution Products. Cosmetics. 2017; 4 (57): 1-16.

responsables de las diferencias en la efectividad antipolución de los cosméticos evaluados frente a compuestos orgánicos.

Por otro lado, la adición de polisacáridos de elevado peso molecular, como la goma xantana (principio activo antipolución con efectos demostrados contra la adsorción de compuestos orgánicos³²⁵), al cosmético B provoca un aumento de la efectividad antipolución. Además, la presencia de partículas minerales en los cosméticos antipolución, como el talco o los silicatos, adsorbe compuestos orgánicos en su superficie,³²⁶ lo que aumentaría el efecto antipolución de los productos cosméticos.

El porcentaje de talco o silicatos en el cosmético B es superior al de A, lo que podría explicar la mayor efectividad de este producto en comparación con A. En resumen, la combinación de todos los compuestos mencionados proporciona un efecto antipolución demostrado al cosmético B, superior al del cosmético A y claramente superior a la aplicación de productos cosmético convencionales.

5. Evaluación de la cámara de simulación en condiciones de dosis finitas

Como se ha comentado en el Capítulo 1: Introducción y antecedentes de esta Tesis Doctoral, los estudios de absorción dérmica pueden realizarse en condiciones de dosis infinitas o finitas. Se ha demostrado que la cámara de simulación de atmósferas contaminadas resulta adecuada para la realización de estudios de absorción dérmica en condiciones de dosis infinitas. Para poder realizar estudios de absorción dérmica en condiciones de dosis finitas, la configuración de la cámara de simulación debe adecuarse a las nuevas condiciones experimentales. En condiciones finitas, los contaminantes atmosféricos no son introducidos en el interior de la cámara de forma constante, sino que su concentración varía en el interior de la cámara durante la evolución del experimento. Para demostrar la adaptabilidad de la cámara de simulación a diferentes situaciones se ha seleccionado un caso concreto de atmósfera contaminada en situaciones finitas como es el de la atmosfera generada durante la combustión de un cigarrillo. Las modificaciones introducidas en la cámara de simulación son las siguientes: se ha

³²⁵ Mistry, N. Guidelines for Formulating Anti-Pollution Products. *Cosmetics*. 2017; 4 (57): 1-16.

³²⁶ Hashizume, H. Adsorption of aromatic compounds in water by talc. *Clay Science*. 2009; 14:61-64.

eliminado la línea de introducción de los contaminantes en disolución, manteniendo la entrada de aire limpio y seco. Se ha introducido en el interior de la cámara de simulación una máquina de fumar para llevar a cabo el proceso de combustión de los cigarrillos.

Por otra parte, para tener un control de las variaciones en diferentes parámetros experimentales en el interior de la cámara de simulación en condiciones de dosis finitas se han introducido en el interior varios sensores para evaluar la temperatura, humedad, óxidos de carbono, VOCs y partículas durante el transcurso del experimento.

5.1. Diseño y desarrollo de una máquina de fumar

Para la introducción de contaminantes orgánicos procedentes del humo de tabaco, se desarrolló una máquina de fumar. Para ello se empleó una mini bomba de vacío de diafragma, con un flujo de 5.5 L min^{-1} , situada en el exterior de la cámara de simulación. Se conectó a tres cigarrillos, los cuales se encuentran en el interior de la cámara, mediante conectores de 3 vías y tubos de silicona de 10 mm de diámetro interno, así como una trampa de vacío. Este sistema permite realizar cambios de cigarrillos a través del orificio abierto de la cámara de simulación cuando sea necesario (Figura 37). El humo inhalado se hace fluir a través de una trampa de vacío y se reintroduce hacia el interior de la cámara.

Esta máquina de fumar puede ser utilizada en estudios de absorción dérmica en condiciones de dosis finitas. En este caso, se enciende la máquina de fumar y se consumen los tres cigarrillos simultáneamente, en un tiempo aproximado de 10 minutos.

La máquina de fumar también puede generar atmósferas contaminadas en condiciones semi-infinitas, en los que se encienden tres cigarrillos cada 30 minutos, durante un período de 8 h.

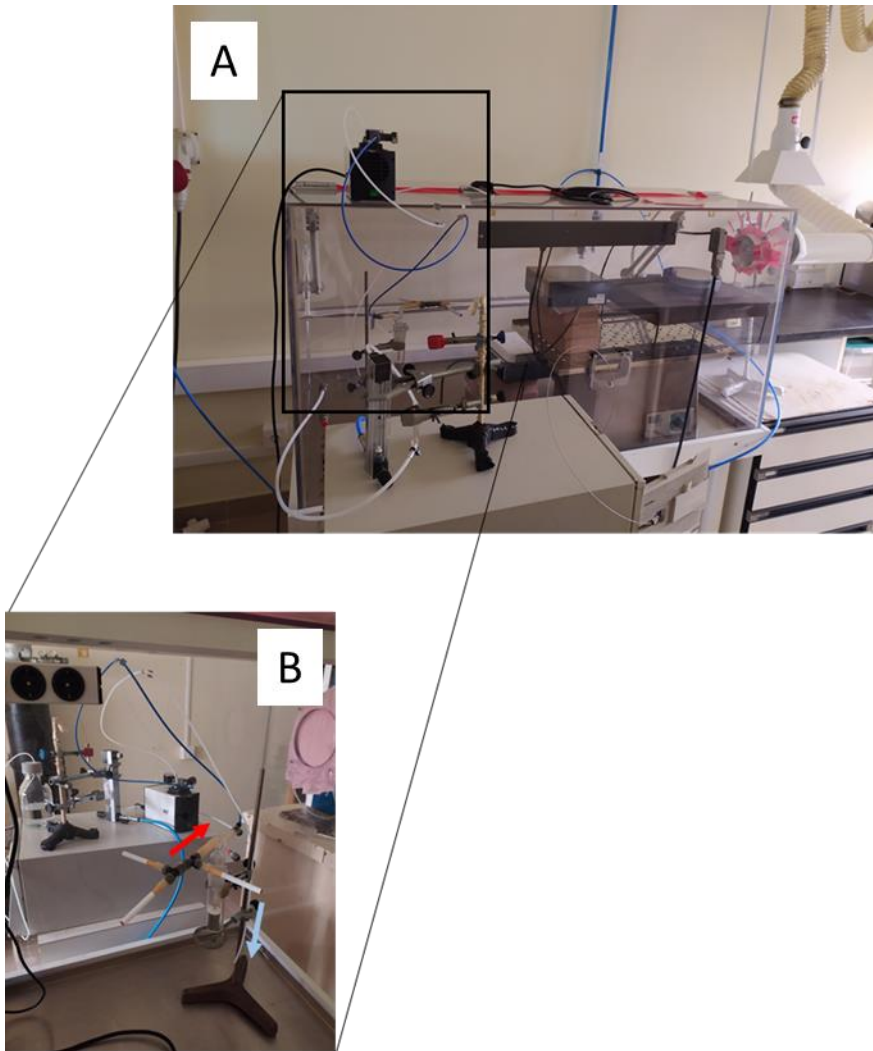


Figura 37. Fotografía de la cámara de simulación modificada (A), y ampliación de la máquina de fumar (B) donde se indica el lugar a través del cual se produce la absorción de aire (flecha roja) para el consumo de los cigarrillos, y la reintroducción del mismo hacia el interior de la cámara (flecha azul).

5.2. Identificación de compuestos orgánicos presentes en el humo de tabaco en el interior de la cámara de simulación

El objetivo de este estudio no es proporcionar una lista completa de los compuestos orgánicos del humo del tabaco, sino demostrar la utilidad de la cámara de simulación para generar una atmósfera contaminada que representa una situación cercana a la real. En este sentido, en la Tabla 22 se muestra una lista de compuestos orgánicos identificados tras realizar muestreo activo de la atmósfera simulada durante la combustión simultánea de tres cigarrillos, empleando la máquina de fumar desarrollada. La identificación de compuestos orgánicos se ha realizado mediante TD-GC-MS, comparando los espectros de MS obtenidos con los de la Biblioteca de espectros de masas del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, Gaithersburg, MA, Estados Unidos), que contiene más de 300 000 espectros de MS de compuestos orgánicos. Además, el tiempo de retención de los picos identificados se comparó con el de los patrones preparados con este objetivo. Como puede verse, la lista incluye isopreno, benceno y compuestos aromáticos relacionados, piridina, anilina, estireno, terpenos, nicotina y PAHs. De estos compuestos, se realizó una selección de 15 compuestos representativos para estudios posteriores, donde se incluyen benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX), clorobenceno, estireno, p-cimeno, limoneno, naftaleno, nicotina, acenaftileno, 2-metilantraceno y 1-metilfenantreno.

Tabla 22. Tiempo de retención e iones seleccionados de los analitos procedentes del humo de tabaco identificados en el interior de la cámara de simulación.

t _r (min)	m/z	Analitos identificados
1.61	43	Isopreno
1.95	55, 56	1-nitropentano
2.02	41, 43	Trans ciclopent-1-en-3,5-diol 2,3-metilfurano
2.30	77,78	1,4-ciclohexadieno
2.52	77,78	Benceno
2.82	43,55	2-metil-4-pentalen Tetrahydro-4-metil-3-metilenfurano
2.99	43, 79	5-metil-1-hexin 4-isopropilciclohexanol
3.08	95, 98	2,5-dimetilfurano
3.40	65, 66	Fenol
3.76	91	1-(1,3-butadienil)-2-vinilciclobutano [(ciclohex-1-en-3-il)metil]benceno

*Continuación de la Tabla 22

t_R (min)	m/z	Analitos identificados
3.99	79	Piridina
4.21	68	5,5'-oxibis[(E)-1,3-pentadieno] t-butil acetileno 1S-(-)-N-(ciclopent-2-en-1-il)hidroxilamina
4.43	91, 92	Tolueno
4.61	77	5,5-dimetilciclopentadieno 1-metilciclohexa-2,4-dieno
4.78		2-[(metilsulfonil)oxi]ciclohexil metanesulfonato 1-bromo-3,4-dimetil-2-penteno
5.15	41	(1-allylciclopropil)metanol 3,3-dimetil-1,6-heptadieno 5-nitro-4-noneno
5.50	94, 110	2-isopropil-furano 3-tert-butil-1,5-ciclooctadieno
6.52	65,92	3-metilpiridina Anilina
6.84	94	2-dimetilaminopiridina
6.84	94	p-Cresol
7.28	95	Furfural
7.55	77, 112	Clorobenceno
8.57	91, 106	Etilbenceno
9.27	91, 106	m,p-xileno
10.62	78, 104	Estireno
10.65	91, 106	o-xileno
12.55	120	o,m,p-etiltolueno 1,2,3-trimetilbenceno
12.65	104	3-vinilpiridina
12.96	120	Isopropilbenceno 1,2,4-trimetilbenceno o,m,p-etiltolueno
13.01	118	E-1-fenilpropeno 2-propenil-benceno 2,3-dihydro-1H-indeno
13.40	91, 117	p-cimeno
13.47	67, 93	dl-limoneno
15.10	128, 129	Naftaleno
16.30	84, 133	Nicotina
17.00	152, 151	Acenaftileno
17.55	41	Nonadecano
18.32	192	2-metilantraceno
19.60	192	1-metilfenantreno
22.82	121	Esqualeno

5.3. Determinación de las condiciones de la cámara de simulación durante los procesos de combustión en condiciones finitas

Se han monitoreado varios parámetros en el interior de la cámara de exposición para evaluar el proceso de combustión durante el experimento, llevado a cabo mediante la combustión de tres cigarrillos, consumidos en 10 min aproximadamente, obteniendo los siguientes resultados (Figura 38). La temperatura y la humedad relativa casi no se vieron afectadas, teniendo valores promedio de 24.8 ± 0.2 °C y 40.1 ± 0.9 %, respectivamente. Los niveles de concentración previos a la combustión de los cigarrillos, de CO, CO₂ y VOCs fueron 0.45, 1045 y 101 mg m⁻³ respectivamente, los cuales aumentan hasta un máximo de 130, 3021 y 8337 mg m⁻³ a 1200 s (20 min), debido a la combustión de los cigarrillos. Con un perfil similar, la concentración previa a la combustión de los cigarrillos, de PM fue de 0.01 mg m⁻³ la cual aumentó hasta 339 mg m⁻³.

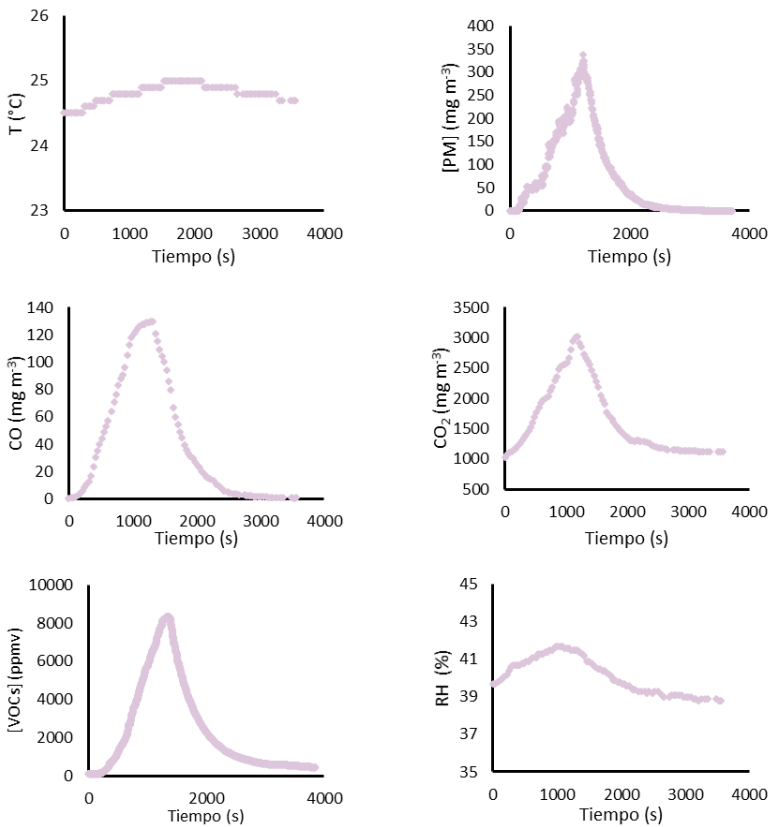


Figura 38. Temperatura, humedad relativa, y perfiles de concentración de CO, CO₂, VOCs, y PM en el interior de la cámara de simulación durante la combustión de tres cigarrillos.

De igual forma, se evaluó la homogeneidad en el interior de la cámara de simulación de la atmósfera generada. Para ello, se llevó a cabo un experimento de absorción dérmica empleando membranas Strat-M® en las celdas de Franz modificadas colocadas en diferentes ubicaciones en el interior de la cámara (cada una de las esquinas y el centro de la cámara), y consumiendo 3 cigarrillos simultáneamente empleando la máquina de fumar (Figura 39). Se obtuvo una concentración media de $13.9 \pm 1.3 \mu\text{g L}^{-1}$ de nicotina en la disolución receptora determinada mediante LC-MS-MS, con una precisión establecida como % RSD inferior al 10 %. Así, la presencia de los ventiladores eléctricos en el interior de la cámara, aseguró una homogeneización total de la atmósfera interior, siendo adecuada para realizar estudios de absorción dérmica en cualquier posición de la cámara de simulación.

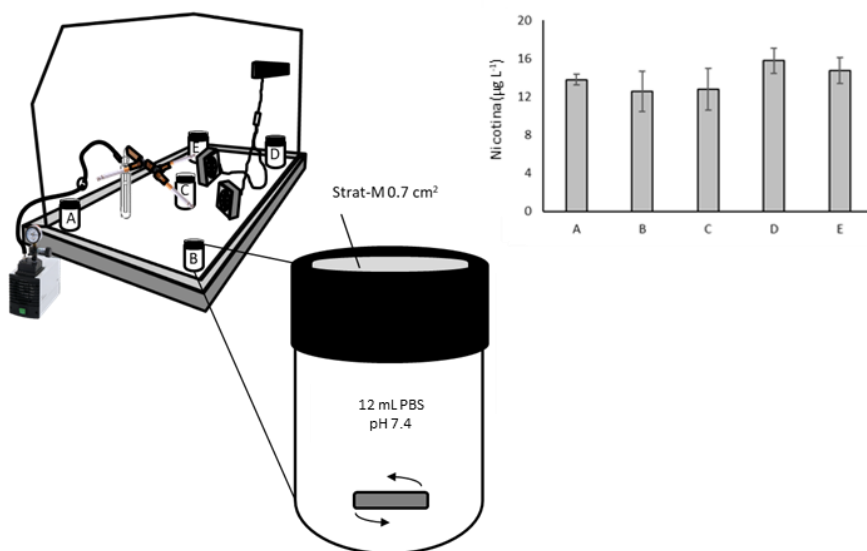


Figura 39. Esquema de la cámara de simulación y máquina de fumar, donde aparecen indicadas las distintas posiciones estudiadas para evaluar la homogeneidad del aire en el interior de la cámara de simulación; y resultados obtenidos en este estudio para el caso de tolueno en membranas Strat-M® y nicotina en disolución receptora.

5.4. Evaluación de la efectividad de cosméticos antipolución frente a compuestos presentes en humo de tabaco.

5.4.1. Condiciones de dosis finitas

La concentración de contaminantes en el aire de la cámara de simulación se evaluó mediante muestreo activo, en intervalos de 5 min durante un tiempo total de 2 h. En la Tabla 23 se muestran las propiedades analíticas de los contaminantes determinados en el humo de tabaco mediante muestreo activo y posterior análisis por TD-GC-MS. La Figura 40 muestra los perfiles de concentración de los contaminantes evaluados en la atmósfera simulada, donde se observa un incremento rápido de la concentración de analito hasta un máximo a los 15-20 min, y posteriormente una disminución de la concentración de forma progresiva. Los valores máximos de concentración alcanzados para algunos contaminantes representativos evaluados, como la nicotina, tolueno, etilbenceno y p-cimeno fueron de 16.58, 3.15, 0.71 y 0.41 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. La concentración media de estos compuestos en el intervalo de 0 a 30 minutos fue de 9.70, 2.07, 0.26 y 0.41 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Tabla 23. Características analíticas, iones seleccionados y tiempo de retención de los contaminantes del humo de tabaco estudiados mediante muestreo activo y posterior análisis por TD-GC-MS.

Analito	Iones (m/z)	Tiempo de retención (min)	Rango lineal (ng)	LOD (ng)	LOQ (ng)	R ²
Benceno	77, 78	2.50	20-4000	6	20	0.995
Tolueno	91, 106	4.43	20-4000	6	20	0.998
Clorobenceno	112	7.63	200-4000	50	170	0.978
Etilbenceno	91, 106	8.57	100-4000	30	100	0.997
m,p-xileno	91, 106	9.27	200-4000	60	200	0.992
Estireno	116	10.62	500-4000	150	500	0.984
o-xileno	104	10.65	200-4000	50	170	0.994
p-Cimeno	91, 117	13.40	350-4000	100	330	0.985
Limoneno	67, 93	13.47	200-4000	60	200	0.999
Naftaleno	128	15.10	20-4000	5	17	0.994
Nicotina	84, 133	16.30	200-4000	50	170	0.989
Acenafthileno	152	17.00	20-4000	5	17	0.979
2-metilantraceno	192	18.32	100-4000	25	83	0.996
1-metilfenantreno	192	19.60	100-4000	25	83	0.996

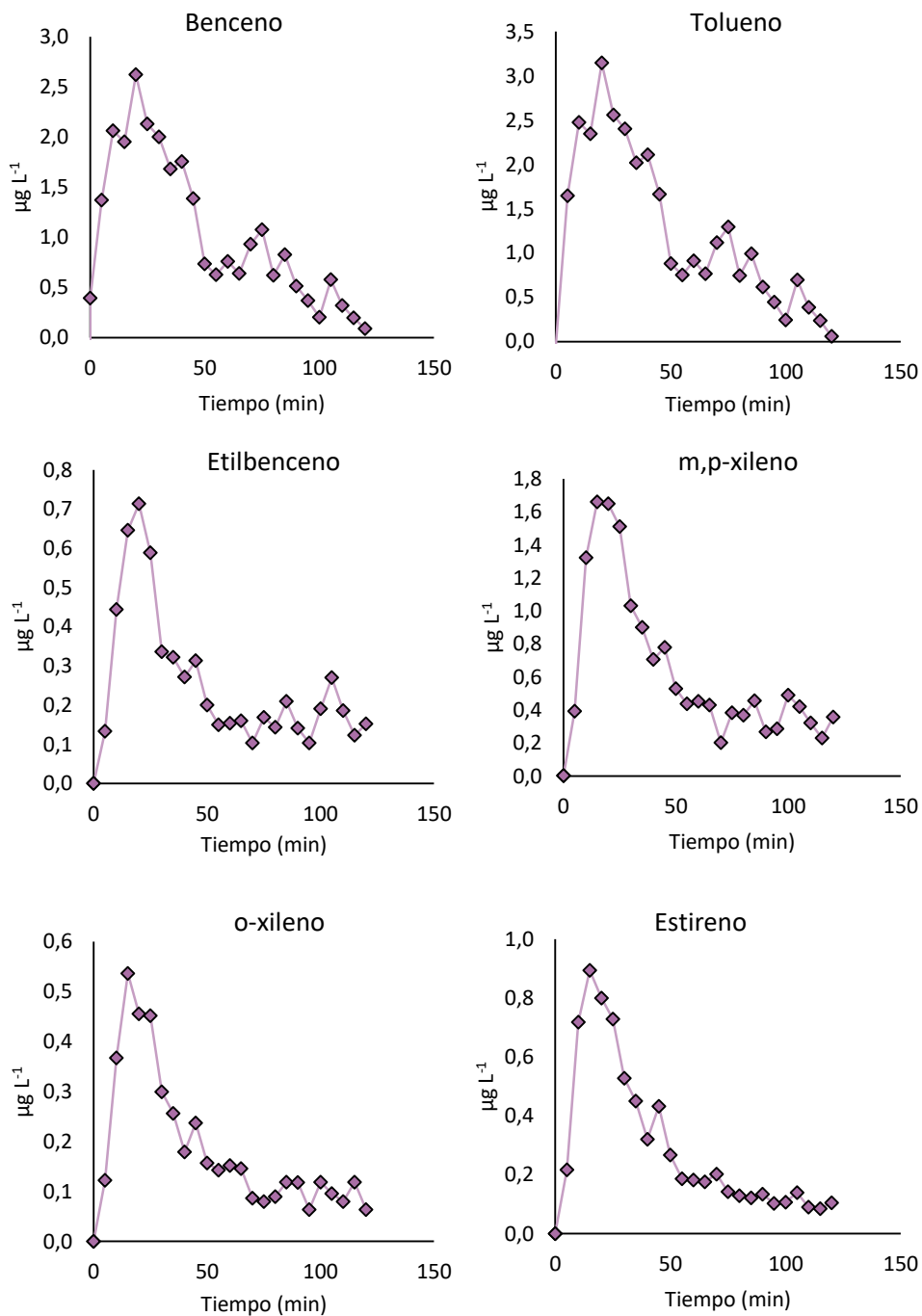
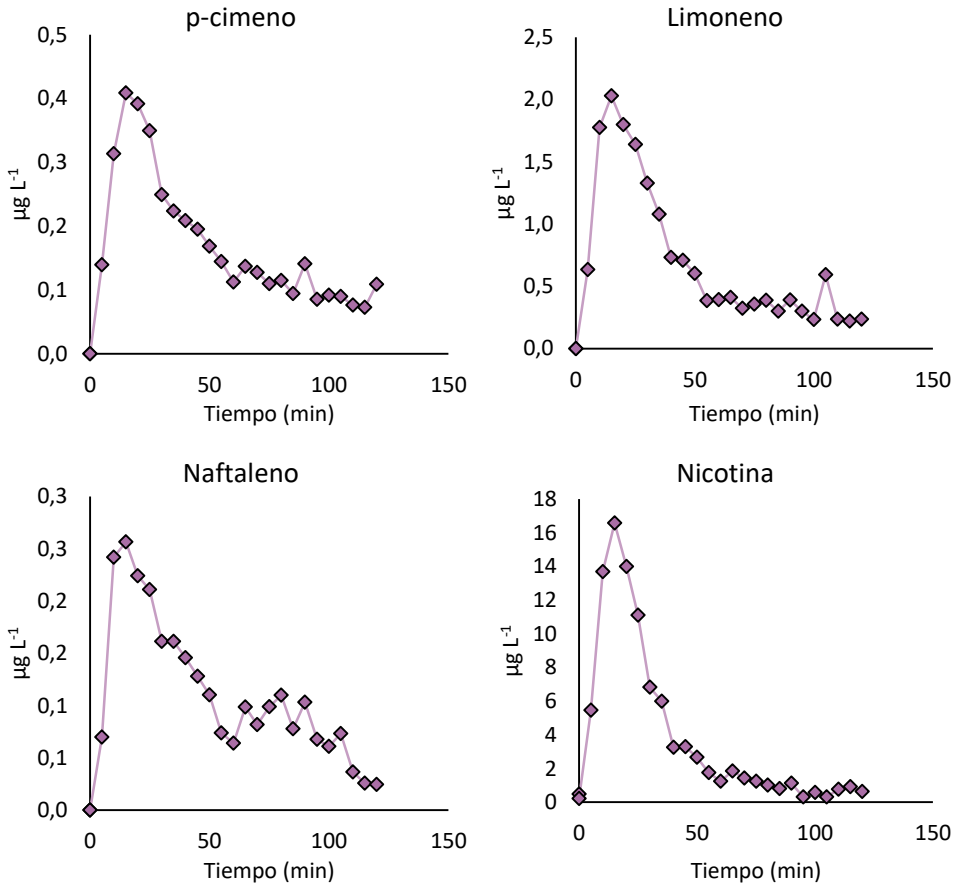


Figura 40. Perfiles de concentración en el interior de la cámara de simulación de los contaminantes presentes en el humo de tabaco estudiados, tras realizar muestreo activo en condiciones de dosis finita.



*Continuación de la Figura 40.

Se realizaron estudios de absorción dérmica in vitro en condiciones de dosis finitas, utilizando membranas Strat-M® de control, sin cosmético ($n = 3$) y membranas tratadas con una capa homogénea de 2 mg cm^{-2} de los cosméticos evaluados: Crema con SPF medio (A), Crema SPF medio con activo antipolución (B) y Crema facial (C) ($n = 3$). Posteriormente, se introdujeron las celdas de Franz modificadas en el interior de la cámara durante un tiempo total de exposición de 135 min, y se quemaron los tres cigarrillos de forma simultánea. Finalmente, se determinó la concentración de los contaminantes en la membrana Strat-M® y la solución receptora de cada celda. Además, también se analizó un blanco para comprobar la ausencia de contaminantes.

Las concentraciones obtenidas en los experimentos de control se muestran en la Figura 41 y la Tabla 24. Como puede observarse, la nicotina fue el único compuesto detectado en la solución receptora, mientras que en la membrana Strat-M® se detectaron más compuestos, como benceno, tolueno, etilbenceno, xilenos, estireno, p-cimeno y limoneno.

La concentración de nicotina en la solución receptora aumentó con el tiempo alcanzando un valor de concentración máxima a los 30 min de exposición ($11.6 \mu\text{g L}^{-1}$). En estas condiciones, tras 30 min de exposición, los cosméticos evaluados provocan una disminución de la absorción de la nicotina, obteniendo concentraciones de 7.9, 6.6 y $7.5 \mu\text{g L}^{-1}$ para los cosméticos A, B y C, respectivamente, lo que indica un efecto antipolución sobre la absorción de nicotina (Tabla 24).

Tras el análisis de las membranas Strat-M® empleadas como control, tras 30 min de exposición, se obtuvieron concentraciones de 90 ng cm^{-2} de benceno, 160 ng cm^{-2} de tolueno, 55 ng cm^{-2} de etilbenceno, 400 ng cm^{-2} de m,p-xileno, 120 ng cm^{-2} de o-xileno, 160 ng cm^{-2} de estireno, 71 ng cm^{-2} de p-cimeno, 500 ng cm^{-2} de limoneno y 2500 ng cm^{-2} de nicotina. Comparando estos resultados con los obtenidos para los cosméticos A, B y C, se puede observar una reducción significativa de la cantidad de contaminantes en la membrana (Tabla 24), lo que confirma la efectividad antipolución.

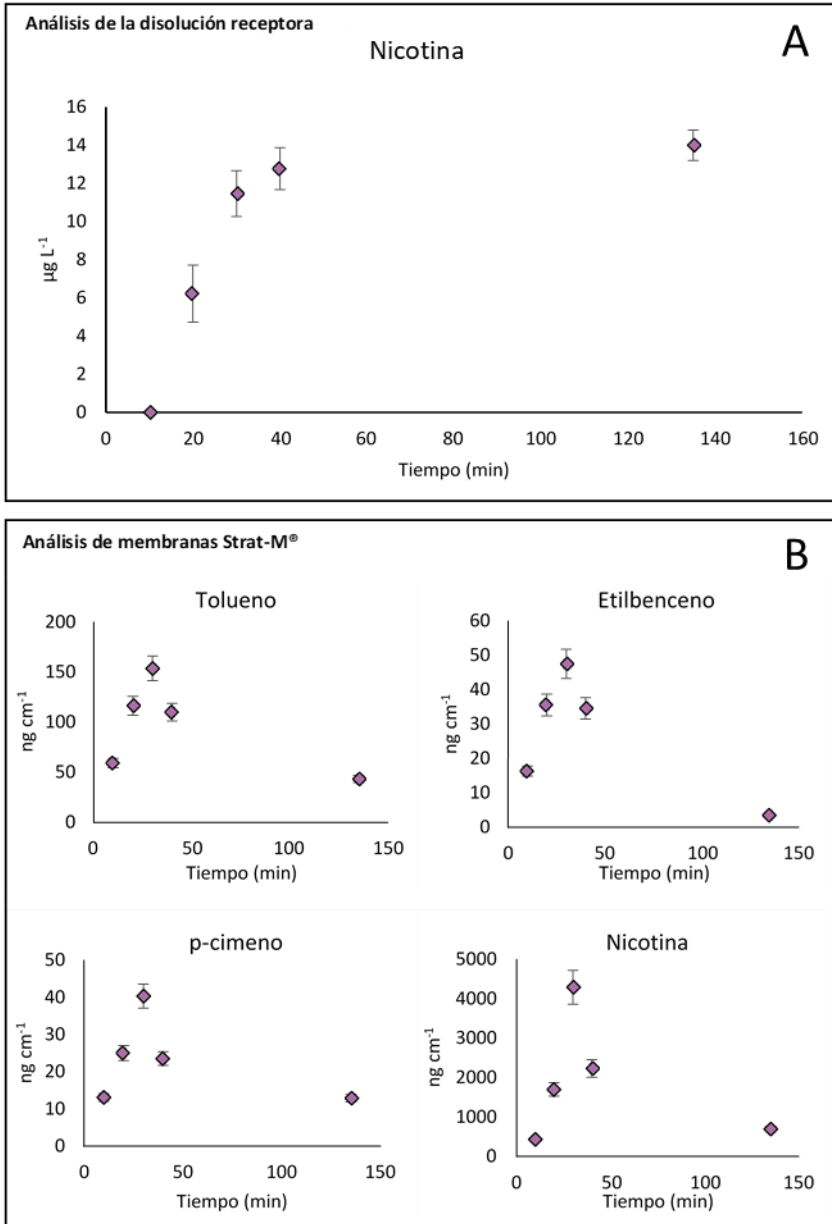


Figura 41. Estudio de absorción dérmica de contaminantes orgánicos seleccionados procedentes del humo de tabaco en condiciones de dosis finita. (A) Concentración de nicotina en la disolución receptora y (B) analitos en membranas Strat-M®.

Tabla 24. Concentración de los contaminantes evaluados en membranas Strat-M® y disoluciones receptoras tras 30 minutos de exposición en condiciones de dosis finita en muestras de control y cosméticos, SPF medio (A), SPF medio con activo antipolución (B) y crema facial (C).

Muestra	Analito	Concentración (ng cm ⁻² ± s)			
		Control	Cosmético A	Cosmético B	Cosmético C
Strat-M®	Benceno	90 ± 8	50 ± 5	35 ± 4	37 ± 3
	Tolueno	160 ± 20	88 ± 9	101 ± 10	65 ± 6
	Etilbenceno	55 ± 5	40 ± 4	11 ± 2	23 ± 4
	m,p-xileno	400 ± 30	110 ± 10	26 ± 3	46 ± 4
	o-xileno	120 ± 15	54 ± 4	40 ± 3	30 ± 3
	Estireno	160 ± 14	<LOD	<LOD ^a	<LOD
	p-Cimeno	71 ± 9	40 ± 3	26 ± 2	10 ± 2
	Limoneno	500 ± 50	480 ± 20	143 ± 13	<LOD
	Nicotina	2500 ± 200	1600 ± 140	1400 ± 150	1400 ± 130
Disolución receptora	Nicotina (µg L ⁻¹)	11.6 ± 1.0	7.9 ± 1.0	6.6 ± 1.1	7.5 ± 1.1

^a Inferior al límite de detección

5.4.2. Condiciones de dosis semi-infinitas

Una vez evaluada la cinética de los contaminantes presentes en el humo de tabaco en condiciones de dosis finita, se procedió a evaluar la cinética de los mismos en condiciones de dosis semi-infinita. Para ello, se consumen 3 cigarrillos cada 30 min durante un total de 4.5 h, y se realiza muestreo activo en intervalos de 20 minutos. En estas condiciones, tal y como se observa en la Figura 42, las concentraciones de contaminantes evaluados permanecen a niveles altos de concentración durante todo el experimento. Así, se obtuvieron valores de concentración medios, transcurridos 30 minutos, para algunos contaminantes representativos como la nicotina, tolueno, etilbenceno y p-cimeno de 20 ± 5 , 8 ± 2 , 1.4 ± 0.3 y $0.7 \pm 0.1 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

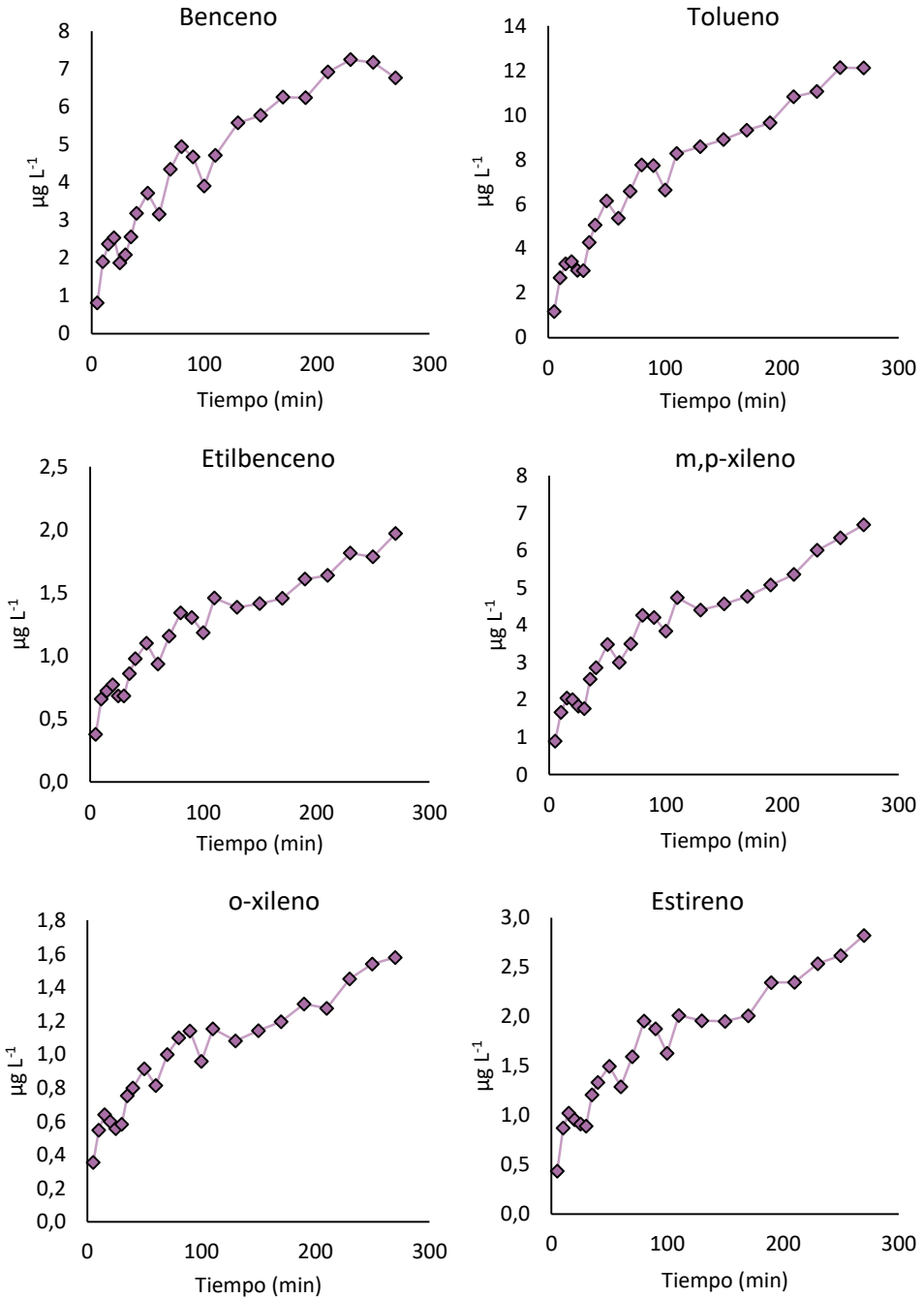
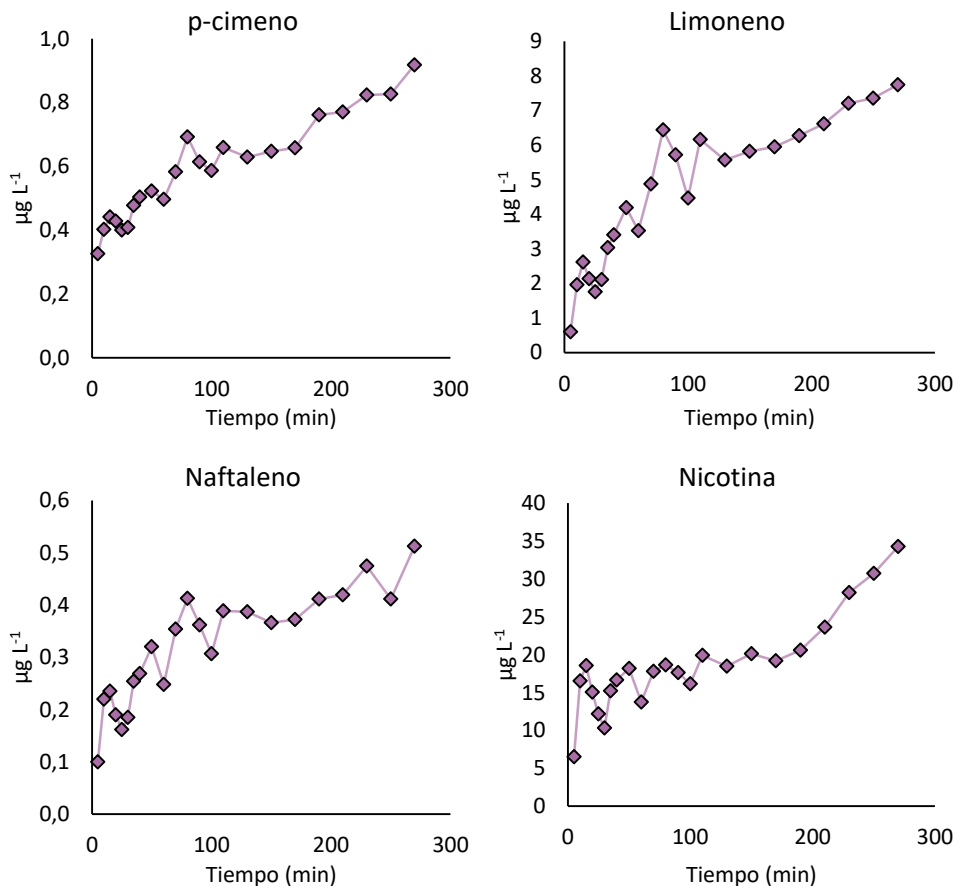


Figura 42. Perfiles de concentración en el aire del interior de la cámara de simulación de los contaminantes presentes en el humo de tabaco estudiados, tras realizar muestreo activo en condiciones de dosis semi-infinitas.



*Continuación de la Figura 42.

Tras la evaluación de la efectividad antipolución de los cosméticos A, B y C en condiciones de dosis finita, se realizaron estudios de absorción dérmica *in vitro* en condiciones de dosis semi-infinitas para muestras control y los cosméticos A, B y C, empleando celdas de Franz modificadas a tiempos de exposición de 0.5, 1, 2, 4 y 8 h, y consumiendo 3 cigarrillos cada 30 minutos a lo largo del experimento. Se detectó benceno, tolueno y nicotina en la disolución receptora de las muestras control tras 1 h de exposición (Tabla 25), a concentraciones de 3.6, 4.8 y 29.0 $\mu\text{g L}^{-1}$, que aumentaron a 24, 33 y 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, tras 8 h de exposición.

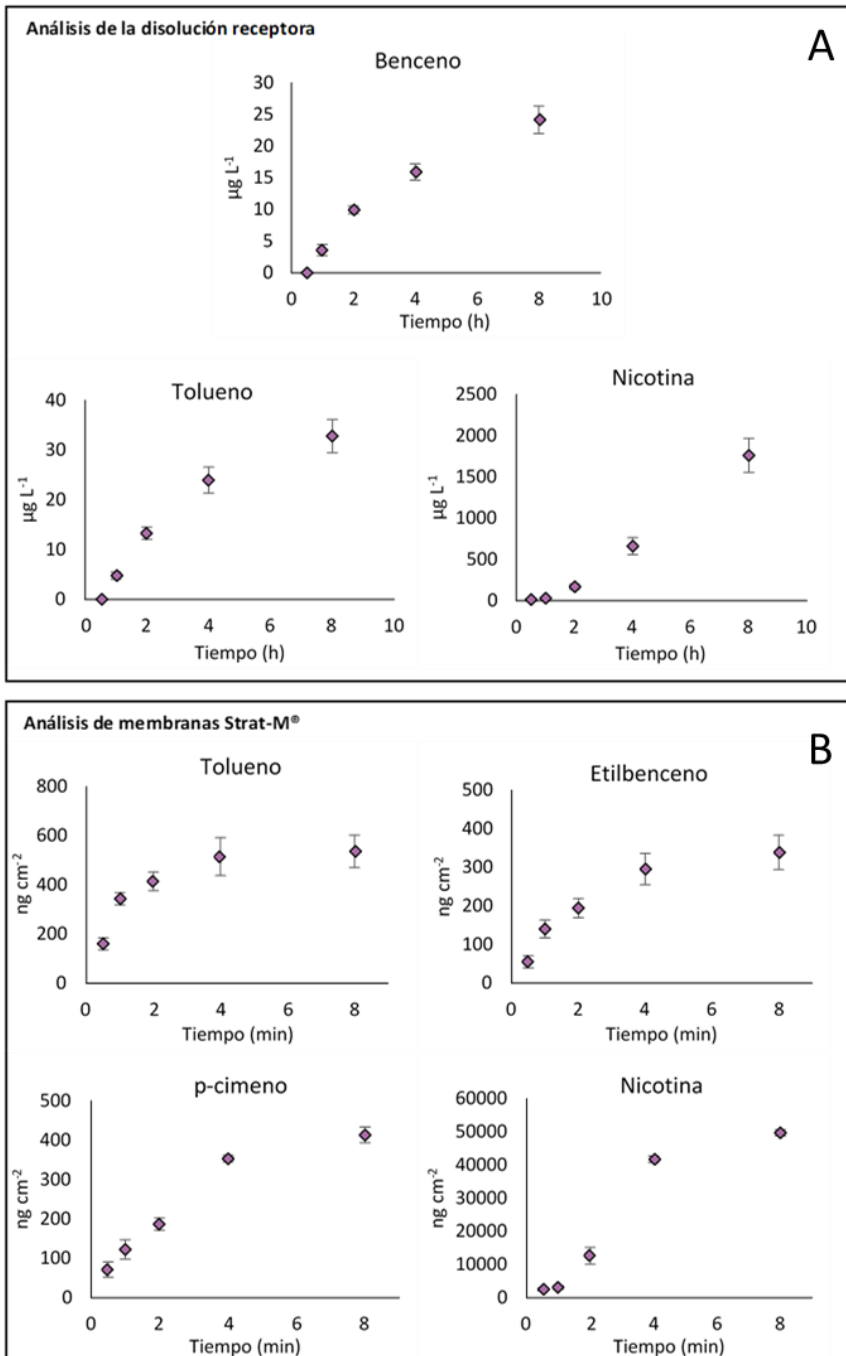


Figura 43. Estudio de absorción dérmica de contaminantes orgánicos seleccionados procedentes del humo de tabaco en condiciones de dosis semi-infinita. (A) Concentración de analitos en la disolución receptora y (B) analitos en membranas Strat-M®.

En la Figura 43 se muestra la concentración de contaminantes en la disolución receptora a distintos tiempos de exposición, y se puede observar un aumento lineal de la absorción de nicotina, mientras que en los casos del benceno y tolueno parecen alcanzar el equilibrio a las 8 h. Las concentraciones de contaminantes obtenidas en las membranas Strat-M® para los experimentos control a distintos tiempos de exposición indican una absorción lineal durante las primeras horas de exposición (Figura 43 y Tabla 26), alcanzando el equilibrio tras 4 h de exposición, con una concentración de 540 ng cm⁻² de tolueno, 340 ng cm⁻² de etilbenceno, 410 ng cm⁻² de p-cimeno y 49700 ng cm⁻² de nicotina. En la Tabla 26 se muestran las concentraciones obtenidas de cada contaminante estudiado en las membranas Strat-M® para controles y muestras con cosméticos A, B y C. Como se puede observar, se produce una reducción significativa de los contaminantes absorbidos en muestras de cosméticos para tiempos de exposición cortos (1 y 2 h). Sin embargo, el efecto de los cosméticos se redujo con el tiempo, siendo insignificante transcurridas 8 h.

Tabla 25. Concentraciones de los contaminantes en la disolución receptora a distintos tiempos de exposición en condiciones de dosis semi-infinita en controles y muestras de cosméticos (A) SPF medio, (B) SPF medio con activo antipolución, y (C) crema facial.

Tiempo de exposición (h)	Analitos	Concentración (µg L ⁻¹ ± s)			
		Control	Cosmético A	Cosmético B	Cosmético C
1	Benceno	3.6 ± 0.4	2.4 ± 0.3	1.08 ± 0.11	1.35 ± 0.18
	Tolueno	4.8 ± 0.5	2.5 ± 0.3	<LOD ^a	1.0 ± 0.2
	Nicotina	29 ± 2	25 ± 3	21 ± 1	19 ± 2
2	Benceno	9.9 ± 0.6	4.3 ± 0.5	2.8 ± 0.3	2.8 ± 0.4
	Tolueno	13.3 ± 1.2	5.1 ± 0.5	3.3 ± 0.4	3.0 ± 0.2
	Nicotina	169 ± 15	159 ± 14	116 ± 11	129 ± 12
4	Benceno	15.9 ± 1.3	14.3 ± 1.6	6.5 ± 0.4	11.2 ± 1.5
	Tolueno	24 ± 3	23 ± 2	13.3 ± 1.1	15.6 ± 1.8
	Nicotina	660 ± 60	660 ± 50	630 ± 50	640 ± 30
8	Benceno	24 ± 2	20 ± 2	13 ± 2	18.6 ± 1.6
	Tolueno	33 ± 3	28 ± 3	18 ± 2	23 ± 2
	Nicotina	1500 ± 200	1600 ± 140	1300 ± 120	1400 ± 150

^a Inferior al límite de detección

Tabla 26. Concentración de los contaminantes estudiados en membranas Strat-M® tras distintos tiempos de exposición en condiciones de dosis semi-infinita para controles y cosméticos.

Tiempo de exposición (h)	Analitos	Concentración (ng cm ⁻² ± s)			
		Control	Cosmético A	Cosmético B	Cosmético C
1	Benceno	227 ± 9	110 ± 3	93 ± 2	98.3 ± 1.5
	Tolueno	343 ± 17	160 ± 8	119 ± 6	127 ± 8
	Etilbenceno	140 ± 7	54 ± 3	46 ± 3	48 ± 3
	m,p-xileno	510 ± 30	165 ± 7	158 ± 7	179 ± 9
	o-xileno	140 ± 7	65 ± 4	54 ± 3	52 ± 3
	Estireno	237 ± 18	86 ± 5	63 ± 4	73 ± 5
	p-cimeno	122 ± 6	68 ± 4	35 ± 2	40 ± 3
	Limoneno	760 ± 40	550 ± 30	280 ± 20	310 ± 20
	Nicotina	3110 ± 160	2680 ± 70	1750 ± 60	2560 ± 70
2	Benceno	332 ± 18	285 ± 18	225 ± 17	253 ± 12
	Tolueno	414 ± 15	211 ± 10	142 ± 8	196 ± 8
	Etilbenceno	194 ± 8	86 ± 7	67 ± 5	75 ± 6
	m,p-xileno	620 ± 20	285 ± 15	221 ± 12	239 ± 14
	o-xileno	163 ± 7	87 ± 7	64 ± 5	67 ± 5
	Estireno	299 ± 15	147 ± 9	101 ± 4	98 ± 8
	p-cimeno	187 ± 8	110 ± 8	64 ± 5	60 ± 5
	Limoneno	980 ± 50	960 ± 50	510 ± 20	436 ± 18
	Nicotina	12700 ± 600	12100 ± 500	13000 ± 500	9000 ± 400
4	Benceno	460 ± 20	310 ± 18	285 ± 19	320 ± 20
	Tolueno	510 ± 30	247 ± 15	292 ± 18	350 ± 20
	Etilbenceno	290 ± 20	164 ± 7	157 ± 7	178 ± 7
	m,p-xileno	950 ± 50	590 ± 30	730 ± 40	560 ± 40
	o-xileno	230 ± 12	148 ± 6	102 ± 5	178 ± 8
	Estireno	680 ± 50	370 ± 20	390 ± 30	270 ± 20
	p-cimeno	353 ± 18	204 ± 12	168 ± 6	153 ± 6
	Limoneno	1600 ± 100	1420 ± 90	1430 ± 110	1130 ± 90
	Nicotina	42000 ± 2000	42000 ± 2000	41200 ± 1800	43000 ± 2000
8	Benceno	490 ± 20	480 ± 20	479 ± 18	490 ± 20
	Tolueno	540 ± 30	520 ± 20	580 ± 30	520 ± 40
	Etilbenceno	340 ± 20	311 ± 18	224 ± 15	337 ± 19
	m,p-xileno	1150 ± 60	1060 ± 50	860 ± 40	1180 ± 50
	o-xileno	266 ± 15	263 ± 12	196 ± 10	270 ± 20
	Estireno	890 ± 40	750 ± 40	570 ± 30	840 ± 40
	p-cimeno	410 ± 20	302 ± 18	320 ± 16	341 ± 12
	Limoneno	2000 ± 150	1980 ± 140	1800 ± 150	1900 ± 160
	Nicotina	50000 ± 2000	50000 ± 3000	52000 ± 2000	52000 ± 2000

El efecto antipolución de los cosméticos A, B y C en condiciones de dosis semi-infinitas se ha evaluado mediante la determinación de la concentración de los contaminantes seleccionados en la disolución receptora. Como se puede observar en la Tabla 25, se produjo una disminución de la concentración en muestras de cosméticos durante tiempos de exposición de 1 y 2 h. El cosmético B redujo la concentración en la disolución receptora en un 72 % para benceno, 88 % para

tolueno y 29 % para nicotina, en comparación con los experimentos control. El efecto del cosmético C fue similar con una absorción reducida del 67, 78 y 29 % de benceno, tolueno y nicotina, respectivamente. Mientras que el cosmético A mostró el menor efecto antipolución con una reducción de la absorción de 45, 55 y 10 % para benceno, tolueno y nicotina, respectivamente. Sin embargo, el efecto antipolución de los cosméticos evaluados se redujo claramente a tiempos de exposición superiores a 4 h. La absorción de nicotina de las membranas tratadas con cosméticos durante largos periodos de exposición fue similar a la de los experimentos control, lo que indica una saturación de la capa de cosmético con el contaminante. Sin embargo, el efecto antipolución se mantuvo para el benceno y el tolueno, con una concentración reducida en la solución receptora de 53 y 45 % para el cosmético B, y 26 y 33 % para el cosmético C, respectivamente.

Como se ha comentado anteriormente, la presencia de surfactantes y materiales poliméricos formadores de barrera provocan un aumento de la efectividad antipolución. Así, el cosmético C tiene una proporción total de factores de consistencia en su composición de 9 % p/p frente al 3.2 y 1 % p/p de los cosméticos antipolución B y A, respectivamente. Además, el porcentaje de polidimetilsiloxano (emoliente con efecto antipolución demostrado anteriormente en esta tesis) también varía entre los tres cosméticos evaluados, teniendo valores de concentración de 3.0, 6.0 y 2.0 (p/p) para los cosméticos A, B y C, respectivamente. Por tanto, hay que destacar que la proporción de factores de consistencia presentes en las distintas fórmulas cosméticas, son responsables de su efectividad antipolución frente a compuestos orgánicos. Por otro lado, la presencia de goma xantana (polisacárido de elevado peso molecular) en los cosméticos B y C, así como su mayor contenido de talco, les proporciona una mayor efectividad antipolución en comparación con el cosmético A.

En resumen, la combinación de todos los compuestos mencionados proporciona un efecto antipolución demostrado a los cosméticos B y C, superior al del cosmético A y claramente superior a la aplicación de productos cosmético convencionales.

Capítulo 5: Conclusiones

En esta Tesis Doctoral se ha diseñado una cámara de simulación de elevado volumen interno, capaz de generar atmósferas contaminadas para realizar estudios de simulación tanto en condiciones de dosis infinitas, finitas y semi-infinitas, con temperatura constante y controlada, y con sensores de humedad, CO₂, CO, partículas y VOCs.

Se ha evaluado de forma positiva la estabilidad y la homogeneidad de la cámara de simulación en condiciones de dosis infinitas de HAPs.

Se ha desarrollado una celda de Franz modificada para evaluar la permeabilidad de compuestos orgánicos volátiles en fase gas en el interior de la cámara de simulación. Para ello, se empleó BTEX como compuestos modelo para determinar los parámetros de permeabilidad J y t_{lag} . Los parámetros de permeabilidad obtenidos de forma experimental se compararon con los encontrados en bibliografía, demostrando así la validez de la cámara diseñada para realizar estudios de absorción dérmica en condiciones de dosis infinita. Se ha evaluado el efecto del espesor y la naturaleza de la membrana sobre los parámetros de permeabilidad, observando que cuanto mayor es el espesor de la membrana, menor es el flujo molecular de HAPs y mayor el tiempo que éstos tardan en atravesar la membrana (t_{lag}). Además, un aumento de la concentración de HAPs en aire supone un aumento del J y una disminución del t_{lag} de los HAPs evaluados.

Empleando la cámara de simulación y las celdas de Franz modificadas, se ha desarrollado y validado una metodología analítica para la evaluación de la absorción dérmica y la efectividad de cosméticos antipolución frente a diferentes HAPs, basada en el uso de membranas Strat-M® como simulantes de piel humana. Para ello, se ha empleado la cámara de simulación en condiciones de dosis infinita de HAPs. La efectividad antipolución, se demostró mediante la evaluación estadística de los parámetros de permeabilidad (J y t_{lag}) obtenidos para controles y muestras de cosméticos. Por tanto, cuanto más reduzcan los cosméticos antipolución los valores de J y aumenten los t_{lag} , mayor será su efectividad antipolución.

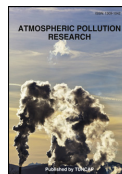
Por otro lado, se ha diseñado una máquina de fumar que permite la combustión simultánea de tres cigarrillos. Esta máquina permite operar en condiciones de dosis finita y semi-infinita, mediante la combustión única de tres cigarrillos para una exposición breve, y la combustión de tres cigarrillos cada 30 minutos para una

exposición prolongada, respectivamente. Mediante una serie de modificaciones de la cámara de simulación y la introducción de dicha máquina de fumar en su interior, se ha desarrollado una metodología analítica, versátil y adaptable para evaluar la absorción dérmica de contaminantes presentes en humo de tabaco, así como la efectividad de cosméticos antipolución. Ésta última se evalúa mediante la determinación de la concentración de los contaminantes seleccionados en la disolución receptora y membranas Strat-M®, de manera que cuanto menor sea la concentración de contaminantes evaluados en muestras de cosméticos con respecto a los controles, mayor será su efectividad antipolución.

Se ha demostrado que los productos cosméticos antipolución con un mayor porcentaje de surfactantes y materiales poliméricos (incluyendo poliacrilatos, estearatos, polímeros céreos y siliconas) formadores de barrera aumentan notablemente su efectividad. Por otro lado, la adición de polisacáridos de elevado peso molecular, como la goma xantana (principio activo antipolución con efectos demostrados contra la adsorción de compuestos orgánicos), provoca un aumento de la efectividad antipolución. Además, la presencia de partículas minerales en los cosméticos antipolución, como el talco o los silicatos, adsorbe compuestos orgánicos en su superficie, aumentando de esta forma su efecto antipolución.

ÍNDICE ANEXO

Título	Revista	Índice de impacto	Año de publicación
Development of a simulation chamber for the evaluation of dermal absorption of volatile organic compounds	Atmospheric Pollution Research	3.527	2020
Skin Penetration of Hazardous Air Pollutants in Presence of Antipollution Cosmetics	Journal of Cosmetic Science	0.53	2021
Skin Penetration of Hazardous Air Pollutants in Presence of Antipollution Cosmetics	Journal of Cosmetic Science	0.53	Aceptado para publicación



Original Article

Development of a simulation chamber for the evaluation of dermal absorption of volatile organic compounds

Soraya Pontes-López, Julia Moreno, Francesc A. Esteve-Turrillas, Sergio Armenta*

Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, 50th Dr. Moliner St., 46100, Burjassot, Spain



ARTICLE INFO

Keywords:

Dermal absorption
Exposition/simulation chamber
Strat-M®
Skin simulant
BTEX

ABSTRACT

An exposition chamber has been designed and developed for the production of contaminated atmospheres with fixed and known concentration of volatile organic compounds. The proposed chamber has been evaluated for the determination of *in-vitro* diffusion parameters, such as flux and lag time for benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX). Polydimethylsiloxane (PDMS) and Strat-M® membranes were evaluated, including the effect of membrane thickness, from 0.5 to 3.0 mm, on the diffusion parameters. The obtained flux values and lag times, ranged from 0.2 to 1.5 $\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ and from 10 to 130 min, respectively, for studies performed at a BTEX concentration of 51 $\mu\text{g L}^{-1}$ in air. Different air concentration of BTEX were evaluated in the calibration chamber, indicating that flux increased proportionally to the BTEX concentration in air and the lag time decreased as the air concentration of BTEX increased.

1. Introduction

Urban areas air quality is highly dependent on atmospheric conditions, solar radiation, temperature, meteorological and geographical factors, deposition, and contaminant emissions (Bourar et al., 2017). Recently, governments and international agencies are increasingly concerned about air pollution (European Environment Agency, 2019; World Health Organization, 2017), being natural and anthropogenic sources the primary origin of air pollution including volatile organic compounds (VOCs), sulfur oxides, ozone, carbon oxides, particulate matter, nitrogen oxides, and radioactive pollutants, in urban regions (de la Guardia and Armenta, 2016).

VOCs are defined by the World Health Organization (WHO) as organic compounds with boiling points between 50–100 and 240–260 °C (World Health Organization, 1989). Among VOCs, benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene isomers (BTEX) have been extensively measured worldwide due to their health effects such as neurological impairment, allergy, nose and eye irritation, kidney and liver dysfunction, heart disease, lung cancer and leukemia (Kim and Bernstein, 2009; Saalberg and Wolff, 2016). Among BTEX, benzene is a group 1 hazardous compound (carcinogenic to humans) with a relatively long lifetime (World Health Organization, 2011). Moreover, it is well known that xylenes are highly reactive and contribute to ozone formation and hence to climate change (Finlayson-Pitts and Pitts, 1993). Major

sources of BTEX emissions in the air include leakage of petroleum and related products, vehicle exhaust, coal and biomass burning, painting and petrochemical industries (Zalel et al., 2008). Occupational exposure of BTEX is mainly related to inhalation and dermal absorption, and in more rare cases, ingestion (Kuranchie et al., 2019).

Since the adoption of the European Regulation on Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) initiative, there is a constantly growing demand for risk assessment data in nearly all fields of industry (European Commission, 2007). To date, several experimental studies have attempted to quantify the dermal absorption of benzene from neat benzene, organic (non-aqueous) solvents, or aqueous solutions using human, rat, mice, pig, and monkey skin (Williams et al., 2011). However, the results obtained are highly variable depending on the experimental conditions of the studies (skin type, anatomical site, liquid vehicle, units of measurement, among others). Thus, the development of *in vitro* testing methods based on skin penetration models is necessary. The official guidelines recommend *in vitro* skin diffusion experiments across human isolated stratum corneum sheets performed using static Franz-type diffusion cells. However, *in vitro* testing methods using *ex vivo* human skin methods possesses several drawbacks including: skin thickness heterogeneity, skin storage conditions, membrane preparation complexity, age of donor, and high laboratory costs (Mathes et al., 2014). Synthetic membranes for *in vitro* permeation studies were originally developed to be used as an

Peer review under responsibility of Turkish National Committee for Air Pollution Research and Control.

* Corresponding author.

E-mail address: sergio.armenta@uv.es (S. Armenta).

<https://doi.org/10.1016/j.apr.2020.02.015>

Received 25 September 2019; Received in revised form 18 February 2020; Accepted 18 February 2020

Available online 25 February 2020

1309-1042/ © 2020 Turkish National Committee for Air Pollution Research and Control. Production and hosting by Elsevier B.V. All rights reserved.

alternative to human skin models (U.S. Department of Health and Human Services, 1997; Haq et al., 2018). The main advantages of synthetic membrane are related to homogeneity and controlled thickness, faster membrane preparation time, and relatively low cost. Commonly used synthetic membranes can be categorized in two groups, including: i) membranes acting as barrier: silicone-based membranes, polydimethylsiloxane (PDMS) and CarboSil, generally hydrophobic and rate limiting, and ii) membranes used as support: cellulose acetates, cellulose nitrates, and polysulfones (Ng et al., 2012). In this sense, Strat-M® synthetic membranes were specifically designed by Millipore to mimic different layers of human skin made by two layers of porous polyether sulfone, treated with synthetic lipids, on a poly olefin non-woven fabric support (Haq et al., 2018).

Analyte transport across membranes can be represented using Fick's Law of diffusion (Eq. (1)).

$$J_{mp} = \frac{D \times K \times C_v}{h} \quad (1)$$

where J_{mp} is the flux, D is the diffusion coefficient of the compounds in the membrane, K is the partition coefficient of the evaluated compounds between the donor phase and the membrane, C_v is the concentration of the evaluated compounds in the donor phase, and h is the membrane thickness.

In summary, the main objective of this article is the development and evaluation of a simulation chamber to obtain homogeneous and controlled atmospheres contaminated with BTEX, used as model compounds, to study dermal absorption using different synthetic membranes in *in vitro* models.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and materials

Benzene, toluene, ethylbenzene, o-xylene, m-xylene, and p-xylene were provided by Scharlau (Barcelona, Spain) and Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Toluene-d₈ was provided by Sigma-Aldrich and it was employed as internal standard. Standards and working solutions were prepared in acetone (GC analysis grade) obtained from Scharlau.

PDMS membranes with different thickness ranging from 0.5 to 3.0 mm were obtained from TOVISI (Valencia, Spain). Strat-M® membranes were purchased from Millipore (Temecula, MA, USA).

2.2. Simulation chamber

A modified closed enclosure model HZ08252 from Bruker (Billerica, MA, USA) was used as simulation chamber. The closed enclosure is made of polymethylmethacrylate with a metallic base and an internal volume of 640 L (see Fig. 1).

Clean and dry air at a fixed flow rate of 2.7 L min⁻¹ was introduced in the chamber using a MPB1200 rotameter from MPB Industries (Kent, UK), calibrated by a high-volume bubble flowmeter. A 105 mm diameter hole was used for air output to avoid overpressure inside the chamber. Air homogeneity inside the chamber is obtained with two 120 mm diameter fans with hole spacing and vibration-dampening rubber corners.

Clean air was spiked with different BTEX concentrations by using an isocratic LC pump HP 1050 series from Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA) adjusted to 4–5 µL min⁻¹ and a glass T connector as shown in Fig. 1. Infinite dose conditions were maintained during all the experiments, reaching the corresponding equilibrium concentration. The simulation chamber was placed in a 50 m³ closed room, with controlled temperature (25 ± 1 °C) and a high volume exhaust extractor partially connected to the air output.

To assure BTEX concentration inside the chamber, active sampling was performed using a low volume personal air sampling TUFF Standard from Casella measurements (Bedford, UK), operating with a

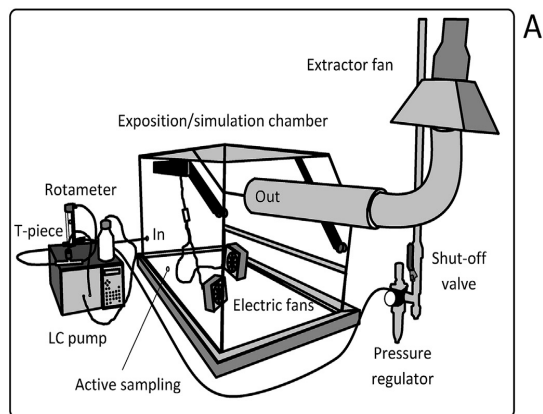


Fig. 1. Scheme (A) and picture (B) of the developed exposition chamber to perform dermal absorption studies. Inset: Picture of glass T-connector to spike clean air with BTEX compounds.

low flow adaptor at a flow rate of 76 mL min⁻¹ for 30 s. The hole used for active sampling is highlighted in Fig. 1A. It was closed all time, except when active sampling was performed. Glass thermal desorber (TD) tubes, capped with perfluoroalkoxy-polytetrafluoroethylene (PFA-PTFE) ferrules, were obtained from PerkinElmer (Waltham, MA, USA) and filled with 150 mg of Tenax TA (35–60 mesh) provided by Alltech (Selmsdorf, Germany). Tenax was conditioned prior to sampling at 300 °C during 2 h. All Tenax tubes were analyzed prior to sampling to demonstrate the usefulness of the conditioning procedure. Packed tubes were connected with the active sampling pump using silicone rubber tubing and the flow was regulated using an ADM calibrated flowmeter (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) before each sampling. After sampling, tubes were capped with PFA-PTFE ferrules and stored at -10 °C until analysis. A calibration curve was prepared by the direct addition of 10 µL BTEX standards in acetone directly inside Tenax packed TD tubes. Curve was prepared at 5 concentration levels ranging from 0.005 to 1.0 µg target analytes. 10 µL toluene-d₈ standard solution in acetone at a concentration of 10 g L⁻¹ was added inside the Tenax tube to obtain a final mass of 0.1 µg, as internal standard.

TD tubes were thermally desorbed using a Turbo Matrix series TD from PerkinElmer coupled to a Trace GC-Polaris Q MS detector from Finnigan (Waltham, MA, USA), equipped with a HP-5MS capillary column (30 m, 0.32 mm, 0.25 µm) from Agilent Technologies.

Thermal desorption was carried out at 260 °C for 20 min using a 75 mL min⁻¹ helium flow rate and desorbed analytes were transferred to a Tenax cold trap at -10 °C without any split flow. A quick trap desorption was carried out at 270 °C at 99 °C s⁻¹ and the analytes were desorbed and directly transferred to the chromatographic column using a transfer line temperature of 275 °C, using a split flow of 1:15. The

Table 1

Operative conditions of the simulation chamber and the air concentration of BTEX compounds.

Parameter	Low	High
Air flow (L min ⁻¹)	2.7 ± 0.1	2.7 ± 0.2
Standard concentration (% w/v)	1.02	3.00
Standard flow (μL min ⁻¹)	4.0 ± 0.9	4.6 ± 0.7
Air concentration (mg m ⁻³)		
Theoretical	15	51
Active sampling	15 ± 2	46 ± 4
Henry law calculated	20 ± 2	42 ± 3

employed chromatographic conditions and SIM parameters were the same as those shown for the HS-GC-MS analysis in section 2.4.

BTEX concentration in the exposition chamber air was calculated following active sampling and the obtained values were compared to those calculated theoretically using the concentration and flow of the BTEX standard solution continuously introduced in the chamber (see Table 1).

2.3. Dermal absorption using vertical diffusion cells

In vitro dermal absorption studies were performed using modified vertical diffusion cells, following the Franz method (Franz, 1975). Franz and modified Franz diffusion cells are probably the most commonly used set-ups for *in vitro* transdermal studies. In this study, the receiver medium of the Franz cell was allowed to be in contact with the atmosphere of the simulation chamber through a synthetic membrane (see Fig. 2). In summary, the donor compartment was the inside atmosphere of the simulation chamber and the receiver had a volume of 12 mL and it was maintained at 25 °C by control of the external temperature. The rounded diffusional area of the membrane separating the compartments is 0.7 cm². The receptor fluid consisted of a saline solution of 0.9% (w/v) NaCl adjusted to pH 7.4 with a phosphate buffer. Receptor solutions in each cell were continuously stirred using a Teflon coated magnetic stirrer. Cells were tightly closed in order to avoid evaporation of BTEX compounds.

The amount of BTEX diffused through the skin was determined by analysis of the receptor solution after different exposure times. Then, 4.95 mL receptor solution was transferred to a 10 mL HS vial and 50 μL

toluene-d8 standard were spiked to obtain a final concentration of 50 μg L⁻¹. Samples were immediately analyzed by HS-GC-MS.

Additionally, two blank cells placed outside the simulation chamber were analyzed to evaluate possible contaminations of the receiving phase.

2.4. HS-GC-MS determination

Analysis of BTEX compounds was performed using a 7697 A HS injector, coupled to a 7890 A GC and a 53975C inert XL EI/CI MSD with Triple-Axis single quadrupole detector, obtained from Agilent Technologies. HS conditions were 60 °C for 20 min and the generated vapor phase was injected in split mode (1:10) at 250 °C, employing helium as carrier gas at a constant flow mode of 8 mL min⁻¹. An Agilent HP-5MS (30 m, 0.25 mm, 0.25 μm) capillary column was employed and the oven program of temperatures was an initial temperature 40 °C, held for 8 min, increased at rate of 20 °C min⁻¹ up to 200 °C, and finally held for 2 min. Ion source and transfer line temperatures were 300 and 250 °C, respectively. Electron-impact ionization was performed with an electron energy of 70 eV and Table S1 (supplementary material) shows the selected m/z ions employed for SIM determination of each studied compound, together with their chromatography retention times.

2.5. Permeation parameters determination

Concentration data of the receptor solution for each diffusion cell experiment (mg L⁻¹ or μg cm⁻³) were transformed to analyte mass/area units (μg cm⁻²) by means of an electronic spreadsheet created by Excel® software (Microsoft). Flux (μg cm⁻² h⁻¹) was determined for each experimental condition from the initial slope of the plot of cumulative chemical mass/area in the receptor solution over time. Experimental time points before analyte detection in the receptor solution were not used for slope determination. Lag time (h) is estimated as the point of intersection between flux line and the x-axis.

Additionally, BTEX concentration in the simulation chamber air can be estimated through the Henry's law and the concentration of the aqueous receiving solution once the equilibrium was reached, as shown in Equation (2) (Sander, 2015).

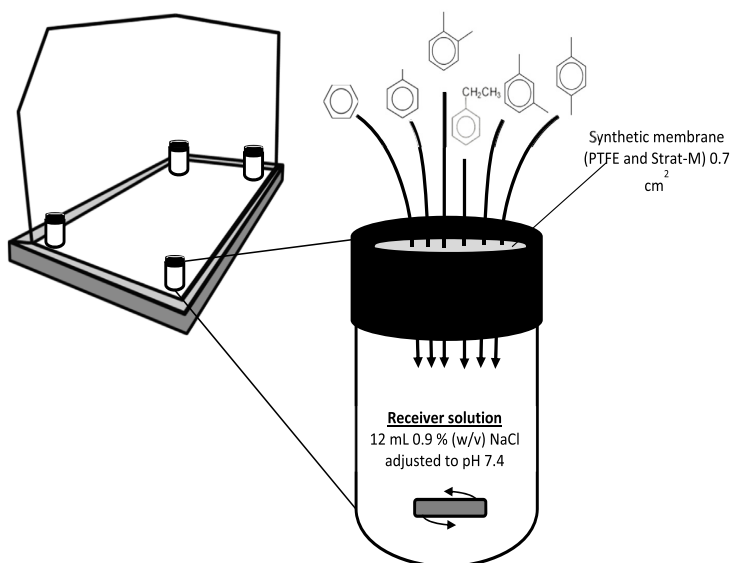


Fig. 2. Scheme of the modified vertical Franz diffusion cell used in this study.

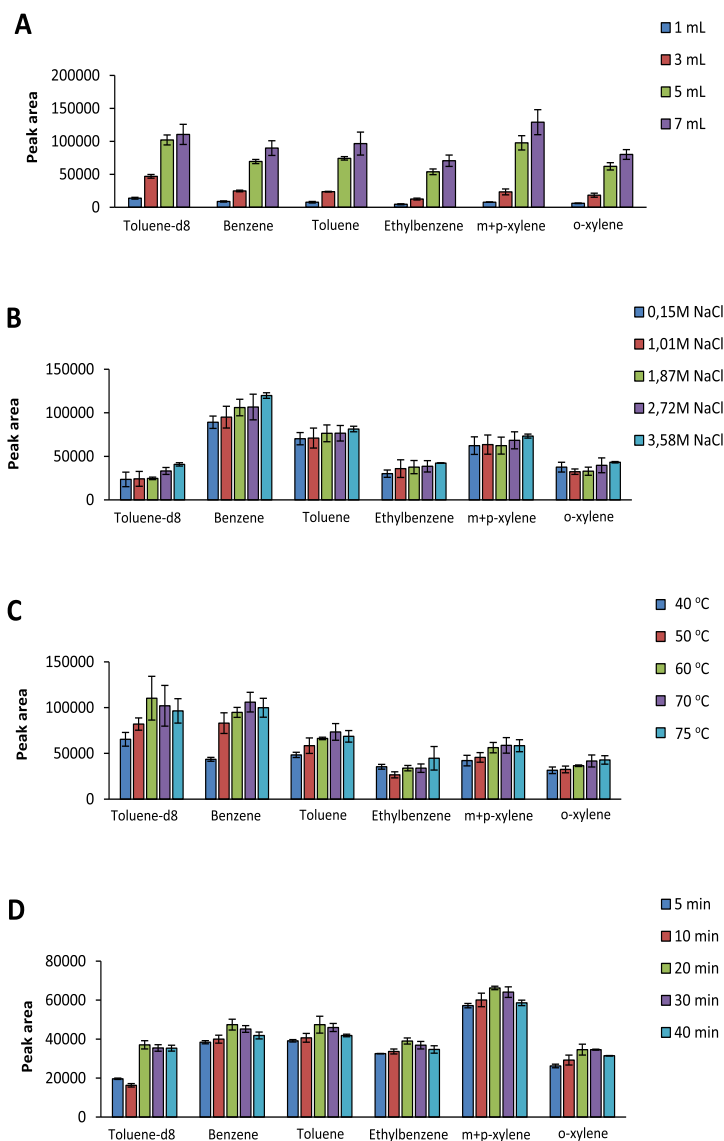


Fig. 3. The effect of sample volume (A), ionic strength (B), extraction temperature (C), and extraction time (D) on the obtained signal for the measurement of a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ BTEX standard in water by HS-GC-MS.

$$H_{CC} = \frac{C_{\text{aqueous}}}{C_{\text{gas}}} \quad (2)$$

where H_{CC} is the dimensionless Henry solubility constant, and C_{aqueous} and C_{gas} is the concentration of analytes in the aqueous and gas phases, respectively. The obtained average values for BTEX concentration in the air are shown in Table 1.

3. Results and discussion

3.1. Design and evaluation of the simulation chamber conditions

The air concentration of BTEX compounds inside the chamber is controlled by the concentration and flow of the standard solution, and the air flow. Acetone was selected as carrier solvent due to its high

vapor pressure that favors the evaporation of the standard solution in the T-piece of the manifold. Moreover, acetone does not enhance the skin absorption of lipophilic compounds, such as BTEX (Monteiro-Riviere, 2010). In order to reach a constant BTEX concentration, before the exposure experiments the chamber was pre-conditioned overnight using the aforementioned working conditions (see Table 1), being the air volume of the chamber renewed 5 times in 12 h. Thus, a zero input-output balance of target analytes was assumed after an overnight cycle. As it has been mentioned, infinite dose conditions were assured by a constant flow of air containing BTEX compounds introduced inside the chamber. Moreover, the placement of a two electric fans inside the chamber assures the homogenization of the BTEX concentration inside the chamber. Homogeneity of the chamber was assessed doing BTEX permeability experiments using PDMS membranes of 1 mm thickness at different locations inside the chamber (see Fig. 2). The results showed a

precision, established as relative standard deviation (RSD) of 4 measurements (each corner of the chamber) lower than 15% for BTEX permeability experiments.

Preliminary experiments were carried out at 51 mg m^{-3} (high level) air working concentration adjusting pure and dry air flow to 2.7 mL min^{-1} and the 3.0% (w/v) BTEX standard solution (in acetone) flow to $4.6 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$. Active sampling was employed to evaluate the real concentration of target analytes inside the calibration chamber two times a day, during three consecutive days. Moreover, these concentrations were compared to that obtained after application of the Henry's law taking into consideration the concentration of the analytes in the water solution once the equilibrium was reached. As it can be seen in Table 1, all these values were in the same range as those theoretically expected with an average air concentration for the studied compounds of $46 \pm 4 \text{ mg m}^{-3}$. Thus, the efficiency of the introduction/volatilization of the BTEX compounds inside the simulation chamber was positively assessed. An additional concentration level was evaluated at 15 mg m^{-3} (low level) adjusting pure and dry air flow to 2.7 mL min^{-1} and the 1.0% (w/v) BTEX standard solution (in acetone) flow to $4.0 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$, obtaining BTEX concentration values shown in Table 1. From these results, it can be demonstrated the stability of the dry air and BTEX solution flow rates, which is appropriate to obtain a simulated BTEX rich atmosphere to perform dermal absorption experiments.

3.2. Study of the HS instrumental conditions

The effect of several parameters that highly affects analytical sensitivity of HS analysis were evaluated, including sample volume, ionic strength, extraction temperature, extraction time, and injection time.

Fig. 3A shows the signal obtained after HS injection, using a 10 mL HS vial, of a 500 ng mL^{-1} BTEX standard as a function of sample volume from 1 to 7 mL. As it can be seen, BTEX signals increased with the sample volume. However, when 7 mL sample volume was used, appreciable leaks were observed in several vials due to the overpressure. Thus, 5 mL sample volume was selected for further experiments.

The effect of ionic strength of the sample solution on the signal of a 500 ng mL^{-1} BTEX standard was evaluated. It should be considered that, the receiving solution of the dermal exposure experiments had an initial concentration of 0.9% (w/v) NaCl, which corresponded to 0.15 M NaCl concentration. Thus, the effect of the ionic strength was evaluated from 0.15 to 3.58 M NaCl. As it can be seen in Fig. 3B, the increase of the ionic strength has no appreciable effect on the BTEX signal; and, thus, a 0.15 M NaCl concentration (0.9% (w/v) NaCl) was selected for further experiments.

Fig. 3C shows the effect of extraction temperature, from 40 to $75 \text{ }^\circ\text{C}$, on the signal of a 500 ng mL^{-1} BTEX standard, using 20 min of extraction time. As it can be seen, peak area increases with the temperature to achieve a maximum value at $60 \text{ }^\circ\text{C}$. At temperatures higher than $60 \text{ }^\circ\text{C}$, leaks were observed in the HS vials due to the overpressure.

HS extraction time was also evaluated, from 5 to 40 min at $60 \text{ }^\circ\text{C}$, using a 500 ng mL^{-1} BTEX standard, being 20 min the most appropriate extraction time as shown in Fig. 3D.

Finally, the effect of injection time (from 0.1 to 0.4 min) on the signal of $5 \text{ mL } 500 \text{ ng mL}^{-1}$ BTEX standard (0.15 M NaCl) analyzed by HS-GC-MS using 20 min at $60 \text{ }^\circ\text{C}$ was evaluated. As it can be seen in Figure SM1 of the supplementary material, using injection times higher than 0.1 min caused peak broadening and overlapping. Although an increase of the sensitivity of the methodology was expected by increasing the injection time, the obtained high width and non-Gaussian shape of GC peaks, strongly recommends the selection of 0.1 min as injection time.

3.3. Analytical features of the HS-GC-MS procedure

Table 2 shows the analytical features of the proposed methodology

Table 2

Analytical figures of merit of BTEX determination by HS-GC-MS.

Compound	Coefficient of determination (R^2)	% RSD ^a	LOD ^b ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ^c ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Benzene	0.993	5	6	20
Toluene	0.990	4	7	24
Ethylbenzene	0.9992	4	2	7
m + p-xylene	0.9993	2	4	12
o-xylene	0.998	4	3	10

^a Relative standard deviation of a $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ BTEX standard ($n = 5$).

^b Limit of detection was calculated as three times the standard deviation of the intercept divided by the slope of the calibration curve.

^c Limit of quantification was calculated as ten times the standard deviation of the intercept divided by the slope of the calibration curve.

for BTEX determination in terms of linearity, precision, and limits of detection (LOD) and quantification (LOQ). The determination coefficients (R^2) of BTEX were assessed using calibration curves in a concentration range from 5 to $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, using toluene-d8 as internal standard at a concentration of $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, with R^2 values higher than 0.990 in all cases. Residual errors were randomly and symmetrically distributed around zero, with the standardized residual values lower than 2. Repeatability of the measurements was calculated as the RSD of peak area values obtained for five independent measurements of a $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ BTEX standard solution, obtaining RSD values from 2 to 5%. LOD and LOQ values were calculated as three and ten times, respectively, the standard deviation of the intercept divided by the slope of the calibration curve, obtaining values from 2 to $7 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, and from 7 to $24 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, respectively.

3.4. Effect of the nature and width of the membrane

BTEX have been employed in this study in order to validate the usefulness of the simulation chamber and to compare permeation parameters of the PDMS and Strat-M® membranes. PDMS, also called silicone rubber, is often used to simulate the skin barrier in Franz diffusion cell studies. It is hydrophobic in nature and possesses similar rate-limiting permeation properties as skin, thus making it a suitable choice for predicting organic molecule permeation (Waters, 2015). On the other hand, Strat-M® is a synthetic membrane constructed of two layers of polyethersulfone, more resistant to diffusion, on top of one layer of polyolefin, more diffusive.

Thus, to evaluate if PDMS membranes can be used as an alternative to more complex and expensive synthetic membranes, permeability of each of the membranes, including PDMS of different thickness values from 0.5 to 3.0 mm and Strat-M® (0.3 mm), was tested using a constant and controlled BTEX concentration in air inside the chamber (high level, 51 mg m^{-3}). Cumulative BTEX permeated over 48 h per membrane area using Strat-M® and PDMS (0.5 and 1.0 mm), as representative examples, is depicted in Fig. 4.

As it can be seen in Fig. 4, an initial linear uptake was observed for all the studied compounds, indicating that the analyte permeability followed the Fick's first law. Thus, experimental flux values were calculated from the slopes of linear trend line by least squares and the real air concentration of every target compound inside the calibration chamber was established by the concentration of BTEX in the solution once the equilibrium has been reached using the Henry' law (see Table 1). Table 3 shows the flux and lag time values obtained from each BTEX compound and membrane evaluated with values ranging from 0.2 to $1.5 \text{ } \mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ and from 10 to 130 min, respectively. Thus, from the obtained results, it can be concluded that PDMS membranes of 0.5 and 1.0 mm thickness showed similar flux and lag time values to those obtained from Strat-M® for BTEX permeability. Differences in percentage have been calculated in Table 3. As it can be seen, both 0.5 and 1.0 mm PDMS membranes compare well with Strat-M®, providing

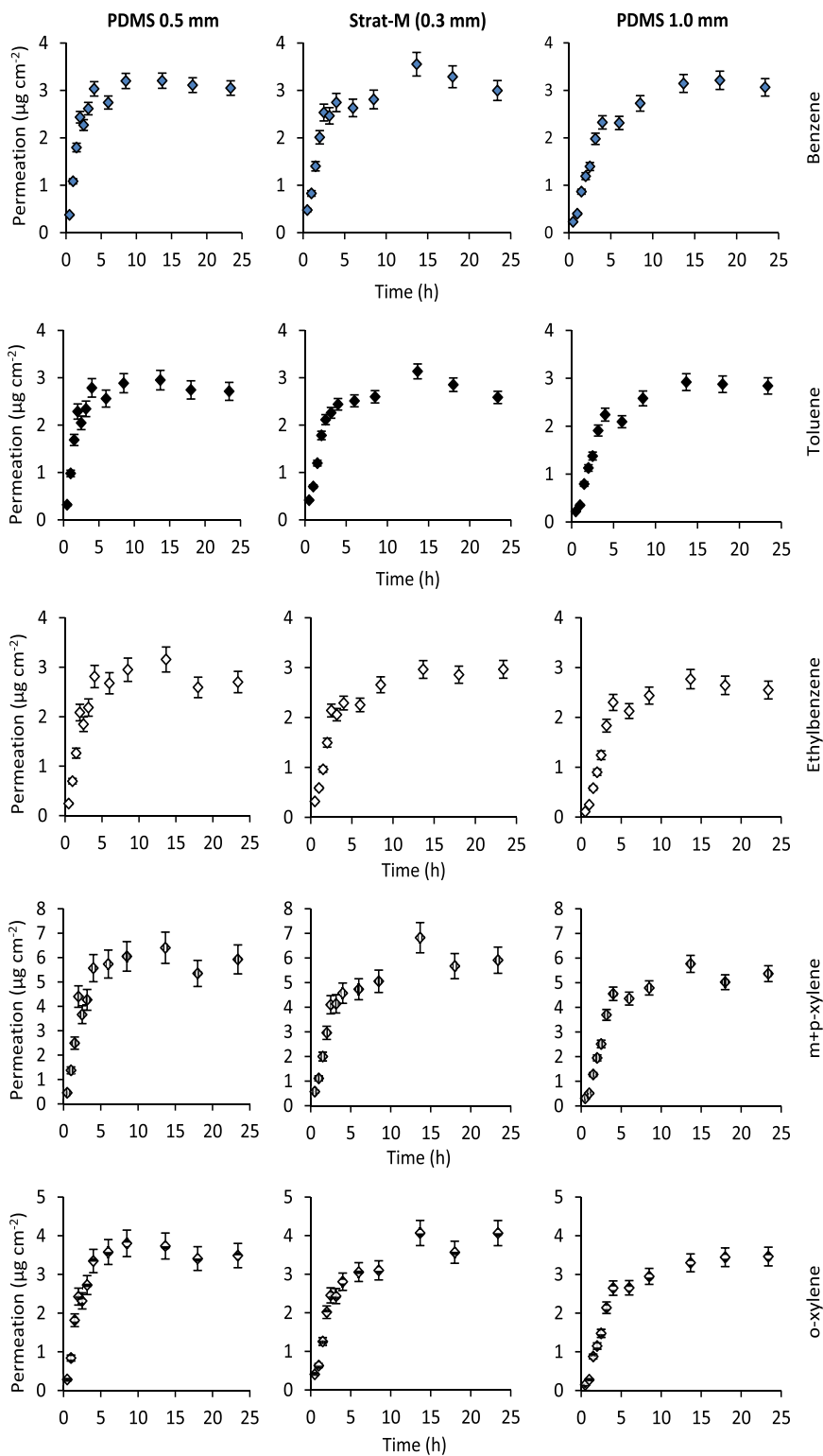


Fig. 4. Permeation curves obtained for BTEX compounds over 48 h at an air concentration of 51 mg m⁻³, using Strat-M® and PDMS (0.5 and 1.0 mm thickness) membranes.

Table 3

Flux (J_{mp}) and lag time experimentally obtained as a function of the analyte and the evaluated membranes using an air concentration of BTEX of 51 mg m^{-3} .

J_{mp} ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1} \pm s$ (% difference))					
	Strat-M	PDMS 0.5 mm	PDMS 1.0 mm	PDMS 2.0 mm	PDMS 3.0 mm
Benzene	1.0 ± 0.1	1.28 ± 0.07 (28)	0.74 ± 0.04 (26)	0.49 ± 0.09 (55)	0.23 ± 0.02 (79)
Toluene	0.90 ± 0.07	1.23 ± 0.07 (37)	0.62 ± 0.03 (31)	0.51 ± 0.09 (43)	0.19 ± 0.01 (79)
Ethylbenzene	1.0 ± 0.2	1.2 ± 0.2 (20)	0.65 ± 0.03 (35)	0.56 ± 0.09 (44)	0.20 ± 0.03 (80)
m + p-Xylene	1.9 ± 0.2	2.3 ± 0.4 (21)	1.31 ± 0.06 (31)	1.1 ± 0.2 (42)	0.39 ± 0.03 (79)
o-Xylene	1.1 ± 0.1	1.5 ± 0.2 (36)	0.74 ± 0.04 (33)	0.5 ± 0.1 (54)	0.21 ± 0.02 (81)
Average difference	-	28	31	48	80
Lag time (min ± s (% difference))					
	Strat-M	PDMS 0.5 mm	PDMS 1.0 mm	PDMS 2.0 mm	PDMS 3.0 mm
Benzene	0	0 (-)	10 ± 10 (-)	40 ± 10 (-)	54 ± 3 (-)
Toluene	0	0 (-)	15 ± 6 (-)	50 ± 20 (-)	51 ± 3 (-)
Ethylbenzene	23 ± 9	21 ± 9 (9)	31 ± 7 (35)	90 ± 40 (291)	130 ± 10 (465)
m + p-Xylene	20 ± 10	20 ± 20 (0)	30 ± 10 (50)	80 ± 60 (300)	100 ± 10 (400)
o-Xylene	20 ± 10	22 ± 8 (10)	25 ± 8 (25)	70 ± 30 (250)	103 ± 9 (415)
Average difference	-	6	37	280	427

average differences of 28 and 31%, respectively. On the other hand, lag time values of 0.5 mm PDMS membrane provide an average difference of 6% respect lag time values obtained with Strat-M®. Lag time values of 1.0 mm PDMS membrane can be considered as acceptable with average differences of 37%, while lag time values of 2.0 and 3.0 mm PDMS membrane provided unacceptable average differences of 280 and 427%, respectively.

Additionally, blank cells placed outside the simulation chamber provided signals lower than the LOD showing a negligible contamination from outside.

3.5. Effect of BTEX concentration in the air on the permeation parameters

Table 4 shows the permeability parameters as a function of the evaluated compounds, the synthetic membrane (1.0 mm PDMS and 0.3 mm Strat-M®), and the concentration of BTEX in the air (15 and 51 mg m^{-3}). On the basis of these values, it can be concluded that flux increased proportionally to the BTEX concentration in air, while the lag time decreased as the air concentration of BTEX increased. It must be indicated that obtained lag times values for benzene and toluene differed to those found for ethylbenzene and xylene isomers in all the evaluated experimental conditions. This aspect has been also observed in the literature and may indicate a faster penetration through the

Table 4

Flux (J_{mp}) and lag time experimentally obtained as a function of the analyte and the evaluated membranes using low (15 mg m^{-3}) and high (51 mg m^{-3}) concentrations of BTEX.

J_{mp} ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1} \pm s$)				
	Strat-M		PDMS 1.0 mm	
Concentration level	low	high	low	high
Benzene	0.49 ± 0.03	1.0 ± 0.1	0.43 ± 0.03	0.74 ± 0.04
Toluene	0.46 ± 0.03	0.90 ± 0.07	0.47 ± 0.02	0.62 ± 0.03
Ethylbenzene	0.37 ± 0.05	1.0 ± 0.2	0.41 ± 0.03	0.65 ± 0.03
m + p-Xylene	0.85 ± 0.08	1.9 ± 0.2	0.79 ± 0.04	1.31 ± 0.06
o-Xylene	0.45 ± 0.04	1.1 ± 0.1	0.50 ± 0.03	0.74 ± 0.04
Lag time (min ± s)				
	Strat-M		PDMS 1.0 mm	
Concentration level	low	high	low	high
Benzene	17 ± 3	0	20 ± 3	10 ± 10
Toluene	15 ± 3	0	26 ± 2	15 ± 6
Ethylbenzene	26 ± 2	23 ± 9	35 ± 2	31 ± 7
m + p-Xylene	29 ± 7	20 ± 10	34 ± 3	30 ± 10
o-Xylene	30 ± 3	20 ± 8	38 ± 3	25 ± 8

membrane due to its smaller size (Adami et al., 2016; Schenk et al., 2018; Blanck and McAuliffe, 1985).

Table 5 shows previously published permeation parameters of BTEX and their experimental conditions. As it can be seen, the variability of the results is high due to the different type of membrane employed (human, animal, or synthetic), nature of donor solution (neat liquid, organic solution, spiked air, ...), or the nature of the permeability study (in vivo or in vitro). Taking these aspects into consideration, flux of BTEX compounds can vary up to four orders of magnitude. Regarding lag time values, the obtained values ranged from 30 to 149 min.

4. Conclusions

In this study a simulation chamber has been designed for the production of a high volume atmosphere with known concentrations of VOCs for its use in the evaluation of diffusion parameters to evaluate dermal absorption of air pollutants. Stability of VOCs concentration in air has been evaluated by using an active sampling approach and also by the obtained equilibrium concentration of the receiver medium using the Henry law. The main advantage that provides the developed chamber is based in the ability to perform simultaneous dermal studies using several diffusion cells at a time, reducing experimental costs and increasing the versatility in order to obtain simulated contaminated

Table 5
Permeation parameters of BTEX and the experimental conditions used in published papers.

Compound	Donor solution	Membrane	Flux ($\mu\text{g cm}^{-2}\text{h}^{-1}$)	Lag time (min)	Reference
Benzene	Gasoline	Human skin	1.5–2.7	68	Adami et al. (2016)
	Water, organic solvents and gasoline	Human skin	40–560	–	Blanck and McAuliffe (1985)
	Neat solvent	Human skin	0.26	–	Magnusson et al. (2004)
	Gasoline	Human skin	9–566	15–35	Frasch and Barbero (2018)
	Air	Rat skin (in vivo)	19	–	McDougal et al. (1990)
Toluene	Air	Strat-M	0.49–1.1	0–17	This study
	Gasoline	Human skin	3.8	96	Adami et al. (2016)
	Organic solvent	Pig skin	380	27	Schenk et al. (2018)
	Fuel	Rat skin	0.5	–	McDougal et al. (2000)
	Neat solvent	Human skin	0.34	–	Magnusson et al. (2004)
	Air	Rat skin (in vivo)	15	–	McDougal et al. (1990)
Ethylbenzene	Air	Strat-M	0.46–0.90	0–15	This study
	Gasoline	Human skin	0.7	143	Adami et al. (2016)
	Organic solvent	Pig skin	124	148	Schenk et al. (2018)
	Fuel	Rat skin	0.4	–	McDougal et al. (2000)
m-xylene	Air	Strat-M	0.37–1.0	23–26	This study
	Organic solvent	Pig skin	63	69	Schenk et al. (2018)
	Air	Rat skin (in vivo)	15	–	McDougal et al. (1990)
m-,p-xylene	Air	Strat-M	0.85–1.9	20–29	This study
	Fuel	Rat skin	0.8	–	McDougal et al. (2000)
o-xylene	Air	Strat-M	0.45–1.1	20–30	This study

atmospheres. BTEX were employed as model compounds to calculate the main permeation parameters using the proposed simulation chamber. The obtained permeation parameters were compared to those found in the literature, indicating therefore the high capabilities of the designed chamber to perform dermal absorption studies.

The developed chamber can be applied for the determination of dermal permeation of volatile and semivolatile compounds from different situations such as occupational exposure at different workplaces, cigarette smoke, or to evaluate the effectiveness of the anti-pollution cosmetics.

Ethical approval

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Author statement

F.A.E.T. and S.A. contributed equally; S.P.L. and J.M. performed experimental work; all the authors participated in the evaluation of results; F.A.E.T. and S.A. guided the experimental work; S.P.L., F.A.E.T. and S.A. drafted the initial version of the manuscript; All authors read and approved the final version of the manuscript.

Declaration of competing interest

The authors have no financial or other relations that could lead to a conflict of interest.

Acknowledgements

Authors acknowledge the financial support obtained from RNB for the project “Desarrollo de nuevos cosméticos antipolución, urban-cream” under the CDTI funding project program (CPI-19-027).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.apr.2020.02.015>.

References

- Adami, G., Larese, F., Venier, M., Barbieri, P., Lo Coco, F., Reisenhofer, E., 2016. Penetration of benzene, toluene and xylenes contained in gasolines through human abdominal skin in vitro. *Toxicol. Vitro* 20, 1321–1330.
- Blanck, I.H., McAuliffe, D.J., 1985. Penetration of benzene through human skin. *J. Invest. Dermatol.* 85, 522–526.
- Bouarar, I., Wang, X., Brasseur, G.P., 2017. *Air Pollution in Eastern Asia: an Integrated Perspective*, first ed. Springer, Berlin.
- de la Guardia, M., Armenta, S., 2016. *The Quality of Air Comprehensive Analytical Chemistry*, vol. 73 Elsevier, Amsterdam.
- European Commission, 2007. European regulation on registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals. https://ec.europa.eu/growth/sectors/chemicals/reach_en.
- European Environment Agency, Copenhagen, 2019. <https://www.eea.europa.eu/themes/air/intro>.
- Franz, T.J., 1975. Percutaneous absorption: on the relevance of in vitro data. *J. Invest. Dermatol.* 64, 190–195.
- Frasch, H.F., Barbero, A.M., 2018. In vitro human skin permeation of benzene in gasoline: effects of concentration, multiple dosing and skin preparation. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 28, 193–201.
- Finlayson-Pitts, B.J., Pitts, J.N., 1993. Atmospheric chemistry of tropospheric ozone formation: scientific and regulatory implications. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 43, 1091–1100.
- Haq, A., Goodyear, B., Ameen, D., Joshi, V., Michniak-Kohn, B., 2018. Strat-M® synthetic membrane: permeability comparison to human cadaver skin. *Int. J. Pharm.* 547, 432–437.
- Kim, H., Bernstein, J.A., 2009. Air pollution and allergic disease. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 9, 128–133.
- Kuranichie, F.A., Angnunavuri, P.N., Attiogbe, F., Nerquaye-Tetteh, E.N., 2019. Occupational exposure of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene (BTEX) to pump attendants in Ghana: implications for policy guidance. *Cogent Environ. Sci.* 5, 1603418.
- Magnusson, B.M., Anissimov, Y.G., Cross, S.E., Roberts, M.S., 2004. Molecular size as the main determinant of solute maximum flux across the skin. *J. Invest. Dermatol.* 122, 993–999.
- Mathes, S.H., Ruffner, H., Graf-Hausner, U., 2014. The use of skin models in drug development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 69–70, 81–102.
- McDougal, J.N., Pollard, D.L., Weisman, W., Garrett, C.M., Miller, T.E., 2000. Assessment of skin absorption and penetration of JP-8 jet fuel and its components. *Toxicol. Sci.* 55, 247–255.
- McDougal, J.N., Jepson, G.W., Clewell III, H.J., Gargas, M.L., Andersen, M.E., 1990. Dermal absorption of organic chemical vapors in rats and humans. *Fund. Appl. Toxicol.* 14, 299–308.
- Monteiro-Riviere, N.A., 2010. *Toxicology of the Skin*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA -10: 1420079174.
- Ng, S.F., Rouse, J.J., Sanderson, F.D., Eccleston, G.M., 2012. The relevance of polymeric synthetic membranes in topical formulation assessment and drug diffusion study. *Arch. Pharm. Res. (Seoul)* 35, 579–593.
- Saalberg, Y., Wolff, M., 2016. VOC breath biomarkers in lung cancer. *Clin. Chim. Acta* 459, 5–9.
- Sander, R., 2015. Compilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent. *Atmos. Chem. Phys.* 15, 4399–4981.
- Schenk, L., Rauma, M., Fransson, M.N., Johanson, G., 2018. Percutaneous absorption of thirty eight organic solvents in vitro using pig skin. *PLoS One* 13, e0205458.

- U.S. Department of Health and Human Services, 1997. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Guidance for Industry. Nonsterile Semisolid Dosage Forms. Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls. Vitro Release Testing and in Vivo Bioequivalence. (Rockville).
- Waters, L.J., 2015. Recent developments in skin mimic systems to predict transdermal permeation. *Curr. Pharmaceut. Des.* 21, 2725–2732.
- Williams, P.R., Sahmel, J., Knutsen, J., Spencer, J., Bunge, A.L., 2011. Dermal absorption of benzene in occupational settings: estimating flux and applications for risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 41, 111–142.
- World Health Organization, 1989. Indoor air quality: organic pollutants. In: Report on a WHO Meeting, Copenhagen).
- World Health Organization, 2011. International agency for research on cancer, (IARC) agents classified by the IARC monographs, Lyon. <https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/>.
- World Health Organization, 2017. Evolution of WHO air quality guidelines: past, present and future, Copenhagen. http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0019/331660/Evolution-air-quality.pdf?ua=1.
- Zalel, A., Yuval, Broday, D., 2008. Revealing source signatures in ambient BTEX concentrations. *Environ. Pol.* 156, 553–562.

Skin Penetration of Hazardous Air Pollutants in Presence of Antipollution Cosmetics

SORAYA PONTES-LÓPEZ, ANA GONZÁLVEZ,
FRANCESC A. ESTEVE-TURRILLAS, and SERGIO ARMENTA,
*Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, Burjassot
46100, Spain (S.P.-L., F.A.E.-T, S.A.), RNB, Cosmetic Laboratory,
Industrial Estate La Pobla-L'Eliaana, La Pobla de Vallbona 46185,
Spain (A.G.)*

Accepted for publication September 29, 2020.

Synopsis

Different antipollution products have recently irrupted the market to answer current health concerns related to air contamination. Thus, the development of methodologies for the appropriate evaluation of the efficacy of these products is needed. In this study, an appropriate analytical methodology has been developed and validated for the evaluation of the effectiveness of antipollution cosmetic products against the dermal absorption of different hazardous air pollutants (HAPs). *In vitro* vertical Franz diffusion cells and Strat-M[®] as human skin simulants have been used to assess the effectivity of antipollution cosmetic products. An exposition chamber, with a fixed and constant concentration of HAPs, including benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene isomers, chlorobenzene, nitrobenzene, haloalkanes, and polycyclic aromatic hydrocarbons, has been designed and made to simulate contaminated atmospheres. The efficacy of antipollution cosmetic products has been evaluated using a multi-pollutant approach, representing a more stringent situation. Diffusion parameters, including flux and lag time, have been calculated for HAPs in the presence of cosmetic samples, using 2 mg product per cm², and in control tests. The behavior of HAPs followed Fick's first law, allowing the calculation of diffusion parameters. Antipollution effectiveness is demonstrated by statistical evaluation of the diffusion parameters obtained for controls and cosmetics samples. So, a reduction in flux values and an increase in lag times imply an appropriate antipollution effectiveness.

INTRODUCTION

Air pollution is one of the major concerns of 21st century society because of the risk-associated adverse effects on human health (1). Air pollutants can be classified in two main types: (i) criteria air pollutants, which include ozone, carbon monoxide, particulate matter, lead, sulfur, and nitrogen dioxides; and (ii) hazardous air pollutants (HAPs), related to source-specific emissions, which include more than 150 compounds (2). HAPs are

Address all correspondence to Sergio Armenta at sergio.armenta@uv.es.

those pollutants that cause serious health effects such as cancer and reproductive effects, among others. HAP contamination of air typically derives from anthropogenic sources, including mobile and stationary sources.

As a result of this health concern, different antipollution products have recently irrupted in the cosmetic market (3). Cosmetic companies have adopted three main strategies to develop antipollution products based on (i) prevention (film-forming ingredients), (ii) protection (antioxidants), and (iii) repair (4). Generally, a combined strategy including several ingredients with different complementary mechanisms of action is preferred. However, the development of antipollution cosmetics and the evaluation of its efficacy is still a complex challenge for the cosmetic industry.

To date, recently published *in vitro* efficacy tests of antipollution cosmetics are based on the effect of air pollutants on the skin structure using human epidermal keratinocytes and reconstructed skin models (5,6) and human fibroblasts (7). Those procedures address modification suffered by the skin in the presence or absence of cosmetic products; however, those procedures do not evaluate the possible dermal absorption, penetration, or assimilation of air pollutants through the skin. In this sense, the Organization for the Cooperation and Economic Development has published a series of guidelines for the *in vivo* (n. 427) and *in vitro* (N. 428) evaluation of dermal absorption of chemicals (8). *In vitro* techniques are based on the determination of absorption rates by passive diffusion through skin or skin simulants, using Franz diffusion cells with two chambers (donor and acceptor ones) separated by a human or synthetic membrane. One of the main advantages of *in vitro* methods is based on the determination of reproducible data of percutaneous absorption parameters and the possibility to evaluate potential risks from dermal exposure to chemicals.

Permeation of a substance through the skin is mainly a diffusion process. Mathematically, absorption of an organic compound can be described by Fick's laws of diffusion. Fick's first law relates the flux of compound (J) per unit area ($\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$) with the concentration gradient of substance (δC) (g cm^{-3}), the linear distance diffused (δx) (cm), and the diffusion coefficient (D) ($\text{cm}^2 \text{h}^{-1}$) in infinite dose conditions equation (1) (9).

$$J = -D \frac{\delta C}{\delta x} \quad (1)$$

Absorption parameters such as J and lag time (τ) can be obtained from Fick's law and calculated from the slope and linear extrapolation back to x -axis of the linear trend of the absorption profile, respectively (9).

Thus, the present study is focused on the development of an appropriate analytical methodology for the evaluation of dermal absorption of different HAPs, using *in vitro* vertical Franz diffusion cells and simulant human skin membranes, to assess the effectivity of antipollution cosmetic products. Moreover, in contrast to previously published single-pollutant approaches, aimed at estimating the absorption of or exposure to a single air pollutant, a multi-pollutant approach representing a situation with more stringent conditions has been used. HAPs used to generate controlled contaminated atmospheres included benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene isomers (BTEX), chlorobenzene, nitrobenzene, haloalkanes, and polycyclic aromatic hydrocarbons.

METHODS AND MATERIALS

REAGENTS AND MATERIALS

Benzene, toluene, ethylbenzene, o-xylene, m-xylene, p-xylene, chlorobenzene, nitrobenzene, 1,2-dichloroethane, bromodichloromethane, 1,2-dibromoethane, bromoform, and naphthalene were provided by Scharlau (Barcelona, Spain) and Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Toluene-d₈ was provided by Sigma-Aldrich, and it was used as internal standard. Standards and working solutions were prepared in acetone (GC analysis grade) obtained from Scharlau. Strat-M[®] membranes were purchased from Millipore (Temecula, CA). Buffer salts were obtained from Scharlau.

COSMETIC PRODUCTS COMPOSITION

Antipollution cosmetic *A* is a daily skin care cream (viscous emulsion) that protects from sunlight and blue radiation, preventing skin photoaging. This cosmetic product firms, smoothes, and reduces wrinkles, due to paracress plant extract. It is suited to sensitive skin because of the presence of active principles such as licorice extract and bioactive molecules from stem cells from cotton.

Antipollution cosmetic *B* is also a rich texture cream (viscous emulsion) that welfares and protects the skin against external agents such as contamination, sun radiation (infrared, ultraviolet, and blue light), and oxidant agents, increasing skin firmness and elasticity while intensely moisturizing. These properties for treating and preventing adverse environmental effects are provided by its combination of active principles including vitamin C, peptides (carnosine and oligopeptide-1), allantoin, panthenol, and bioactive molecules from stem cells from cotton.

PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF DEVELOPED COSMETIC PRODUCTS

Physicochemical properties such as viscosity, density, pH, conductivity, and refraction index of developed cosmetic products were determined following the procedures described next. Viscosity was measured using a DV-III Ultra rotational viscometer from AMETEK Brookfield (Middleboro, MA). The measurement was carried out with a rotational speed of 50 rpm and read after 3 s after starting the viscometer. An electronic densimeter MDS-300 from Alfa Mirage (Tokyo, Japan) was used for density determination. A 3-mL syringe was filled with sample. The cell was filled with the sample until it flows out by the other exit (2 mL of sample, approximately). The pH values of the respective specimen were measured by means of the PHS-3B pH meter from TBT (Nanjing, China). The values of electrical conductivity were measured using an EC-meter GLP-31 from Crison (Barcelona, Spain). The refraction index was measured using an RE40D Refractometer from Mettler Toledo (Barcelona, Spain). In all the experiments, sample temperature was 25°C, and the measurement was repeated three times for the sample, the final result being an average of three independent measurements.

SIMULATION CHAMBER

A modified closed enclosure model HZ08252, with 640 L internal volume, from Bruker (Billerica, MA) was used as a simulation chamber (see Figure SM1 of Supplementary

Material). Clean and dry air at a fixed flow rate of 2.7 L min^{-1} was introduced in the chamber using an MPB1200 rotameter from MPB Industries (Kent, United Kingdom), calibrated by a high-volume bubble flowmeter. Clean air was spiked with HAPs by using an isocratic LC pump HP 1,050 series from Hewlett-Packard (Palo Alto, CA) adjusted to $5 \mu\text{L min}^{-1}$ and a glass T connector (see Figure SM2 of Supplementary Material). Air homogeneity inside the chamber is obtained with two fans with vibration-dampening rubber corners. Infinite dose conditions were maintained during all the experiments. The simulation chamber was placed in a 50 m^3 closed room, with controlled temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) and a fume hood system.

DETERMINATION OF HAPS IN THE SIMULATION CHAMBER BY ACTIVE SAMPLING

HAP concentration inside the chamber was measured by active sampling using a low-volume personal air sampling TUFF Standard from Casella measurements (Bedford, United Kingdom), operating with a low-flow adaptor at a flow rate of 76 mL min^{-1} for 30 s. Glass thermal desorber (TD) tubes, capped with perfluoroalkoxy-polytetrafluoroethylene (PFA-PTFE) ferrules, were obtained from Perkin Elmer (Waltham, MA) and filled with 150 mg of Tenax TA (35–60 mesh) provided by Alltech (Selmsdorf, Germany). Tenax was conditioned before sampling at 300°C during 2 h. All Tenax tubes were analyzed before sampling to demonstrate the usefulness of the conditioning procedure. Active sampling pump flow was regulated using an ADM calibrated flowmeter (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) before each sampling. After sampling, tubes were capped with PFA-PTFE ferrules and stored at -10°C until analysis. TD tubes were thermally desorbed using a Turbo Matrix series TD from Perkin Elmer coupled to a Trace GC-Polaris Q gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) detector from Finnigan (Waltham, MA), equipped with an Agilent HP-5MS capillary column (30 m, 0.25 mm, and $0.25 \mu\text{m}$).

Thermal desorption was carried out at 260°C for 20 min using a 75 mL min^{-1} helium flow rate, and desorbed analytes were transferred to a Tenax cold trap at -10°C . A quick trap desorption was carried out at 270°C at 99°C s^{-1} , and the analytes were desorbed and directly transferred to the chromatographic column using a transfer line temperature at 275°C , using a split flow of 1:15. The used chromatographic conditions started at an initial temperature of 40°C , held for 8 min, increased at a rate of $20^\circ\text{C min}^{-1}$ up to 200°C , and finally held for 2 min. Acquisition were performed in full scan mode using a mass range from 50 to 150 m/z.

A calibration curve was prepared by the direct addition of $10 \mu\text{L}$ HAP standards in acetone directly inside Tenax packed TD tubes. Curve was prepared at five concentration levels ranging from 0.005 to $1.0 \mu\text{g}$ target analytes. Then, $10 \mu\text{L}$ toluene-d8 standard solution in acetone at a concentration of 0.01 g L^{-1} was added inside the Tenax tube to obtain a final mass of $0.1 \mu\text{g}$, as internal standard.

ABSORPTION STUDIES IN THE SIMULATION CHAMBER

In vitro dermal absorption studies were performed using modified vertical diffusion cells, following the Franz method (10,11). In this study, the donor compartment was

the inside atmosphere of the simulation chamber, and the receiver solution consisted of 12 mL saline solution of 0.9% (w/v) NaCl adjusted to pH 7.4 with phosphate buffer 0.15 M, both maintained at 25°C by control of the external temperature. Receptor solutions in each cell were continuously stirred using a teflon-coated magnetic stirrer. The synthetic membrane used in this experiment was Strat-M[®], specifically designed to mimic different layers of human skin and composed of two layers of porous polyether sulfone, on a polyolefin nonwoven fabric support, treated with synthetic lipids (12). Control experiments were performed with the Strat-M[®] membrane directly exposed to the surrounding contaminated atmosphere. On the other hand, effectiveness of the antipollution cosmetics was evaluated by homogeneously applying 2 mg product per cm² exposed membrane, this side of the membrane being in contact to the contaminated atmosphere. The amount of HAPs diffused through the control and treated membranes was determined by GC-MS analysis of the receptor solution after different exposure times, from 0.5 to 24 h.

GC-MS DETERMINATION

Analysis of HAPs was performed using direct and head space (HS) injection GC-MS, depending on the physicochemical properties of the analyzed compounds. For HS injection, 5 mL acceptor solution with 200 ng mL⁻¹ of internal standard (toluene-d₈) was introduced in a 10-mL HS vial, hermetically closed. The vial was heated at 60°C for 20 min and HS measured by GC-MS. In the direct injection method, a liquid-liquid extraction of 5 mL acceptor solution with 20 ng mL⁻¹ of internal standard was carried out with 0.5 mL hexane and 2-min vortex shaking. After that, the upper layer was introduced in a 2-mL glass vial containing a 200- μ L internal volume glass insert and analyzed by GC-MS.

The used chromatographic system was an Agilent 7697A HS injector, coupled to a 7890A GC and a 53975C inert XL EI/CI MSD with a triple-axis single quadrupole detector. An Agilent HP-5MS (30 m, 0.25 mm, and 0.25 μ m) capillary column was used, and the oven program of temperatures was an initial temperature of 40°C, held for 8 min, increased at a rate of 20°C min⁻¹ up to 200°C, and finally held for 2 min. Injector temperature was 250°C, using helium as carrier gas at a constant flow mode of 0.8 mL min⁻¹. Ion source and transfer line temperatures were 300 and 250°C, respectively. Electron impact ionization was performed at 70 eV and MS acquisitions using selected ion monitoring mode. Table 1 shows m/z ions and retention time of studied compounds.

PERMEATION PARAMETER DETERMINATION

HAP concentration data of the receptor solution for each diffusion cell experiment were transformed to analyte mass/area unit (μ g cm⁻²). Flux (μ g cm⁻² h⁻¹) was determined for each experimental condition from the initial slope of the plot of cumulative chemical mass/area in the receptor solution over time. Experimental time points before analyte detection in the receptor solution were not used for slope determination. Lag time (h) is estimated as linear extrapolation back to x-axis of the linear trend of the absorption profile.

Table I
Analytical Procedure, Selected Ions, and Retention Time Characteristics of the Analyzed HAPs

	Analytical procedure	Ions (m/z)	Retention time (min)	Limit of quantification (ng mL ⁻¹)
1,2-dichloroethane	HS-GC-MS	62	1.54	10
Benzene	HS-GC-MS	7,778	1.58	5
Bromodichloromethane	HS-GC-MS	83	1.87	10
Toluene	HS-GC-MS	9,192	2.36	5
Ethylbenzene	GC-MS	91,106	3.69	8
m+p-xylene	GC-MS	91,106	3.99	17
o-xylene	GC-MS	91,106	4.65	10
1,2-dibromoethane	GC-MS	107	2.63	25
Chlorobenzene	GC-MS	112	3.32	91
Bromoform	GC-MS	173	4.65	50
Nitrobenzene	GC-MS	123	11.00	500
Naphthalene	GC-MS	128	12.06	50

Furthermore, pollutant concentration in the simulation chamber air can be estimated through Henry's law and the concentration of the aqueous receiving solution once the equilibrium was reached, as shown in Equation (2) (13).

$$H_{CC} = \frac{C_{\text{aqueous}}}{C_{\text{gas}}}, \quad (2)$$

where H_{CC} is the dimensionless Henry solubility constant and C_{aqueous} and C_{gas} are the concentrations of analytes in the aqueous and gas phases, respectively.

STATISTICAL DATA ANALYSIS

HAP absorption parameters were obtained for treated and control experiments as mean \pm standard deviation of three independent measurements. Student's *t*-test was used to determine if values obtained for treated and control experiments were statistically different at a *P*-value lower than 0.05.

RESULTS AND DISCUSSION

PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF ANTIPOLLUTION COSMETICS

Physicochemical properties of the developed antipollution cosmetic products, including viscosity, density, pH, conductivity, and refraction index, have been determined (see Table 2). Viscosity is one of the important physicochemical properties of cosmetics because high viscosity values are associated to a rich composition of active ingredients or consistency factors. On the other hand, low viscosity values could generate problems of dissolution and absorption of the product. As it can be seen in Table 2, antipollution cosmetic *B* (3.95–4.95) has a higher viscosity value than antipollution cosmetic *A* (2.53–3.53).

Table II
Physicochemical Properties of the Developed Antipollution Cosmetic Products

	Antipollution cosmetic A	Antipollution cosmetic B
Viscosity (Pa s ⁻¹)	2.53–3.53	3.95–4.95
Density (g cm ⁻³)	1.0158–1.0258	1.0136–1.0236
pH	6–7	6–7
Conductivity (μS cm ⁻¹)	377–701	1888–2,832
Refraction index (<i>n_D</i>)	1.3748–1.3948	1.3999–1.4199

The density of both cosmetic products is similar, presenting values of 1.01–1.03 g cm⁻³, which is a normal density value for this type of cream cosmetic product. As cosmetic creams are applied directly on the skin, it is preferable that it possesses a pH similar to that of natural skin. Variable skin pH values are being reported in the literature, all in the acidic range but with a broad range from pH 4.0 to 7.0 (14). As it can be seen in Table 2, both cosmetic products have a similar slightly acidic pH value, with values between 6 and 7.

The conductivity test is widely used to determine the emulsion type and to estimate emulsion stability. High conductivity values (higher than 50 μS cm⁻¹) indicate oil/water emulsions, whereas low conductivity values (<1 μS cm⁻¹) indicate water/oil emulsions (15). Conductivity values of cosmetic products are given in Table 2. As it can be seen, product B (1,888–2,832 μS cm⁻¹) has a substantially higher conductivity value than cosmetic A (377–701 μS cm⁻¹), both being oil/water emulsions. Regarding the refraction index, it can be seen that developed cosmetic products show comparable values in the 1.37–1.42 range.

DESIGN AND EVALUATION OF THE SIMULATION CHAMBER CONDITIONS

The air concentration of HAPs inside the chamber is controlled by the concentration and flow of the standard solution and the air flow. Acetone was selected as carrier solvent because of the solubility of HAP compounds and its high vapor pressure. Moreover, acetone does not enhance the skin absorption of lipophilic compounds, such as HAPs (16). The simulation chamber was preconditioned overnight using the aforementioned working conditions, assuming a zero input–output balance of target analytes after the overnight cycle. Infinite dose conditions were assured by a constant flow of air containing HAPs introduced inside the chamber. Homogeneity of the chamber was assessed during HAP permeability experiments using the aforementioned vertical cell design, at different locations inside the chamber. The results showed a precision, established as relative standard deviation of five measurements (each corner and the center of the chamber) lower than 16% for HAP permeability experiments.

Preliminary experiments were carried out at 15 mg m⁻³ air working concentration adjusting pure and dry air flow to 3.0 L min⁻¹ and 0.9% (w/v) BTEX standard solution (in acetone) flow to 5.0 μL min⁻¹. Active sampling was used to evaluate the real concentration of target analytes inside the calibration chamber several times a day, during three consecutive days. Moreover, these concentrations were compared with those obtained after application of Henry's law taking into consideration the concentration of the analytes

in the water solution once the equilibrium was reached. As it can be seen in Table 3, all these values were in the same range as those theoretically expected, with HAP air concentration from 12 to 15 mg m⁻³ and from 8 to 14 mg m⁻³, except for nitrobenzene that provided 4 and 3 mg m⁻³, for the active sampling measurement and using Henry's law, respectively. Thus, the efficiency of the volatilization system to introduce HAPs inside the simulation chamber was positively assessed.

EFFECTIVENESS OF ANTIPOLLUTION COSMETICS

Evaluation of the effectiveness of developed antipollution cosmetics has been carried out using the simulation chamber, as previously described. Control experiments were carried out using Strat-M[®] membranes without any added cosmetic layer, whereas cosmetic samples experiments were performed with Strat-M[®] membranes with a homogeneous layer of 2 mg product per cm² exposed membrane. Vertical cell devices for control and cosmetics experiments were introduced in the exposition chamber for different exposition times, from 0.5 to 24 h. After each exposition time, control and cosmetic samples were removed, and receiving solutions were analyzed by GC-MS to evaluate the antipollution effectiveness over time of the evaluated cosmetic. It should be highlighted that for each exposition time, 10 experiments were carried out: one blank, three controls, three cosmetic A-treated experiments, and three cosmetic B-treated experiments.

Figure 1 shows permeation curves obtained for the studied HAPs in the control and cosmetic samples A and B. As it can be seen, an initial linear uptake was observed for all compounds that reached the equilibrium at exposition times higher than 12 h, indicating that the analyte permeability followed Fick's first law. The equilibrium state in the case of cosmetic samples is reached at longer times than that in control experiments,

Table III

Concentration of HAPs in the Simulation Chamber Air Measured by Active Sampling and Using Henry's Law and Diffusion Parameters

HAPs	[HAPS] [mg m ⁻³ ± s]		K _{OW} ^a	H _{CC} ^b	Permeability at equilibrium (μg cm ⁻² ± s)	J (μg cm ⁻² h ⁻¹ ± s)
	Active sampling	Henry's law				
1,2-dichloroethane	15 ± 3	12 ± 3	1.47	19.83	2.8 ± 0.3	0.566 ± 0.007
Benzene	12 ± 3	9 ± 1	2.13	4.21	0.68 ± 0.07	0.140 ± 0.006
Bromodichloromethane	14 ± 3	11 ± 1	2.10	9.92	1.9 ± 0.2	0.377 ± 0.006
Toluene	12 ± 2	10 ± 1	2.69	3.72	0.67 ± 0.07	0.138 ± 0.008
1,2-dibromoethane	13 ± 3	10 ± 3	1.60	44.62	5.5 ± 0.5	1.2 ± 0.2
Chlorobenzene	14 ± 3	12 ± 3	2.84	7.44	1.6 ± 0.1	0.24 ± 0.04
Ethylbenzene	13 ± 2	10 ± 1	3.13	3.22	0.59 ± 0.06	0.114 ± 0.005
m+p-xylene	25 ± 4	21 ± 2	3.20–3.18	3.47	1.2 ± 0.1	0.25 ± 0.04
Bromoform	13 ± 4	10 ± 4	2.35	42.14	7.4 ± 0.5	1.4 ± 0.3
o-xylene	14 ± 3	14 ± 2	3.13	4.71	1.2 ± 0.1	0.21 ± 0.02
Nitrobenzene	3 ± 1	4 ± 2	1.85	1,140.32	78 ± 13	5.1 ± 0.3
Naphthalene	12 ± 3	8 ± 3	3.36	57.01	7.8 ± 0.8	1.1 ± 0.1

^aK_{OW} values obtained from Ref. (22).

^bH_{CC} values obtained from Ref. (13).

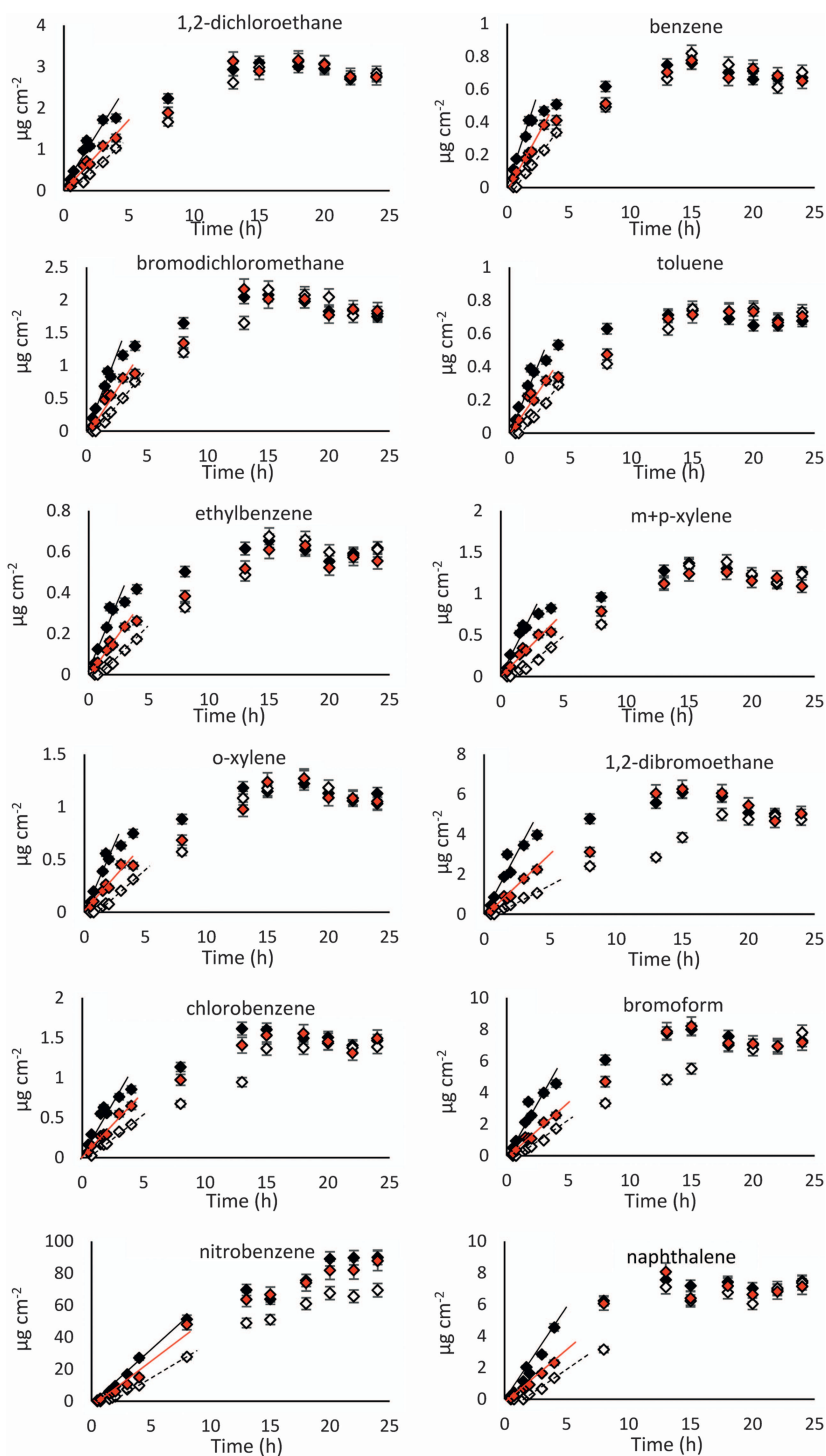


Figure 1. Permeation curves ($\mu\text{g cm}^{-2}$) obtained for the studied HAPs at $3\text{--}15\text{ mg m}^{-3}$ air concentration in control (black diamond), and cosmetic A (red diamond) and B (white diamond) samples.

with a maximum of 18 h. From experimental data, flux values have been obtained for control and cosmetic samples for all the evaluated HAPs (see Table 4), and Student *t*-test was calculated to determine whether values obtained for treated and control samples were statistically different at a *P*-value lower than 0.05. As it can be seen, flux values for cosmetic B are significantly lower than those obtained for cosmetic A and control samples. A reduced flux value implies a higher antipollution efficacy because it reduces the amount of HAPs absorbed per unit time. Table 5 shows the lag time values obtained from the experimental data for the control and cosmetic samples. As it can be seen, lag time values for the control and cosmetic A sample are similar, with lower than 10 min for all the evaluated analytes. However, lag time values obtained for cosmetic B sample are significantly higher than those of the control sample, with values in the range of 33–74 min, which demonstrates high antipollution effectivity of cosmetic B.

EFFECT OF PHYSICOCHEMICAL PARAMETERS OF HAPS ON PERMEABILITY VALUES

Although it is not the main aim of this study, it should be commented that the main physicochemical parameters affecting permeability values (flux, lag time, and permeability at equilibrium) of organic compounds through the skin are related to its molecular weight and octanol–water partition coefficient (K_{OW}) (17,18). For volatile organic compounds, a good indicator of dermal flux is the stratum corneum–air partition coefficient (K_{SC_G}) (19,20), which is directly related to the stratum corneum–water partition coefficient (K_{SC_W}) and water–air partition coefficient (K_{W_G}).

As K_{SC_W} is directly related to K_{OW} and K_{W_G} is related to Henry's law constant (H_{CP}), it can be assumed that for compounds with similar K_{OW} [from 1.47 for 1,2-dichloroethane

Table IV
Concentration of HAPs in the Exposition Chamber and Flux (J) Experimentally Calculated in Control and Cosmetic-Treated Strat-M Membranes, and *t*-Test Comparison Test

HAPs	[HAPs] (mg m ⁻³ ± s)	J [μg cm ⁻² h ⁻¹ ± s]					<i>t</i> -test ^a (cosmetic A vs B)
		Control	Cosmetic A	<i>t</i> -test ^a	Cosmetic B	<i>t</i> -test ^a	
1,2-dichloroethane	15 ± 3	0.566 ± 0.007	0.48 ± 0.01	17.258	0.324 ± 0.009	51.990	28.403
Benzene	12 ± 3	0.140 ± 0.006	0.118 ± 0.005	6.900	0.099 ± 0.003	14.971	7.982
Bromodichloromethane	14 ± 3	0.377 ± 0.006	0.30 ± 0.01	15.543	0.243 ± 0.009	30.345	10.378
Toluene	12 ± 2	0.138 ± 0.008	0.10 ± 0.01	7.268	0.084 ± 0.009	10.985	2.913
1,2-dibromoethane	13 ± 3	1.2 ± 0.2	0.6 ± 0.1	6.573	0.33 ± 0.02	6.573	4.677
Chlorobenzene	14 ± 3	0.24 ± 0.04	0.17 ± 0.02	3.834	0.13 ± 0.02	6.025	3.464
Ethylbenzene	13 ± 2	0.114 ± 0.005	0.075 ± 0.002	17.740	0.056 ± 0.005	20.092	8.642
m+p-xylene	25 ± 4	0.25 ± 0.04	0.18 ± 0.06	2.378	0.11 ± 0.02	7.668	2.711
Bromoform	13 ± 4	1.4 ± 0.3	0.7 ± 0.1	5.422	0.5 ± 0.2	5.978	3.944
o-xylene	14 ± 3	0.21 ± 0.02	0.15 ± 0.03	4.076	0.10 ± 0.01	12.050	3.873
Nitrobenzene	3 ± 1	5.1 ± 0.3	4.0 ± 0.1	8.521	3.5 ± 0.2	10.870	5.477
Naphthalene	12 ± 3	1.1 ± 0.1	0.6 ± 0.1	8.660	0.45 ± 0.05	14.241	3.286

^aStudent *t* critical values equal to 2.230 (*n* = 10).

Table V
Lag Time (τ) Experimentally Calculated for the Studied HAPs in Control and Cosmetic-Treated Strat-M Membranes

HAPs	τ (min \pm s)			
	Control	Cosmetic A	Cosmetic B	<i>t</i> -test ^a
1,2-dichloroethane	<10	<10	50 \pm 5	14.237
Benzene	<10	<10	37 \pm 3	21.362
Bromodichloromethane	<10	<10	54 \pm 6	14.347
Toluene	<10	<10	39 \pm 3	19.106
1,2-dibromoethane	<10	<10	41 \pm 4	3.431
Chlorobenzene	<10	<10	33 \pm 8	6.713
Ethylbenzene	<10	<10	53 \pm 5	20.428
m+p-xylene	<10	<10	50 \pm 7	11.521
Bromoform	<10	<10	50 \pm 6	3.789
o-xylene	<10	<10	55 \pm 6	17.249
Nitrobenzene	<10	<10	64 \pm 29	3.757
Naphthalene	<10	<10	74 \pm 7	10.379

^aStudent *t* critical values equal to 2.230 ($n = 10$).

to 3.36 for naphthalene (21)], the main physicochemical parameter affecting dermal flux is H_{CP} , and as Henry's constant increases, molecular flux increases too ($R^2 = 0.92$) (see Table 3) (13,22).

Regarding permeability values obtained for the different HAPs, it should be noticed that the higher the Henry solubility constant, the higher is the permeability at equilibrium of the analytes in water. Thus, once again, the H_{CC} value is the main physicochemical parameter affecting permeability at equilibrium. As it can be seen in Figure 1, halogenated compounds reached permeabilities at equilibrium from 1.6 to 7.4 $\mu\text{g cm}^{-2}$ significantly higher than those obtained from BTEX compounds (0.67–1.2 $\mu\text{g cm}^{-2}$). Moreover, it should be noticed that naphthalene and nitrobenzene provided permeability values of 7.8 and 78 $\mu\text{g cm}^{-2}$, respectively, which can be attributed to their high H_{CC} values of 57 and 1,140, respectively.

EFFECT OF COSMETICS COMPOSITION ON ANTIPOLLUTION EFFECTIVENESS

As it has been mentioned in the scientific literature (4), surfactants and barrier-forming polymeric materials have demonstrated an important antipollution effect versus organic compounds. Antipollution cosmetic *B* has a total composition of consistency factors, mainly polyacrylates, glyceryl stearates, and hydrophobic waxy polymers, of 3.2% w/w versus only 1% w/w of the antipollution cosmetic *A*. This difference of consistency factors provides significant differences in viscosity (see Table 2) but also significant differences in antipollution effectiveness against organic compounds (see Table 4). In this sense, it should be commented that the percentage of dimethicone (polydimethylsiloxane) used as emollient in the formula is also higher (6.0% w/w) in the antipollution cosmetic *B* than in *A* (3.0% w/w). Polydimethylsiloxane has been previously used as a synthetic skin simulant in dermal absorption experiments (11), which demonstrated that increasing the width of the polydimethylsiloxane membrane decreases flux and increases lag time. Thus,

it would be expected that the presence of higher amounts of polydimethylsiloxane in the cosmetic formula increases its antipollution effect.

The percentage of talc in antipollution cosmetic *B* is also higher than that in *A*. It has been previously demonstrated that organic compounds such as benzene and toluene are adsorbed on talc (23), which would increase the antipollution effect of cosmetic products.

Moreover, the addition of high-molecular weight polysaccharides, such as xanthan gum, an antipollution active principle with demonstrated effects against the adsorption of organic compounds (4), to antipollution product *B* would provide an increase in antipollution effectiveness. In summary, the combination of all the aforementioned compounds provides a demonstrated antipollution effect to cosmetic product *B*, which is superior to that of cosmetic product *A* and clearly superior to the application of any cosmetic product.

CONCLUSIONS

In this study, an analytical methodology has been developed and validated for the evaluation of dermal absorption of different HAPs, using *in vitro* vertical Franz diffusion cells and simulant human skin membranes, to assess the effectivity of antipollution cosmetic products. In this sense, an exposition chamber, with a fixed and constant concentration of HAPs, has been designed to simulate contaminated atmospheres. The efficacy of antipollution cosmetic products has been evaluated using a multi-pollutant approach, representing a situation with more stringent conditions.

The behavior of HAPs, using Strat-M[®] as simulant of human skin, followed Fick's first law, allowing the calculation of diffusion parameters. Antipollution effectiveness is demonstrated by statistical evaluation of the diffusion parameters obtained for controls and cosmetics samples. So, the more cosmetics reduce flux values and increase lag times, the more will be their antipollution effectiveness. Thus, although cosmetics *A* and *B* present a considerable antipollution effect, it has been demonstrated that product *B* has higher antipollution effectiveness than product *A*.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial support obtained from RNB for the project "Desarrollo de nuevos cosméticos antipolución, urbancream" under the CDTI funding project program (CPI-19-027). The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper. This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

REFERENCES

- (1) R. Beelen, O. Raaschou-Nielsen, M. Stafoggia, Z. Jovanovic Andersen, G. Weinmayr, B. Hoffmann, K. Wolf, E. Samoli, P. Fischer, M. Nieuwenhuijsen, P. Vineis, W.W. Xun, K. Katsouyanni, K. Dimakopoulou, A. Oudin, B. Forsberg, L. Modig, A.S. Havulinna, T. Lanki, A. Turunen, B. Oftedal, W. Nystad, P. Nafstad, U. De Faire, N.L. Pedersen, C.G. Östenson, L. Fratiglioni, J. Penell, M. Korek, G. Pershagen, K. Thorup Eriksen, K. Overvad, T. Ellermann, M. Eeftens, P.H. Peeters, K. Meliefste,

- M. Wang, B. Bueno-de-Mesquita, D. Sugiri, U. Krämer, J. Heinrich, K. de Hoogh, T. Key, A. Peters, R. Hampel, H. Concin, G. Nagel, A. Ineichen, E. Schaffner, N. Probst-Hensch, N. Künzli, C. Schindler, T. Schikowski, M. Adam, H. Phuleria, A. Vilier, F. Clavel-Chapelon, C. Declercq, S. Grioni, V. Krogh, M.Y. Tsai, F. Ricceri, C. Sacerdote, C. Galassi, E. Migliore, A. Ranzi, G. Cesaroni, C. Badaloni, F. Forastiere, I. Tamayo, P. Amiano, M. Dorronsoro, M. Katsoulis, A. Trichopoulou, B. Brunekreef, G. Hoek, Effects of long-term exposure to air pollution on natural-cause mortality: an analysis of 22 European cohorts within the multicentre ESCAPE project, *Lancet*, **383**, 785–795 (2014).
- (2) Environmental Protection Agency, *Priority Pollutant List* (2014) (accessed September 1, 2020), <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/priority-pollutant-list-epa.pdf>.
 - (3) C. Juliano and G. A. Magrini, Cosmetic functional ingredients from botanical sources for anti-pollution skincare products, *J. Cosmetics*, **5**, 19 (2018).
 - (4) N. Mistry, Guidelines for formulating anti-pollution products, *J. Cosmetics*, **4**, 57 (2017).
 - (5) J. Soeur, J. P. Belaïdi, C. Chollet, L. Denat, A. Dimitrov, C. Jones, P. Perez, M. Zanini, O. Zobiri, S. Mezzache, D. Erdmann, G. Lereaux, J. Eilstein, and L. Marrot, Photo-pollution stress in skin: traces of pollutants (PAH and particulate matter) impair redox homeostasis in keratinocytes exposed to UVA1, *J. Dermatol. Sci.*, **86**, 162–169 (2017).
 - (6) J. Cotovio, L. Onno, P. Justine, S. Lamure, and P. Catrouxet, Generation of oxidative stress in human cutaneous models following in vitro ozone exposure, *Toxicol. Vitro*, **15**, 357–362 (2001).
 - (7) Y. Qiao, Q. Li, H. Y. Du, Q. W. Wang, Y. Huang, and W. Liu, Airborne polycyclic aromatic hydrocarbons trigger human skin cells aging through aryl hydrocarbon receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **488**, 445–452 (2017).
 - (8) OECD, *Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method* (2004), accessed 1 September 2020, <https://doi.org/10.1787/20745788>.
 - (9) J. W. Pugh and R. P. Chilcott, “Principles of diffusion and thermodynamics,” in *Principles and Practice Skin Toxicology*, R. P. Chilcott and S. Price. Eds. (John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2008), <https://doi.org/10.1002/9780470773093.ch6>.
 - (10) T. J. Franz, Percutaneous absorption: on the relevance of in vitro data, *J. Investig. Dermatol.*, **64**, 190–195 (1975).
 - (11) S. Pontes-López, J. Moreno, F. A. Esteve-Turrillas, and S. Armenta, Development of a simulation chamber for the evaluation of dermal absorption of volatile organic compounds, *Atmos. Pollut. Res.* **11**, 1009–1017 (2020).
 - (12) A. Haq, B. Goodyear, D. Ameen, V. Joshi, and B. Michniak-Kohn, Strat-M® synthetic membrane: permeability comparison to human cadaver skin, *Int. J. Pharm.*, **547**, 432–437 (2018).
 - (13) R. Sander, Compilation of Henry’s law constants (versión 4.0) for water as solvent, *Atmos. Chem. Phys.* **15**, 4399–4981 (2015).
 - (14) H. Lambers, S. Piessens, A. Bloem, H. Pronk, and P. Finkel, Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **28**, 359–370 (2006).
 - (15) J. Jiang, Z. Mei, J. Xu, and D. Sun, Effect of inorganic electrolytes on the formation and the stability of water-in-oil (W/O) emulsions, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, **429**, 82–90 (2013).
 - (16) N. A. Monteiro-Riviere, *Toxicology of the Skin* (CRC Press, Cleveland, OH, 2010).
 - (17) T. Vera Fiserova-Bergerova and T. Pierce, Horizons: biological monitoring V: dermal absorption, *Appl. Ind. Hyg.*, **4**, F14–F21 (1989).
 - (18) B. M. Magnusson, Y. G. Anissimow, S. E. Cross, and M. S. Roberts, Molecular size as the main determinant of solute maximum flux across the skin, *J. Investig. Dermatol.*, **122**, 993–999 (2004).
 - (19) D. R. Mattie, J. R. Bates, G. W. Jepson, J. W. Fisher, and J. N. McDougal, Determination of skin: air partition coefficients for volatile chemicals: experimental method and applications, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **22**, 51–57 (1993).
 - (20) M. Gong, Y. Zhang, and C. J. Weschler, Predicting dermal absorption of gas-phase chemicals: transient model development, evaluation, and application, *Indoor Air.*, **24**, 292–306 (2014).
 - (21) R.E. Rathbun, Transport, behavior, and fate of volatile organic compounds in streams, United States Government Publishing Office (Washington, DC), Professional Paper, 1589 (1998). <https://doi.org/10.3133/pp1589>
 - (22) Agency for Toxic Substances and Disease Registry website, Atlanta, GA, USA. Accessed September 1st, 2020, <https://www.atsdr.cdc.gov/substances/index.asp>.
 - (23) H. Hashizume, Adsorption of aromatic compounds in water by talc, *Clay Sci.*, **14**, 61–64 (2009).

Skin Permeation of Hazardous Compounds of Tobacco-Smoke in Presence of Antipollution Cosmetics

SORAYA PONTES-LÓPEZ, ANA GONZÁLVEZ,
FRANCESC A. ESTEVE-TURRILLAS, and SERGIO ARMENTA,
*Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, Burjassot
46100, Spain (S.P.-L., F.A.E.-T, S.A.); RNB, Cosmetic Laboratory,
Industrial Estate La Pobla-L'Elia, La Pobla de Vallbona 46185,
Spain (A.G.)*

Accepted for publication May 14, 2021.

Synopsis

Negative health effects of active and passive smokers have been widely described, but the effect of tobacco-smoke on the skin has been less explored. In this study, an analytical methodology has been developed to evaluate the dermal permeation of hazardous compounds present in tobacco-smoke, using an exposition chamber to simulate finite and infinite smoking conditions, in vitro vertical Franz diffusion cells, and Strat-M® membranes as human skin simulants. Moreover, the antipollution effect of three cosmetics has been evaluated, showing a significant efficacy to reduce dermal permeation of hazardous tobacco-smoke compounds such as of nicotine and aromatic hydrocarbons.

Keywords: dermal absorption; hazardous air pollutants; antipollution cosmetic; simulation chamber; vertical diffusion cells; passive smoking

INTRODUCTION

Cigarette smoke is a complex mixture, consisting of thousands of compounds, many of which are known carcinogens, cocarcinogens, or tumour promoters (1). It is a dynamic mixture of sidestream and exhaled mainstream smoke resulting from combustion of cigarettes. Health effects of cigarette smoking are well known (2), but smoking effects on skin have been less studied. The presence of free radicals, both in the tar and the gas phase (3,4), converts the smoke into a highly reactive nature with potential damaging effects on the skin surface (5). It is known that cigarette smoking induces premature skin aging (6,7). The relationship between cigarette smoking and skin aging is supported with epidemiological studies and in vitro mechanistic evidence (8,9,10). It has been also evidenced

Address all correspondence to Sergio Armenta at sergio.armenta@uv.es

that cigarette smoke can be associated with psoriasis (11).

As a result of this concern, different antipollution products have recently irrupted in the cosmetic market (12). As complete avoidance of smoke pollution is impossible in cigarette smokers, antipollution cosmetic products have three main mechanisms of action: i) prevention (film-forming ingredients or skin barriers), ii) protection (antioxidants to neutralize free-radicals), and iii) repair (13). To date, published in vitro efficacy methods for antipollution cosmetics are based on the effect of pollutants on the skin structure using human epidermal keratinocytes and reconstructed skin models (14,15), and human fibroblasts (16). Those procedures evaluate modifications suffered by the skin in presence or absence of cosmetic products; however, they do not evaluate dermal absorption of air pollutants through the skin.

In this sense, the Organization for the Cooperation and Economic Development has published a series of guidelines for the in vivo (n. 427) and in vitro (N. 428) evaluation of dermal absorption of chemicals (17,18). Those procedures are based on the determination of absorption rates by passive diffusion using vertical diffusion cells. Using a similar approach, the dermal exposure of nicotine from liquid solutions (19,20,21), benzene from gasoline (22), and different organic compounds from pure liquids (23) have been evaluated.

The present study is focused on the development of an appropriate analytical methodology for the evaluation of dermal absorption of different organic compounds from cigarette smoke, using in vitro vertical Franz diffusion cells and simulat human skin membranes to, on one hand, assess the effectivity of antipollution cosmetic products and, on the other hand, describe and evaluate the dermal absorption process of some well-known organic contaminants from cigarette smoke. In order to do that, a multi-pollutant approach simulating field exposition conditions at finite and infinite doses has been employed.

METHODS AND MATERIALS

REAGENTS AND MATERIALS

Benzene, toluene, ethylbenzene, o-xylene, m-xylene, p-xylene, chlorobenzene, styrene, p-cymene, limonene, naphthalene, acenaphthylene, 1-methylphenanthrene, 2-methylanthracene, and nicotine were provided by Scharlau (Barcelona, Spain) and Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Toluene-d₈, and nicotine-d₄, provided by Sigma-Aldrich, were employed as internal standards. Standards and working solutions were prepared in acetone (GC analysis grade) obtained from Scharlau. Methanol, ammonium acetate and phosphate saline buffer, obtained from Scharlau, were used for mobile phase composition and LC standards preparation. Strat-M® membranes were purchased from Millipore (Temecula, CA, USA).

American-blend cigarettes, containing approximately 50 % Virginia, 37 % burley, and 13 % oriental varieties, were obtained from local tobacco shops.

COSMETIC PRODUCTS COMPOSITION

Antipollution cosmetic A is a daily skin care cream (viscous emulsion) that protects from sunlight and blue radiation, preventing skin photo-ageing. This cosmetic product firms, smoothes, and reduces wrinkles, due to paracress plant extract. It is suited to sensitive skin because of the presence of active principles such as liquorice extract and bioactive molecules from stem cells from cotton.

Antipollution cosmetic B is also a rich texture cream (viscous emulsion) that welfares and protects the skin against external agents such as contamination, sun radiation (infrared, UV, and blue light) and antioxidant agents, increasing skin firmness and elasticity while intensely moisturizing. These properties for treating and preventing adverse environmental effects are provided by its combination of active principles including, vitamin C, peptides (carnosine and oligopeptide-1), alantoin, panthenol, and bioactive molecules from stem cells from cotton.

Antipollution cosmetic C is a lifting cream remodelling facial oval (viscous emulsion) that welfares and protects the skin against external agents, increasing skin firmness and elasticity. These properties for treating and preventing adverse environmental effects are provided by its combination of active principles including, tocopheryl acetate, hydrolysed collagen, citric acid, and bioactive molecules from stem cells from cotton and *Lycium Barbarum* and plant and algae extracts including *Caesalpinia Spinosa* fruit and *Kappaphycus Alvarezii*.

SIMULATION CHAMBER

A specifically modified closed enclosure model HZ08252, with 640 L internal volume, from Bruker (Billerica, MA, USA) was used as simulation chamber (see Figure 1). Clean air was introduced at 2.0 L min⁻¹ in the simulation chamber using a MPB1200 rotameter from MPB Industries (Kent, UK), calibrated by a high-volume bubble flowmeter. Two fans with vibration-dampening rubber corners, placed inside the chamber, assured air homogeneity. The simulation chamber was placed in a 50 m³ closed room, with controlled temperature (25 ± 1 °C) and a fume hood system to avoid operator exposure to hazardous organic compounds from cigarette smoke.

Air monitoring devices were placed inside the simulation chamber to control air quality. An airflow multi-function anemometer TA465-P from TSI (Shoreview, MN, USA), equipped with infrared spectroscopy technology were used to measure CO₂, CO concentration, temperature and relative humidity. A CEL-712 Microdust Pro from Casella Cel (Kempston, UK) with a photoelectric sensor was employed to determine the concentration of particulate materials (PM) suspended in air. An Airy Technology P311 (Stoughton, MA, USA) equipped with laser particle counter was used to determine PM in terms of amount of different size particles and a PhoCheck Tiger from Ion Science (Laubach,

Germany) to determine VOCs based on the use of a photo-ionization detector. All devices were previously calibrated and employed after stabilization.

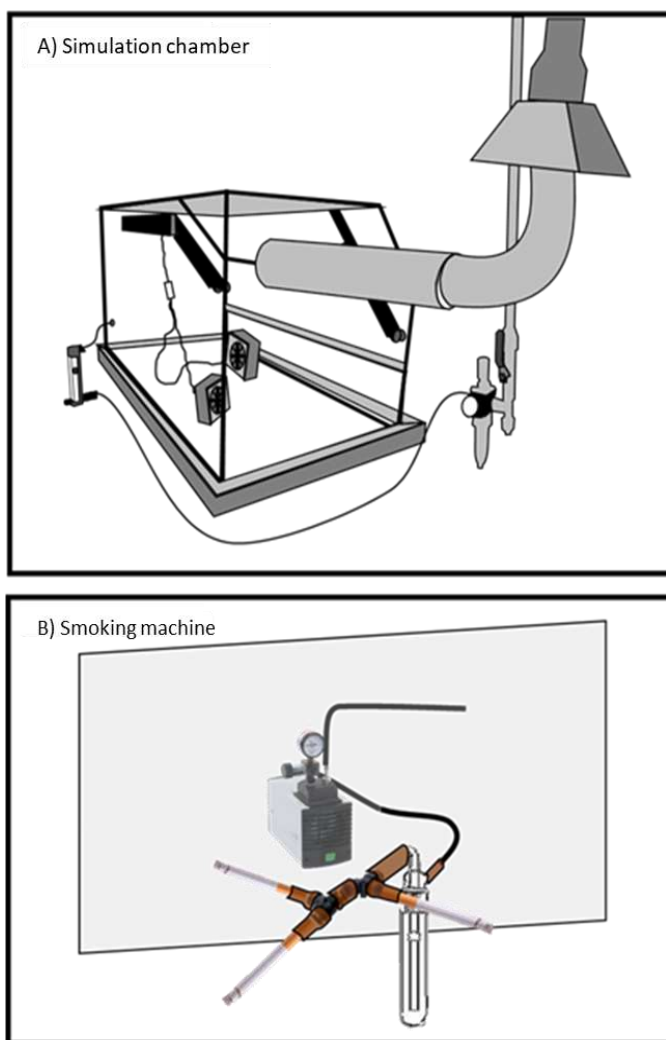


Figure 1. Scheme of (A) the developed exposition chamber and B) smoking machine used to perform dermal absorption studies of hazardous organic compounds from cigarette smoke.

SMOKING MACHINE

Smoking machine was built using a Laboport mini diaphragm vacuum pump, from VWR International (Radnor, PA, USA), operating at 5.5 L min^{-1} flow rate. Vacuum pump was connected to three cigarettes using silicone tubing (10 mm internal diameter) and 3-way hose fittings (see Figure 1). Inhaled smoke was flowed through a vacuum trap and reintroduced in the chamber. For dermal absorption

experiments in finite conditions, the smoking machine was turned on and three cigarettes were simultaneously lighted up. Cigarettes were completely consumed after 10 min, providing a maximum exposure time of 40 min. On the other hand, for dermal absorption experiments in infinite conditions, three cigarettes were simultaneously smoked every 30 min, being 8 h the maximum exposure time.

ABSORPTION STUDIES IN THE SIMULATION CHAMBER

In vitro dermal absorption studies were performed using modified vertical diffusion cells, following the Franz method (24,25). The atmosphere of the simulation chamber acted as donor compartment, while 12 mL saline solution, containing 0.9 % (w/v) NaCl and 0.15 M phosphate buffer (pH 7.4), was the receptor solution. Temperature was maintained at 25 °C by control of the room temperature. Chamber temperature, humidity, and PM and VOC concentration inside the simulation chamber were continuously monitored during all the experiments. Receptor solutions were continuously stirred using Teflon coated magnetic stirrers. Strat-M® membranes (14 mm diameter, being the exposed surface of 0.7 cm²) were used in the modified vertical diffusion cells as skin simulants (26).

Effectiveness of the antipollution cosmetics was evaluated by homogeneously applying 2 mg product per cm² exposed membrane, being this side of the membrane in contact to the contaminated atmosphere. Control experiments were performed with the Strat-M® membrane at the same conditions without cosmetic application. The amount of hazardous organic compounds present in the membrane and receptor solutions were determined after different exposure times.

DETERMINATION OF HAZARDOUS ORGANIC COMPOUNDS FROM CIGARETTES IN THE SIMULATION CHAMBER

The concentration of hazardous organic compounds inside the chamber was measured by active sampling using a low volume personal air sampling TUFF Standard from Casella measurements (Bedford, UK), operating with a low flow adaptor at a flow rate of 40 mL min⁻¹ for 5 min. Glass thermal desorber (TD) tubes, capped with perfluoroalkoxy-polytetrafluoroethylene (PFA-PTFE) ferrules, were obtained from Perkin Elmer (Waltham, MA, USA). TD tubes were filled with 150 mg of Tenax TA (35–60 mesh) provided by Alltech (Selmsdorf, Germany). Tenax was conditioned prior to sampling at 300 °C during 2 h.

Active sampling pump flow was regulated using an ADM calibrated flowmeter (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) before each sampling. After sampling, tubes were capped with PFA-PTFE ferrules and stored at -20 °C until analysis. TD tubes were thermally desorbed using a Turbo Matrix series TD from Perkin Elmer coupled to a Trace GC-Polaris Q gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) detector from Finnigan (Waltham, MA, USA), equipped with an Agilent HP-5MS capillary column (30 m, 0.25 mm, 0.25 µm).

Thermal desorption was carried out at 260 °C for 20 min using a 75 mL min⁻¹ helium flow rate and desorbed analytes were transferred to a Tenax cold trap at -10 °C. A quick trap desorption was carried out at 270 °C at 99 °C s⁻¹ and the analytes were desorbed and directly transferred to the chromatographic column, using a transfer line set at 275 °C, with a helium constant flow of 0.8 mL min⁻¹ and a split flow of 1:15. GC temperature program was 40 °C, held for 8 min, increased at rate of 20 °C min⁻¹ up to 200 °C, and held for 2 min. MS ion source and transfer line temperatures were set at 300 and 250 °C, respectively. Full scan acquisitions were performed using a mass range from 50 to 200 m/z.

Calibration curve was prepared in Tenax packed TD tubes spiked with 10 µL target analytes standard prepared in acetone, with a final added amount from 0.1 to 4.0 µg. Additionally, 10 µL toluene-d₈ internal standard solution (10 mg L⁻¹ in acetone) was added inside the Tenax tube. Table S1 shows m/z ions, retention time and analytical features of studied compounds.

For the analysis of hazardous organic compounds absorbed in the synthetic membrane a similar procedure was used introducing in TD tubes 25 mg of Strat-M® membrane. Calibration curves were prepared in TD tubes loaded with 25 mg of Strat-M® membrane and spiked with 10 µL target analytes standard prepared in acetone, with a final added amount from 0.1 to 4.0 µg. Additionally, 10 µL toluene-d₈ internal standard solution (10 mg L⁻¹ in acetone) was added.

HS-GC-MS DETERMINATION

Analysis of hazardous organic compounds in receptor solutions was performed using an Agilent 7697A head space (HS) injector, a 7890A GC, and a 53975C inert XL EI/CI MSD with triple-axis single quadrupole detector. In a 10 mL HS glass vial were introduced 5 mL receptor solution and 200 ng mL⁻¹ of internal standard (toluene-d₈). HS vial was hermetically closed, heated at 60 °C for 20 min, and HS was measured by GC-MS. Injector temperature was 250 °C, employing 0.8 mL min⁻¹ constant flow helium as carrier gas. Capillary column and GC oven temperature program were that previously described in TD-GC-MS analysis. Electron-impact ionization was performed at 70 eV and MS acquisitions using selected ion monitoring (SIM) mode. Table S2 shows m/z ions and retention time obtained for the studied compounds.

LC-MS-MS

Nicotine determination in receptor solution was performed by LC-MS. An UHPLC-MS instrument model ACQUITY® TQD, from Waters (Milford, MA, USA), with a KINETEX C18 evo (50 x 2.1 mm, 1.7 µm) column, from Phenomenex (Torrance, CA, USA). Mobile phase consisted of 50 mM ammonium acetate in water (A) and methanol (B). Gradient elution from 5 to 95 % mobile phase B in 2 min was used with a flow rate of 0.4 mL min⁻¹, a 5 µL injection volume, and 30 °C column temperature.

MS acquisitions were done using 3.5 kV capillary voltage, 120 °C source temperature, 300 °C desolvation temperature and 690 L h⁻¹ desolvation gas flow rate. Multiple reaction monitoring (MRM) conditions were adjusted for nicotine and nicotine-d₄, being the transitions m/z 163 → 130 and 167 → 136, respectively selected.

RESULTS AND DISCUSSION

IDENTIFICATION OF TOBACCO SMOKE COMPOUNDS INSIDE THE SIMULATION CHAMBER

Cigarette smoke is an aerosol consisting of small, gas phase-suspended droplets with a complex chemical composition of over 8,700 identified constituents (27), but it has been estimated that the actual number may approach 100,000 (28). A vast amount of literature has appeared since 1950 on tobacco smoke constituents (29,30,31). Compounds from cigarette smoke can be classified as neutral gases, carbon and nitrogen oxides, amides, imides, lactames, carboxylic acids, lactones, esters, aldehydes, ketones, alcohols, phenols, amines, N-nitrosamines, N-heterocyclics, aliphatic hydrocarbons, monocyclic and polycyclic aromatic hydrocarbons, nitriles, anhydrides, carbohydrates, ethers, nitro compounds, and metals (32).

The aim of this paper is not to provide a complete list of organic compounds from tobacco smoke but to demonstrate the usefulness of the simulation chamber to generate a polluted atmosphere that represents a situation close to the real one. In this sense, Table S3 in the supplementary material provides a list of the potentially identified organic compounds after active sampling of the simulation chamber air during the simultaneous combustion of three cigarettes using the developed smoking machine. Identification has been done by TD-GC-MS after comparison of the obtained MS spectra with those of National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MA, USA) Mass Spectral Library, containing more than 300,000 MS spectra of organic compounds. Moreover, when possible, GC retention time of the identified peaks were compared with those of analytical standards prepared for this purpose. As it can be seen, the list includes isoprene, benzene and aromatic related compounds, pyridine, aniline, styrene, terpenes, nicotine, and polycyclic aromatic hydrocarbons. From those compounds a selection of 15 compounds, including benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX), chlorobenzene, styrene, p-cymene, limonene, naphthalene, nicotine, acenaphthylene, 2-methylantracene, and 1-methylphenanthrene, were selected as representative compounds for further studies.

DESIGN AND EVALUATION OF THE SIMULATION CHAMBER CONDITIONS

Once representative compounds from cigarette smoke have been selected, the homogeneity of the simulation chamber atmosphere was assessed. In this sense, permeability experiments were carried out using Strat-M® membrane in the modified vertical diffusion Franz cells placed at different locations

inside the chamber (see Figure 2). An average concentration of $380 \pm 40 \text{ ng cm}^{-2}$ toluene was found in the synthetic membrane, determined by TD-GC-MS; while $13.9 \pm 1.3 \mu\text{g L}^{-1}$ nicotine were found in the receptor solution, determined by LC-MS-MS. The obtained precision was appropriate, established as relative standard deviation (RSD) of 5 measurements (each corner and the centre of the chamber), being lower than 10 %. Thus, the placement of two electric fans inside the chamber assured a total homogenization of inner atmosphere, being adequate to perform dermal absorption studies in any position of the simulation chamber.

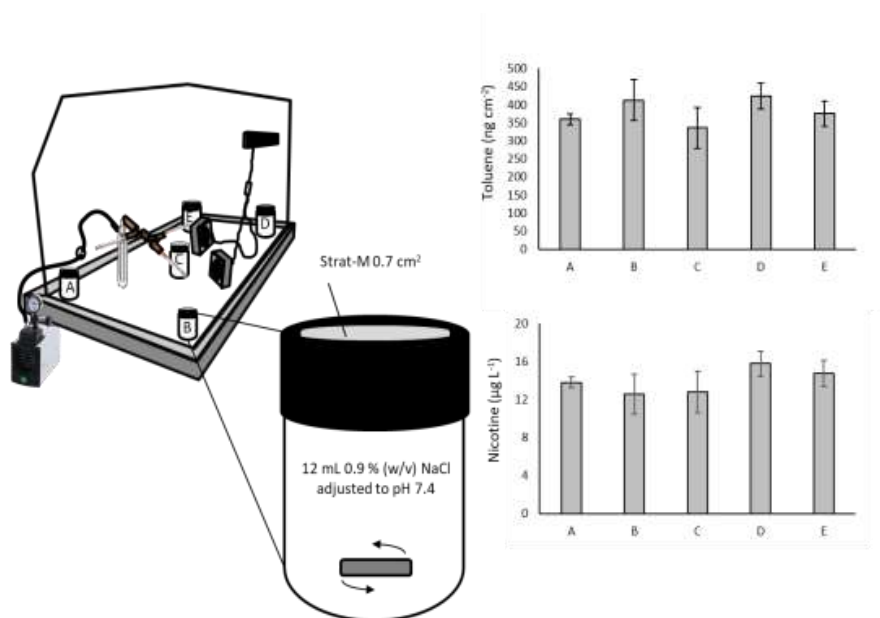


Figure 2. Scheme of the modified vertical Franz diffusion cell and used in this study and results obtained from the five evaluated points inside the simulation chamber to evaluate air homogeneity.

DERMAL ABSORPTION IN FINITE DOSE CONDITIONS

Finite dose experiment was carried out by the combustion of three cigarettes, which were consumed in approximately 10 min. Several parameters were monitored inside the exposure chamber to evaluate the combustion process during the experiment (see Figure S1), giving the next values. Temperature and relative humidity were almost unaffected with average values of $24.8 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$ and $40.1 \pm 0.9 \%$, respectively. VOCs, CO, and CO₂ concentration background levels were 101, 0.45 and 1045 mg m⁻³, respectively, which increase till a maximum around 1200 s (20 min) of 8337, 130, and 3021 mg m⁻³, respectively, due to the cigarette combustion. With a similar profile, PM concentration background concentration was 0.01 mg m⁻³ that increased till 339 mg m⁻³. The concentration of target compounds in the chamber air was monitored by active sampling, at 5 min intervals, for a total time of 2 h. Figure 3 shows the concentration of nicotine, toluene, ethylbenzene, and p-cymene in the chamber air, selected

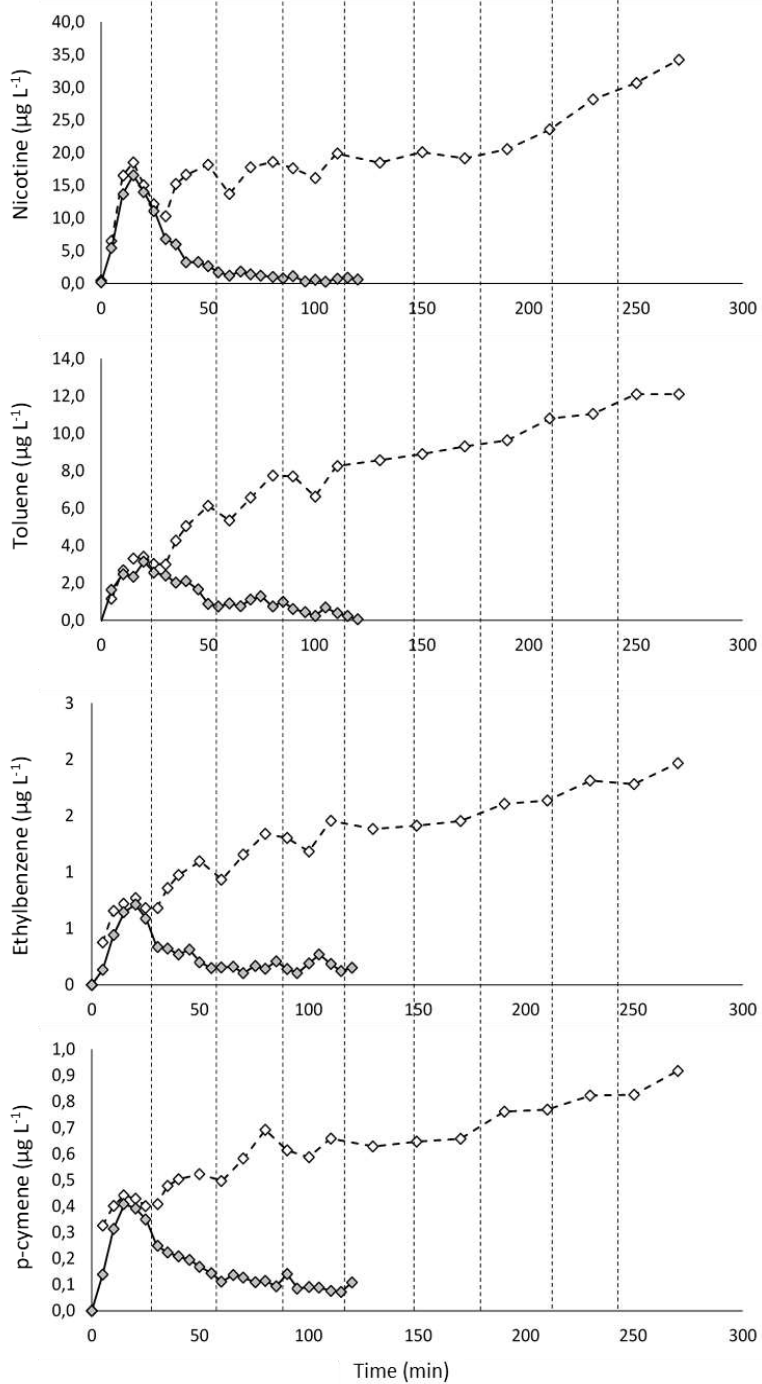


Figure 3. Concentration profile of selected hazardous organic compounds from cigarette smoke inside the simulation chamber measured by active sampling in finite and infinite dose conditions.

as representative compounds. Figure S2 shows the concentration profile obtained for the rest of compounds of interest. As it can be seen in Figure 3, the concentration profile shows a rapid increase of analyte concentration till a maximum at 15-20 minutes and later, a decrease in concentration at reduced speed. The reached maximum concentration values were 16.58, 3.15, 0.71, and 0.41 mg m⁻³ air for nicotine, toluene, ethylbenzene, and p-cymene, respectively. The average concentration of these compounds in the 0-30 minutes interval were 9.70, 2.07, 0.26, and 0.41 mg m⁻³, respectively.

In vitro dermal absorption studies were performed using finite dose conditions, using control Strat-M® membranes without cosmetic (n=3) and membranes treated with a 2 mg cm⁻² homogeneous layer of cosmetics A, B, and C (n=3). Modified Franz cells were introduced in the chamber, the three cigarettes were burnt, and the cells remained in the chamber during 135 min. Then, the concentration of target analytes was determined in Strat-M® membrane and receiving solution of each cells. Additionally, a reagent blank was also analysed to check the absence of contaminations.

The obtained concentrations in control experiments are shown in Figure 4 and Table I. As it can be seen, nicotine was the only compound detected in the receptor solution, while much more compounds were detected in Strat-M® membrane, such as benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes, styrene, p-cymene, and limonene.

Table I.
Concentration of target compounds in Strat-M® membrane and the receptor solution after 30 min exposure at finite dose conditions in control and cosmetic studies.

Sample	Analyte	Concentration (ng cm ⁻² ± s)			
		Control	Cosmetic A	Cosmetic B	Cosmetic C
Strat-M®	Benzene	90 ± 8	50 ± 5	35 ± 4	37 ± 3
	Toluene	160 ± 20	88 ± 9	101 ± 10	65 ± 6
	Ethylbenzene	55 ± 5	40 ± 4	11 ± 2	23 ± 4
	m+p-xylene	400 ± 30	110 ± 10	26 ± 3	46 ± 4
	o-xylene	120 ± 15	54 ± 4	40 ± 3	30 ± 3
	Styrene	160 ± 14	<LOD	<LOD ^a	<LOD
	p-Cymene	71 ± 9	40 ± 3	26 ± 2	10 ± 2
	Limonene	500 ± 50	480 ± 20	143 ± 13	<LOD
	Nicotine	2500 ± 200	1600 ± 140	1400 ± 150	1400 ± 130
	Receptor solution	Nicotine (µg L ⁻¹)	11.6 ± 1.0	7.9 ± 1.0	6.6 ± 1.1

^a Less than limit of detection

Nicotine concentration in the receptor solution increased with the time, reaching a maximum concentration value at 30 min exposure time (11.6 µg L⁻¹). Under these conditions, the effect of the evaluated cosmetics after 30 min exposure, clearly decreases the nicotine dermal absorption with concentrations of 7.9, 6.6, and 7.5 µg L⁻¹ for cosmetics A, B, and C, respectively, indicating an antipollution effect over nicotine absorption (see Table 1).

Analysis of Strat-M® membrane in control studies after 30 min exposure provided concentrations of 90 ng cm⁻² benzene, 160 ng cm⁻² toluene, 55 ng cm⁻² ethylbenzene, 400 ng cm⁻² m+p-xylene, 120 ng cm⁻² o-xylene, 160 ng cm⁻² styrene, 71 ng cm⁻² p-cymene, 500 ng cm⁻² limonene, and 2500 ng cm⁻² nicotine. In

the same way, application of cosmetics A, B, and C provided a significant reduction of the amount of target compounds in the membrane (see Table 1), being the antipollution effect confirmed.

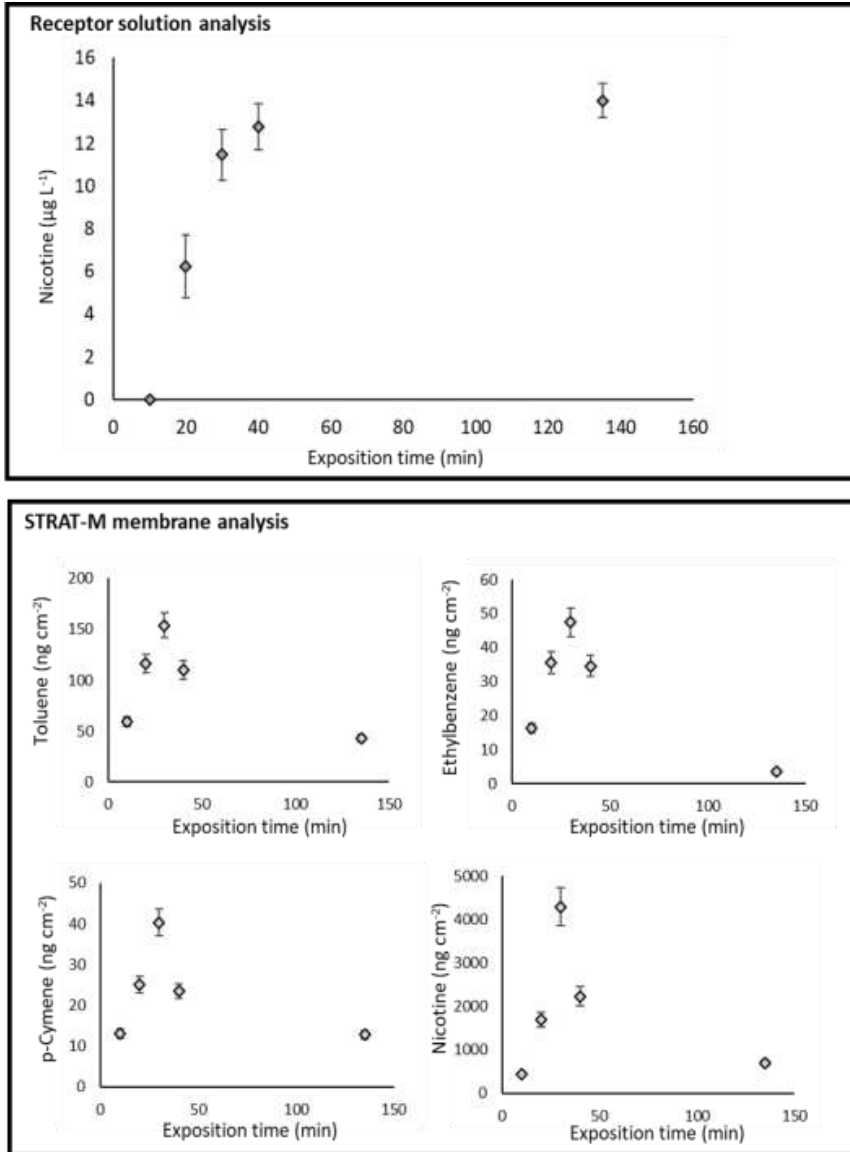


Figure 4. Dermal absorption studies of selected hazardous organic compounds from cigarette smoke in finite dose conditions.

DERMAL ABSORPTION IN INFINITE DOSE CONDITIONS

Antipollution effect of cosmetics was also evaluated at extreme situations, using infinite dose conditions performed by the combustion of three cigarettes every 30 min for a total time of 8 h. Under these conditions, the concentration of cigarette smoke components remain at high concentration levels for a long time (see Figure 3). Active sampling was carried out for a total time of 4.5 h with 20 min intervals, providing an average concentration after 30 min of 20 ± 5 , 8 ± 2 , 1.4 ± 0.3 , and $0.7 \pm 0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ air for nicotine, toluene, ethylbenzene, and p-cymene, respectively.

In the same way, *in vitro* dermal absorption studies at infinite dose were performed for control and cosmetics A, B, and C, using modified Franz cells for an exposure time of 0.5, 1, 2, 4, and 8 h. Benzene, toluene, and nicotine were detected after 1 h exposure time in the receptor solution of control tests (see Table 2), with concentrations of 3.6, 4.8, and $29.0 \mu\text{g L}^{-1}$, which increased to 24, 33, and $1800 \mu\text{g L}^{-1}$ after 8 h exposition, respectively. Figure 5A shows the concentration in the receptor solution with time, indicating a linear uptake for nicotine, while benzene and toluene seemed to reach the equilibrium at 8 h. Concentration found in Strat-M® membrane of control experiments showed a linear uptake (see Figure 5B and Table S4) that reached the equilibrium after 4 h exposure, with concentration of 540 ng cm^{-2} toluene, 340 ng cm^{-2} ethylbenzene, 410 ng cm^{-2} p-cymene, and 49700 ng cm^{-2} nicotine.

Table II.

Concentration of target compounds in the receptor solution after different exposure times at infinite dose conditions in control and cosmetic studies.

Exposure time (h)	Analyte	Concentration ($\mu\text{g L}^{-1} \pm s$)			
		Control	Cosmetic A	Cosmetic B	Cosmetic C
1	Benzene	3.6 ± 0.4	2.4 ± 0.3	1.08 ± 0.11	1.35 ± 0.18
	Toluene	4.8 ± 0.5	2.5 ± 0.3	<LOD ^a	1.0 ± 0.2
	Nicotine	29 ± 2	25 ± 3	21 ± 1	19 ± 2
2	Benzene	9.9 ± 0.6	4.3 ± 0.5	2.8 ± 0.3	2.8 ± 0.4
	Toluene	13.3 ± 1.2	5.1 ± 0.5	3.3 ± 0.4	3.0 ± 0.2
	Nicotine	169 ± 15	159 ± 14	116 ± 11	129 ± 12
4	Benzene	15.9 ± 1.3	14.3 ± 1.6	6.5 ± 0.4	11.2 ± 1.5
	Toluene	24 ± 3	23 ± 2	13.3 ± 1.1	15.6 ± 1.8
	Nicotine	660 ± 60	660 ± 50	630 ± 50	640 ± 30
8	Benzene	24 ± 2	20 ± 2	13 ± 2	18.6 ± 1.6
	Toluene	33 ± 3	28 ± 3	18 ± 2	23 ± 2
	Nicotine	1500 ± 200	1600 ± 140	1300 ± 120	1400 ± 150

^a Less than limit of detection

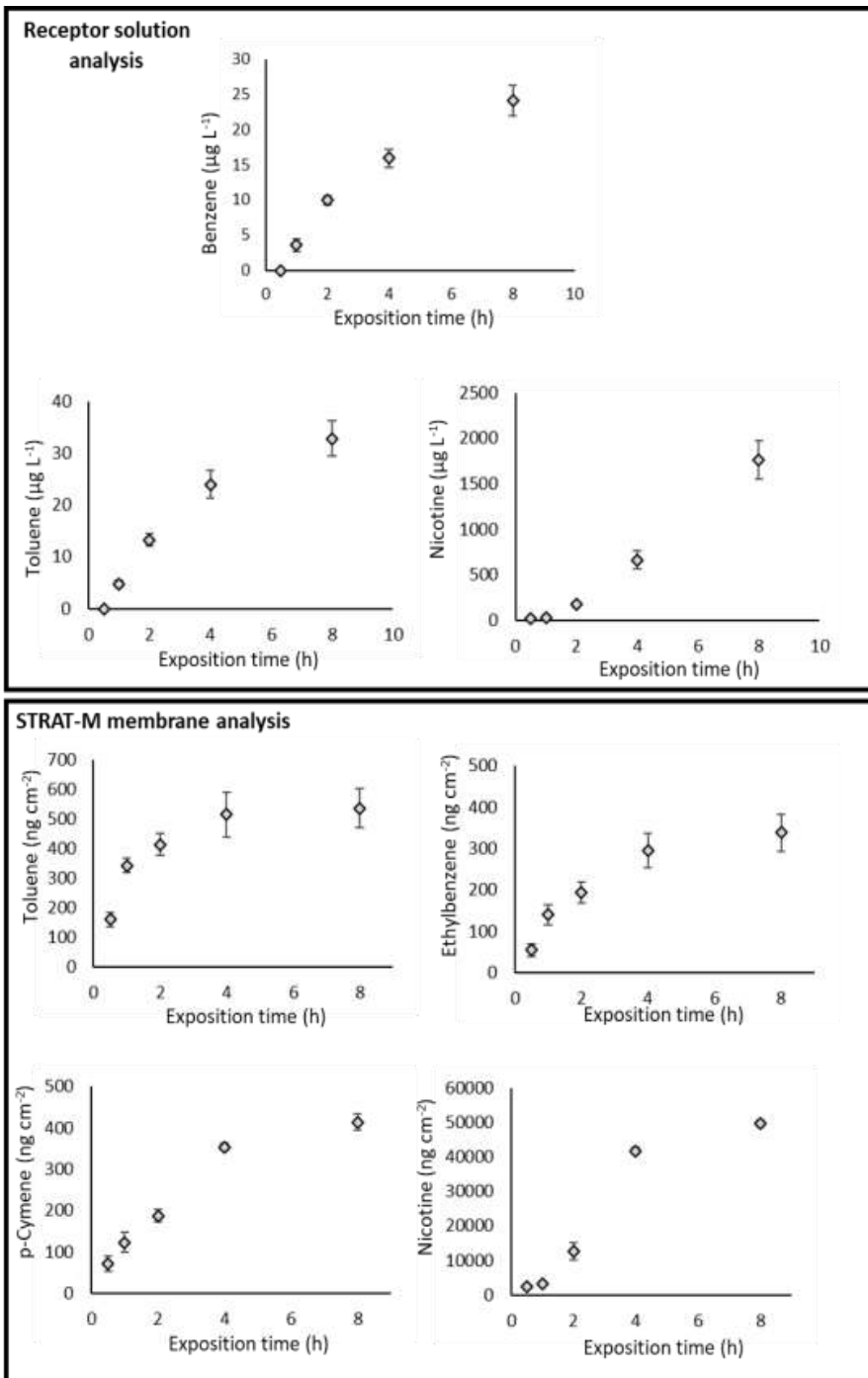


Figure 5. Dermal absorption studies of selected hazardous organic compounds from cigarette smoke in infinite dose conditions.

Table S4 shows the target compound concentration in Strat-M® membranes treated with cosmetics A, B, and C. The effect of the cosmetic layer over Strat-M® membranes was a significant reduction of target compounds concentration for short exposition times (1 and 2 h). Nevertheless, the cosmetic effect was reduced with the time, being insignificant for 8 h exposition time.

The antipollution effect of cosmetics A, B, and C at infinite dose has been evaluated by the determination of the concentration of target compounds in the receptor solution. As it can be seen in Table 2, a reduced concentration was observed in cosmetic treated experiments for 1 and 2 h exposure times. Cosmetic B reduced the concentration in the receptor solution 72 % for benzene, 88 % for toluene, and 29 % nicotine, compared to control experiments. The effect of cosmetic C was similar with a reduced uptake of 67, 78, and 29 % for benzene, toluene, and nicotine, respectively. While the cosmetic A showed the less antipollution effect with a reduction in the uptake of 45, 55, and 10 % for benzene, toluene, and nicotine, respectively. However, the antipollution effect of the evaluated cosmetics was clearly reduced at exposure times higher than 4 h in infinite dose study. Nicotine uptake of cosmetic treated membranes for long exposure times were almost similar to control experiments, indicating a saturation of the cosmetic layer with the pollutant compound. Nevertheless, antipollution effect remained for benzene and toluene, with a reduced concentration in the received solution of 53 and 45 % for cosmetic B, and 26 and 33 % for cosmetic C, respectively.

EFFECT OF COSMETICS COMPOSITION ON ANTI-POLLUTION EFFECTIVENESS

Surfactants and barrier-forming polymeric materials have demonstrated an important anti-pollution effect versus organic compounds [13,33]. In this sense, antipollution cosmetic C have a total composition of consistency factors, mainly polyacrylates, glyceryl stearates, and hydrophobic waxy polymers of 9.0 % (w/w) versus a 3.2 and 1.0 % (w/w) of cosmetic B and A, respectively. In this sense, it should be commented that the percentage of dimethicone (polydimethylsiloxane), used as emollient in the formula, was also different for the evaluated cosmetics, with concentration values of 3.0, 6.0, and 2.0 % (w/w) in antipollution cosmetics A, B, and C, respectively. Thus, differences of consistency factors provided significant differences in antipollution effectiveness against organic compounds.

The addition of high molecular weight polysaccharides, such as xanthan gum, an antipollution active principle with demonstrated effects against the adsorption of organic compounds [4], to antipollution product B and C provided an increase of antipollution effectiveness.

Moreover, the presence of mineral particles in antipollution cosmetics, such as talc or silicates, adsorbs organic compounds in its surface [34,35] and, thus, improves the antipollution efficiency of cosmetic products. Percentage of talc or silicates in antipollution cosmetic B and C was higher than that of A which could also explain the increased efficiency of those products compared to A.

In summary, the combination of all the aforementioned aspects provided a demonstrated antipollution effect to cosmetic product B and C, which was higher to that of cosmetic product A and clearly superior to the application of conventional cosmetic products.

CONCLUSIONS

A versatile and adaptable analytical methodology has been developed to evaluate the dermal permeation of tobacco-smoke hazardous compounds from contaminated air. Permeation experiments were carried out inside a specifically developed exposition chamber to obtain a representative concentration of tobacco-smoke pollutants. A machine was developed to simultaneously smoke three cigarettes, where inhaled smoke was reintroduced in the chamber. The designed manifold allowed to operate at finite and infinite conditions, with the single combustion of three cigarettes for a short-time exposition (around 40 min) and the combustion of three cigarettes every 30 min for long-time exposition (8 h), respectively.

Permeation of tobacco-smoke pollutants was monitored by control experiment using Franz cells and Strat-M® membranes, being nicotine the major pollutant present in both, Strat-M® membrane and receptor solution, with concentrations of $2.5 \mu\text{g cm}^{-2}$ and $11.6 \mu\text{g L}^{-1}$ after a 30 min exposition, respectively. In the case of infinite exposition, nicotine concentration significantly increased to $50 \mu\text{g cm}^{-2}$ in Strat-M® membranes and $1500 \mu\text{g L}^{-1}$ in the receptor solution, after 8 h exposure. The effect of three antipollution cosmetics was demonstrated using the developed conditions, decreasing the permeation of BTEX, styrene, p-Cymene, limonene, and nicotine for exposures of 1 and 2 h. In the case of longer exposure (till 8h), antipollution effects of the evaluated cosmetics were insignificant, due to a saturation of cosmetic layer over the skin simulant. Thus, antipollution cosmetics should be re-applied from time to time to provide a lasting effect.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors acknowledge the financial support obtained from RNB for the project “Desarrollo de nuevos cosméticos antipolución, urbancream“ under the CDTI funding project program (CPI-19-027) and that obtained from the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spain (PID2019-110788GB-I00).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

ETHICAL APPROVAL

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

REFERENCES

- (1) International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, United Nations, Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Tobacco Smoking, International Agency for Research on Cancer, Lyon (1986).
- (2) S.K. Das, Harmful health effects of cigarette smoking, *Mol. Cell. Biochem.* 253, 159–165 (2003).
- (3) E. Randerath, D. Mittal, and K. Randerath, Tissue distribution of covalent DNA damage in mice treated dermally with cigarette "tar": Preference for lung and heart DNA, *Carcinogenesis*, 9, 75–80 (1988).
- (4) W.A. Pryor, M. Tamura, and D.F. Church, ESR spin trapping study of the radicals produced in NOx/olefin reactions: A mechanism for the production of the apparently long-lived radicals in AS phase cigarette smoke, *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 5073–5079 (1984).
- (5) D. Bernhard, C. Moser, A. Backovic, and G. Wick, Cigarette smoke- an aging accelerator?, *Exp. Gerontol.*, 42(3), 160–165 (2007).
- (6) D.P. Kadunce, R. Gress, R. Kanner, J.L. Lyone, and J. Zone, Cigarette smoking: Risk factor for premature facial wrinkling, *Ann. Intern. Med.*, 114(10), 840–844 (1991).
- (7) R.A. Norman and M. Rappaport, Smoking, obesity/nutrition, sun, and the skin. *In Preventive Dermatology*, 17–20 (2011).
- (8) D.N. Doshi, K.K. Hanneman, and K.D. Cooper, Smoking and skin aging in identical twins, *Arch. Dermatol.*, 143 (12), 1543–1546 (2007).
- (9) J.S. Koh, H. Kang, S.W. Choi, and H.O. Kim, Cigarette smoking associated with premature facial wrinkling: image analysis of facial skin replicas, *Int. J. Dermatol.*, 41 (1), 21–27 (2002).
- (10) E. Aizen and A. Gilhar, Smoking effect on skin wrinkling in the aged population, *Int. J. Dermatol.*, 40 (7), 431–433 (2001).
- (11) Q. Zhou, U. Mrowietz, and M. Rostami-Yazdi, Oxidative stress in the pathogenesis of psoriasis. *Free Radic. Biol. Med.*, 47(7), 891–905 (2009).
- (12) C. Juliano, and G.A. Magrini, Cosmetic functional ingredients from botanical sources for anti-pollution skincare products, *J. Cosmetics*, 5, 19 (2018).
- (13) N. Mistry, Guidelines for Formulating Anti-Pollution Products, *J. Cosmetics*, 4, 57 (2017).
- (14) J. Soeur, J.P. Belaïdi, C. Chollet, L. Denat, A. Dimitrov, C. Jones, P. Perez, M. Zanini, O. Zobiri, S. Mezzache, D. Erdmann, G. Lereaux, J. Eilstein, and L. Marrot, Photo-pollution stress in skin: Traces of pollutants (PAH and particulate matter) impair redox homeostasis in keratinocytes exposed to UVA1, *J. Dermatol. Sci.*, 86, 162–169 (2017).
- (15) J. Cotovio, L. Onno, P. Justine, S. Lamure, and P. Catrouxet, Generation of oxidative stress in human cutaneous models following in vitro ozone exposure, *Toxicol. In Vitro*, 15, 357–362 (2001).
- (16) Y. Qiao, Q. Li, H.Y. Du, Q.W. Wang, Y. Huang, and W. Liu, Airborne polycyclic aromatic hydrocarbons trigger human skin cells aging through aryl hydrocarbon receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 488, 445–452 (2017).
- (17) Organisation for Economic Co-operation and Development, Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method. <https://doi.org/10.1787/20745788>, 2004 (accessed 1st April 2021).
- (18) Organisation for Economic Co-operation and Development, Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 427: Skin Absorption: In Vivo Method. <https://doi.org/10.1787/20745788>, 2004 (accessed 1st April 2021).
- (19) H.F. Frasch and A.M. Barbero, In vitro human epidermal permeation of nicotine from electronic cigarette refill liquids and implications for dermal exposure assessment, *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.*, 27(6), 618–624 (2017).
- (20) S. Zorin, F. Kuylenstierna, and H. Thulin, In vitro test of nicotine's permeability through human skin. Risk evaluation and safety aspects, *Ann. Occup. Hyg.*, 43, 405–413 (1999).
- (21) B.J. Aungst, Nicotine skin penetration characteristics using aqueous and non-aqueous vehicles, anionic polymers, and silicone matrices, *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 14, 1481–1494 (1998).

-
- (22) H.F. Frasch and A.M. Barbero, In vitro human skin permeation of benzene in gasoline: Effects of concentration, multiple dosing and skin preparation, *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.*, 28(2), 193–201 (2018).
- (23) L. Schenk, M. Rauma, M.N. Fransson, and G. Johanson, Percutaneous absorption of thirty-eight organic solvents in vitro using pig skin, *PLoS ONE*, 13(10), e0205458 (2018).
- (24) T.J. Franz, Percutaneous absorption: on the relevance of in vitro data, *J. Investig. Dermatol.*, 64, 190-195 (1975).
- (25) S. Pontes-López, J. Moreno, F.A. Esteve-Turrillas, and S. Armenta, Development of a simulation chamber for the evaluation of dermal absorption of volatile organic compounds, *Atmos. Pollut. Res.*, 11, 1009-1017 (2020).
- (26) A. Haq, B. Goodyear, D. Ameen, V. Joshi, and B. Michniak-Kohn, Strat-M® synthetic membrane: Permeability comparison to human cadaver skin, *Int. J. Pharm.*, 547, 432-437 (2018).
- (27) A. Rodgman and T.A. Perfetti, *The Chemical Components of Tobacco and Tobacco Smoke*, (Second ed.), 1473, CRC Press, Taylor & Francis Group, ISBN 9781466515482 (2013).
- (28) A. Rodgman, C.J. Smith, and T. Perfetti, The Composition of Cigarette Smoke: A Retrospective, with Emphasis on Polycyclic Components, *Hum. Exp. Toxicol.*, 19(10), 573-595 (2000).
- (29) J.M. Daisey, K.R.R. Mahanama, and A.T. Hodgson, Toxic Volatile Organic Compounds in Simulated Environmental Tobacco Smoke: Emission Factors for Exposure Assessment, *J. Exp. Anal. Environ. Epidemiol.*, 8(3), 313-334, (1994).
- (30) S. Fischer, B. Spiegelhalter, J. Eisenbarth, and R. Preussman, Investigations on the origin of tobacco-specific nitrosamines in mainstream smoke of cigarettes, *Carcinogenesis*, 11(5), 723- 730, (1990).
- (31) G. Lofroth and Y. Zebuhr, Polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and Dibenzofurans (PCDFs) in mainstream and sidestream cigarette smoke, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 48, 789-794 (1992).
- (32) C. Baumung, J. Rehm, H. Franke and D.W. Lachenmeier, Comparative risk assessment of tobacco smoke constituents using the margin of exposure approach: the neglected contribution of nicotine, *Sci. Rep.*, 6, 35577 (2016).
- (33) S. Pontes-López, A. González, F.A. Esteve-Turrillas, and S. Armenta, Skin Penetration of Hazardous Air Pollutants in Presence of Antipollution Cosmetics, *J. Cosmet. Sci.*, 72, 33–45, (2021).
- (34) H. Hashizume, Adsorption of aromatic compounds in water by talc, *Clay Sci.*, 14, 61-64 (2009).
- (35) Y. Lu, Y. Li, D. Liu, Y. Ning, S. Yang, and Z. Yang, Adsorption of benzene vapor on natural silicate clay minerals under different moisture contents and binary mineral mixtures, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, 585, 124072 (2020).